

第7回科学委員会細胞組織加工製品専門部会

日時 平成25年7月16日(火)

18:00~

場所 P M D A 会議室1~5(6階)

<開会>

○中畠部会長 それでは、定刻になりましたので、第7回科学委員会細胞組織加工製品専門部会を開催させていただきます。本日はお忙しい中、また、非常に暑い中、多数御出席いただきましてありがとうございます。事務局から委員の出席状況の報告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>

○吉田事務局長 まず、委員の出席状況から御報告いたします。当専門部会 14名の委員のうち、本日、12名の先生方に御出席いただいております。また、佐藤陽治臨時委員にも御出席いただいております。科学委員会親委員会から、入村委員、山本照子委員にも御出席いただいております。さらに、本日は、外部有識者にお越しいただいております。プレゼンをしていただく順に御紹介させていただきます。国立がん研究センターがんゲノミクス研究分野の分野長の柴田龍弘先生、日本医科大学学生化学・分子生物学の教授の島田隆先生にお越しいただいております。先ほど申しましたように、先生方には本日、プレゼンをお願いし、議論にも御参加いただくという予定です。

続きまして、配布資料の確認をさせていただきます。お手元にクリップで留めてあるものと、ファイルと、一枚紙となっているものがあるかと思います。まずクリップで留めてあるほうから申し上げますと、

座席表、資料の取扱区分表という一枚紙、議事次第、資料目録があるかと思います。

それを見ながら申し上げますと、まずは資料 1ですが、「iPS 細胞における造腫瘍性リスク評価に関して」です。これは柴田先生の提出資料です。資料 2ですが、「遺伝子治療の現状と課題」です。こちらは島田隆先生の提出資料です。クリップ留めのほうでいきますと、その次には参考資料 2-1 ということで、「薬事法等の一部を改正する法律案の概要」という三枚紙からなる資料があろうかと思います。同じく参考資料 2-2 としまして、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律案の概要」という一枚紙の資料があるかと思います。最後、参考資料 3 としまして「細胞組織加工製品専門部会の議論の進め方」という以前出させていただいた資料です。これがクリップ留めの資料です。

あとは、ファイルでとじてある資料です。右側に「厳重注意」と書いてあろうかと思いますが、こちらについて御説明いたします。1つは資料 1です。先ほども柴田先生の資料を御紹介しましたが、実は先生のプレゼンには非公表情報というのが入っております。したがいまして、資料 1に関しましては、非公表資料も全部含めた資料 1がこちらにつづってあります。こちらは厳重注意という形になっておりますので、後ほど回収させていただきます。

それから、赤の仕切り紙のあとに参考資料 1ということで、こちら

も厳重注意扱いになりますが、これまでの当専門部会での議事録集です。公表にあたっては、マスキングをしたものがホームページで公表されておりますが、本日の資料は、マスキングをしている部分もオーブンにしたものを配布させていただいております。これらの資料は、いずれも厳重注意という取扱いにさせていただきます。右側に氏名を書く所がありますので、そこを御記入いただいた上で、会議終了時に回収させていただきたいと思っています。先ほどクリップで留めてあったばらの資料はお持ち帰りいただいて結構ですが、こちらのファイルだけ、あとで回収させていただくという取扱いになります。

そのほか、名簿の一枚紙があろうかと思います。資料は以上ですが、過不足等がございましたらお申し出いただければと思います。よろしいでしょうか。では以上です。

<議題 1：造腫瘍性について>

○中畠部会長 さて、本日の専門部会の進め方ですが、議題 1として、引き続き「造腫瘍性」について議論を行いまして、これまでの議論を踏まえて整理をしていきたいと思います。その後、もし時間がありましたら、議題 2として「その他」の議題に移りたいと考えております。

それでは議題 1、造腫瘍性について議論を進めたいと思います。本日は、先ほど御紹介がありましたように、外部有識者として柴田先生

と島田先生にお越しいただいておりますので、柴田先生、島田先生の順に造腫瘍性について話題提供をいただきたいと思います。質疑の時間は、お二人のプレゼンが終わった後に時間を取りたいと思います。それでは柴田先生、よろしくお願ひいたします。

○国立がん研究センター 柴田氏 国立がん研究センターがんゲノミクス研究分野の柴田と申します。本日はこのような機会をいただきまして、ありがとうございました。私はがんのゲノムを研究している研究者ですが、本日はそういう研究者の立場として、iPS 細胞における造腫瘍性リスク評価につきまして発表したいと思います。

本日いただいた課題ですが、iPS 細胞治療における悪性腫瘍発生のリスクを genetic な点から評価して、現時点のベストサイエンスの知識の中でリスクを最小限にするにはどうしたらいいかということにつきまして意見を述べさせていただきたいと思います。

こちらに 3 点挙げさせていただきました。1 つは、iPS 細胞を作製、維持する過程で発生する de novo の somatic mutation、somatic なゲノムの変化。それから iPS を樹立する際に、それは様々な患者さんあるいは固有の方の細胞を使うのですが、そこに既に存在している germline のバリエーションの問題、それをどう評価するかというリスクの問題。3 番目に iPS 細胞を樹立・作製、また、それを更に加工していく過程で起こるゲノム不安定性の評価、といったところの 3 点

につきまして発表したいと思います。

まず最初に挙げた 2 つの問題点、つまり、iPS 細胞を作製、維持していく過程で起こる de novo の somatic mutation、あるいは既に存在している germline のバリエーションのリスクをどのように評価していくのがよいかということについて発表したいと思います。

まず、がんの発生におけるゲノム異常の意義につきまして簡単に御紹介したいと思います。がんといいますのはゲノムの病気として、我々が持っているゲノムに様々な原因で傷が入って、それが蓄積していくと発生する疾患であることが知られています。つまり、多くの悪性腫瘍は 1 つの遺伝子異常だけで発症するのではなく、段階的に遺伝子異常が蓄積した結果として出来ているものである、というところが知られております。

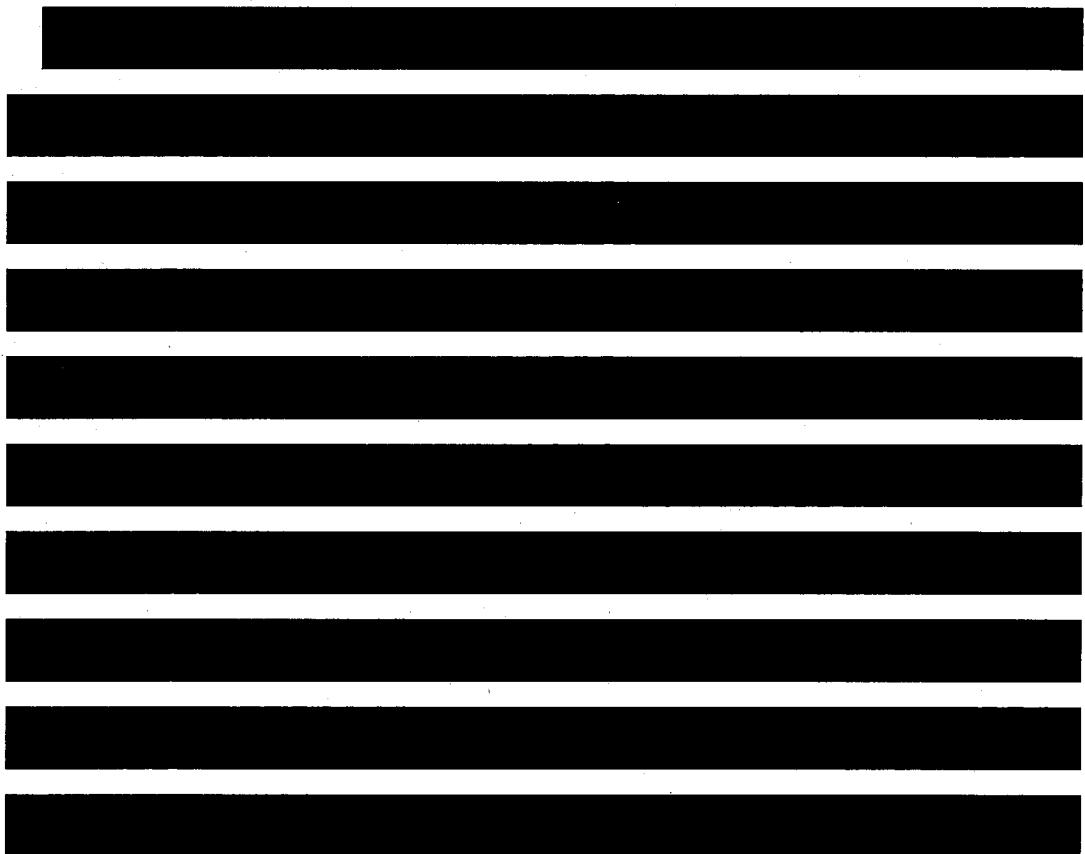
さらに、現在までにいろいろな方法で様々な腫瘍が調べられているのですが、その結果分かったことの 1 つは、それぞれの臓器がん、つまり、例えば脳とか、あるいは肺とか肝臓とか、それぞれの臓器がんで起こっているゲノム異常、遺伝子の mutation は異なっていることが分かっています。つまり、それぞれの臓器では特徴的な遺伝子異常が起こる必要があるということが知られています。その数も臓器によって異なっています。例えば子どもで起こるようながんでは遺伝子異常が少なくとも発生しますが、大人で起こるようながんは、遺伝子

異常の蓄積がより複数必要であるということが分かっています。そういった、その種類と数に加えて、おそらく順番が結構大事ではないかと考えられています。つまり、最初に起こる異常と後に起こる異常では、おそらくその意味付けが違うであろうということが考えられます。この辺が、今回の iPS 細胞をどのように評価していくかというところでとても大事なポイントではないかと考えております。こういったことがこれまでのがんのゲノムの解析から分かってきたことです。

がんで知られているゲノム異常、つまり、がんと関係あるゲノム異常を今回どのように調べていくかというところになると思うのですが、最近よく使われる、がんに起こっているゲノム異常を分類する言葉として「ドライバー変異」と「パッセンジャー変異」という概念があります。これはイギリスの Mike Stratton 博士が提唱した概念です。「ドライバー変異」というのは実際にがんの発症に関係しているゲノム異常であり、それは positive に selection、つまり、正に選択されている遺伝子変化であるということが定義されています。一方、「パッセンジャー変異」というのは正の選択を受けないものであって、腫瘍のクローナルな growth advantage には寄与しなく、がんの発生には関係ないようなゲノム異常であるということで定義しています。

どうしてこんな定義が必要になったかといいますと、最近の次世代シークエンサーの解析によって、実はがんには mutation が非常にた

くさん起こっていることが分かってきました。大人の固形腫瘍ですと、全ゲノムレベルで、約1万個以上の mutation が起こっていることが知られています。そうしますと、その中でどれが大事で、どれが大事でないかというのを我々は考えていかなくてはいけない。そういうときこういった概念を使って実際にがんの遺伝子変異を分類していく必要があります。がんに起こっている異常の中には、実際にがんの中で重要であって正に選択されている遺伝子と、そうではなくて、たまたまゲノム不安定性によって獲得されたけれども、それがそのまま残っている「パッセンジャー変異」と言われるものが混ざっているものである、という概念でがんのゲノム異常を整理してきたわけです。





こういった現状を見ますと、ドライバー変異やパッセンジャー変異という定義をもって今回の iPS 細胞におけるゲノムの異常を調べるときの基準とするのは余りにも曖昧すぎるのでないかというのが私の考えです。つまり、このような低頻度の異常はどのようながんにもたくさん起こっていますので、あるがんで mutation が 1 例でもあればその遺伝子は危険だと考えるというのは、それは敷居が高いと考えます。もしそのような基準を置きますと、かなりたくさんの遺伝子を調べる必要があり、なおかつ、その中で 1 つでも遺伝子異常が起こっていればその細胞は捨てるということになりますので、この基準で分けるのはちょっと厳しいのかなというのが私の考えです。

それではどうするかというところですが、こういった「ドライバー変異」「パッセンジャー変異」が起こる少し前の概念として、Gate keeper と Care taker というがん関連遺伝子の定義があります。これ

までの研究からがんを高頻度で発症する家系が知られているのですが、こういったがん多発家系の原因遺伝子を調べていったところ、2つの大きな機能ががんを多発する原因遺伝子として重要であることが分かりました。

1つは Gate keeper と言われるものです。これは、細胞の増殖や生存や分化をコントロールする重要なマスター遺伝子であって、その遺伝子に異常が起こると mutation を起こす細胞が増えることになります。つまり、mutation を起こした細胞がそこに維持されて、その細胞が増える、あるいは、その細胞が死がないといったことによって次の遺伝子異常の蓄積に寄与するということで、発がんにとってはとても大事であるという遺伝子が Gate keeper と呼ばれています。

もう1つは Care taker というものです。これは、正にゲノムの不安定性を誘導する遺伝子です。こういう遺伝子に異常がありますとゲノムにどんどん mutation が入る、あるいは、ゲノムの構造がどんどんおかしくなってくるというようなものです。こういったものは、がんにおけるゲノム異常が蓄積していく過程で必要なものであります。こういった2つの遺伝子はがんが発生して多段階にゲノム異常を蓄積していくためには必要なものである、と考えられています。こういった、Gate keeper あるいは Care taker というのはおそらく多段階発がんの早期で起こっており、こういった異常はがんが発症する過程で

ゲノム異常を蓄積するのに必要な条件であるということが考えられます。これらの遺伝子は発がんリスクに直結し、実際に家族内でがんを多発させる家系となっています。したがってこれらはとても大事な遺伝子であって、正に調べなくてはいけないと考えます。

こちらに私の考えを述べたのですが、iPS 細胞において、genetic にその発がんリスクを評価する上では、おそらくリスクに応じてそれぞれの遺伝子を分類して、それぞれのグループで検索していくのがいいのではないかと考えます。私が名付けた「Tier1」と言われている最も大事なものは発がんリスクが高いことが既に知られている遺伝子、つまり、家族性がんの原因遺伝子です。これは必ず調べなくてはいけない。これはおそらく発がんの過程で早期に起こっているゲノム異常であって、発がんに非常に高いリスクを与えますから、この遺伝子は必ず調べなくてはいけないと考えます。

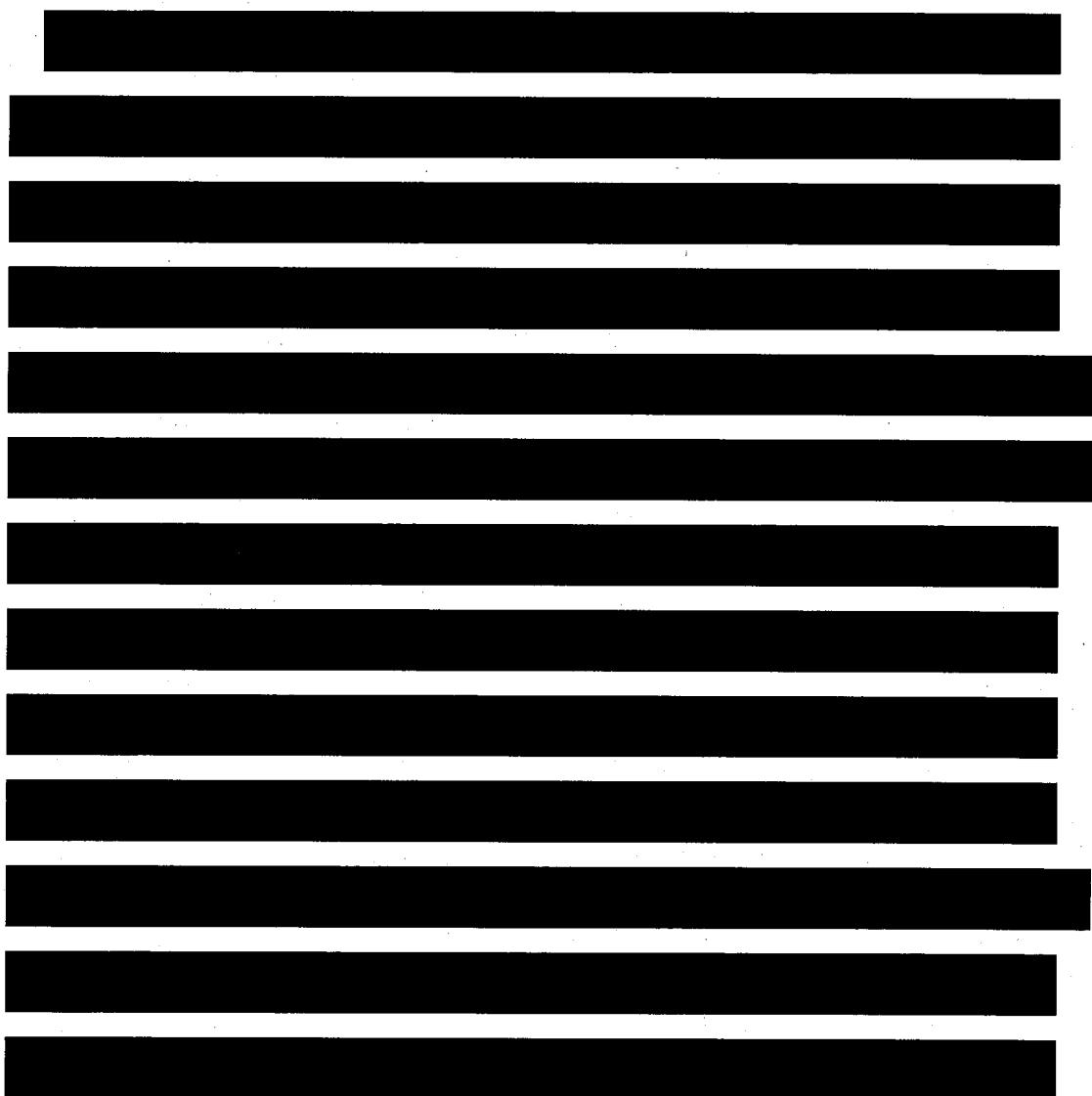
Tier2 というのは、これは少し曖昧なのですが、統計的にもかなりの確率でおそらく各臓器がんのトップ 10 かトップ 20 に入るものです。これは、先ほど低頻度のものと言いましたが、その中でも比較的頻度が高いものです。これはやはり重要ではないかと考えます。例えば Ras とか EGFR とか、よく知られているようながん遺伝子です。これらは家族性の原因遺伝子となっていませんが、多くのがんで頻度が高いことが知られています。こういった遺伝子はやはり調べる必要があ

ると考えます。

それに比べて、Tier3 といってデータベース上ではがん関連遺伝子として知られる、つまり、何らかのがんを調べると、mutation がありましたというデータはあるのですが、その意義がはっきりしないような遺伝子があります。こちらに「long tail 部分」と書きましたが、非常に低頻度な部分ですね、こういったものは現時点では対象としなくてもよいのではないかと思います。おそらく、これから研究が進みますとこういった遺伝子の中から、今後、重要性が分かつてきたものがあれば Tier2 に格上げするというようなことでリスクをコントロールしていくのがよいのではないかと考えます。

どの遺伝子を調べるかというところは一応こんな形なのですが、では、次にどのぐらい徹底して調べるべきかという点について述べます。これに関しましては、やはり多様性の問題というのがとても大事だと思っています。がんは多段階発がんをたどり、ゲノム異常が順番に蓄積していくって発生するとお話しましたが、実はそういった過程で、1つの腫瘍の中には複数の、サブクローンといいますか、多段階発がんの中でこれから expand していくこうというマイナーなクローンが混在しているわけです。したがって1つの腫瘍の中に多様な、それぞれ、ゲノム異常が異なったようなクローンが共存していることが考えられます。また、こういった腫瘍内の多様性、heterogeneity と呼ばれます。

すが、といったものは実はその細胞が置かれた環境に応じて淘汰され
て、その中で選択されたクローニングが増えていき、更に環境が変われば
またそのクローニングは変化していくということが知られております。つ
まり、必ずしも全ての症例が同じ蓄積過程をたどるのではなくて、そ
れぞれの症例においてその細胞はどんな環境、例えば抗がん剤治療で
すとか、あるいは低酸素状態とか、そういう様々な環境にさらされた
かによって非常に変化していくということが知られております。



[REDACTED]

これをどのように調べるかですが、やはり Tier1、Tier2 に関しては非常にマイナーな population、つまり、約 5% ぐらいまではきちんとその遺伝子に異常がないことを確認する必要があるだろうと思います。それにはやはり最近の次世代シーケンサーの技術を使って Ultla deep にシーケンスをして、より詳細に調べる必要があると考えます。

[REDACTED] では、どのぐらいシーク

エンスをすればいいかということですが、これは、シミュレーション
も必要ですし、ある程度実際のサンプルを使って基準を決めていく必
要があると思います。なかなか、単純に何掛けがいいなどというのは
難しいので、やはり実際の検体を使って調べていく必要があると思う
のです。1万掛けといいますのは、それぞれの塩基について平均1万
回はシークエンスをすることを意味していますが、少なくともこれぐ
らいは必要だろうと思います。といいますのは、約1%のこういった
マイナーなクローンがその細胞の中にあって、その1%のマイナーク
ローンの中に非常に重要な遺伝子があるとすると、それを1万回読め
ば、1万回のうち100回ぐらいはそういったmutationが見つけられ
ることになります。100回ぐらいmutationが見つけられれば次世代
シークエンサーのエラーとは区別できて、これは現実に存在する
mutationということが言えると思いますので、それぐらいの深さが
必要だと考えます。もちろん実際には、シミュレーションあるいは実
際の検体を使って条件を検討していく必要があると思います。

これまでお話したのは mutationについてですが、次に染色体の構
造異常について少し説明します。がんで起こる染色体の構造異常であ
る Inversion, duplicationとか translocationといった異常も次世

代シーケンサーの技術によって最近では網羅的に分かってきました。

Paired-end sequence と呼ばれる方法で、DNA の両端をシーケンスすることによって、そのシーケンス配列の配列情報のみならず、2つのシーケンスの距離と方向が分かります。その距離と方向の情報を使いますと、染色体の逆位とか転座といったことが分かります。

これは肝臓がんの全ゲノム解読を行ったデータです。この図は、染色体 1 番から、1、2、3、4、X、Y とサークル状に並べたものです。この中にある線が染色体内あるいは染色体外の rearrangement を示しています。この紫は、X 染色体と 11 番染色体に転座があったということを示しています。ほかの印は、染色体の中で構造異常が起こっていることを示しています。このように全ゲノム解読を行うと、こういった染色体レベルでの構造異常も検出できます。

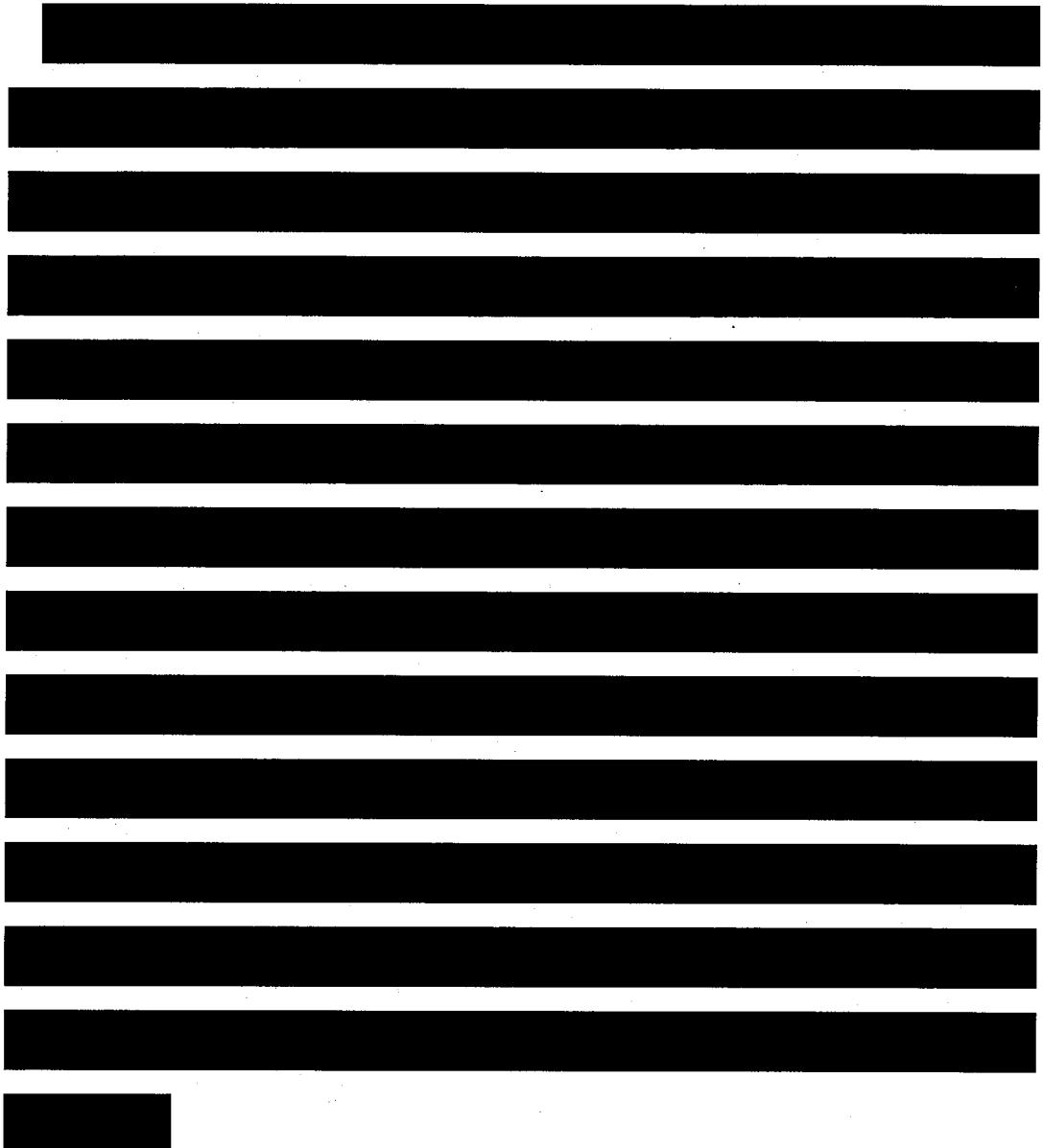
実際、どんなものが検出されるかという一例です。この症例では、X 染色体の中に非常に小さな Inversion が見つかりました。隣り合った遺伝子の最後のエクソンがこの Inversion によって入れ替わるというものです。これによってインフレームの融合遺伝子が作製されまして、それが実は機能を持っていることも分かりました。つまり、こういう非常に小さな染色体レベルの欠失あるいは逆位といったものも、実は発がんに当然寄与するものもあるということが考えられます。したがって、可能ならば、こういった構造異常についてもやはり除外し

ておく必要があると思います。特に白血病とか、あるいはサルコーマといった子どもに起こるがん、つまり、非常に遺伝子異常が少なくても発症するようながんでは転座がとても大事な「ドライバー変異」になっています。転座といったような染色体異常をきちんと除外するためには、やはり構造異常についても調べる必要があると思います。

karyotyping で行うとなかなかどこに異常があるかきちんと検出するのが困難ですので、やはりここも次世代シークエンサーを使って調べておく必要があると思います。ただ、現在、次世代シークエンサーで全ゲノム解読を行うと、平均で大体×30 回ぐらい読むのが一般的なのですが、構造異常だけを調べるのであれば、それよりやや薄く、×10 回ぐらいの low depth whole genome sequencing でも検出できることは知られています。これはコストとの兼ね合いでしょうけれども、こういった low depth whole genome sequencing を行って、structure alternation についても除外しておく必要があると考えます。

こういったときにどんなシークエンサーが要るかですが、もちろんこれはどのぐらいのサンプル数をどのぐらいのスピードでシークエンスするかによって変わってきます。よく使われている大型のシークエンサーに加えて、最近データ量は少ないですが、より速くできるシークエンサーも出てきていますので、こういったところは、それぞれの

研究あるいは検査体制の量などに応じて選択していく必要があると思
います。



最後に、ゲノム不安定性の評価というところにつきまして簡単に、
1枚だけスライドを用意いたしました。iPS細胞が作製されて、樹立、
維持されていく過程でどのぐらいの頻度で mutation が蓄積していく
かということを調べるのはとても大事だと思います。今後そのデータ

を元にリスクを評価していくということになると思いますので、iPS細胞でどのぐらいゲノム不安定性が起こっているかというところをきちんと調べていくことはとても大事だと思っております。

これは、例えば Coding 領域に 10 個ぐらいのアミノ酸を変えるような mutation があったという場合を考えます。アミノ酸を変える遺伝子異常変異に加えてアミノ酸を変えない mutation も起こっているわけです。その数がどのぐらいあるかはサンプルをそれぞれ調べてみないと分かりませんが、例えばアミノ酸を変えないものが 20 個ぐらいあるとすると、Coding 領域はゲノム全体の 1% ですので、ゲノム全体ですと、約 3,000 個の mutation が起こっているだろうと積算できます。すると 1Mb 当たり 1 個程度となります。

1Mb 当たり 1 個程度の mutation の変異率はどのぐらいのものかといいますと、こちらに様々ながんにおける変異率について、これまで調べた結果を示しています。縦軸が 1Mb 当たりの mutation の数になっています。1Mb 当たり 1 個という数はこの赤線になります。これはどのぐらいかというと、大体、乳がんとか、肺がんとか、その辺のがんで見られる mutation と同じぐらいの頻度であります。したがって、比較的高いというようなことになります。子どもに起るがんは、もう少し頻度が少ないのでこの辺になります。あと、たばこを吸う、肺がんとか、その辺は高いのですが、乳がんとか肺がんといった比較的、

がんでも大体中間ぐらいの頻度であることが分かります。

ただ、こういった mutation の頻度をきちんと評価するためにはやはり全ゲノムで調べる必要があります。エクソンはどうしても変異の選択が起こっている可能性が高い、つまり、特定の mutation が選ばれている可能性があるので、バイアスがかかっていると考えられます。したがってやはり全ゲノム解読を行って、実際に幾つあるのかということをきちんと確定していって、それで傾向を調べていくのがいいと思うのです。ただしどうしてもコストがかかるということであれば、あくまで傾向をつかむための代用として、全エクソンぐらいのデータを使って、大体どのぐらいの変異率なのかということをきちんと評価していくことは今後、その品質を評価していく上ではとても大事なものと考えます。発表は以上です。

○中畠部会長 引き続き、島田先生にお願いしたいと思います。

○日本医科大学 島田氏 私は遺伝子治療全般の話をしようと思っています。直接 iPS の造腫瘍性の問題というわけではないのですが、御存じのように、遺伝子治療は白血病が起きたという苦い経験を持っていて、どうしてそういうことが起こったのか理解しておくのは重要だと思います。今日お話しようと思うのは、遺伝子治療はそういう白血病の問題もあって、日本では余り人気がないのですが、実際、世界的には「遺伝子治療、カムバック」といって結構盛り上がっているのです。その辺の現

状も、ちょっとお話ししようと思います。後半はウイルスベクターの安全性、今、我々が一番問題にしている部分のお話をしたいと思います。

遺伝子治療を言葉で定義するのは簡単ではないのですが、20年前に私が日本のガイドラインを作ったときに決めたのがこういうことで、「疾病の治療目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与すること」を一応、日本では遺伝子治療ということにしていました。もともとは、遺伝子異常を修復することを目的にしていたわけですが、遺伝子を導入して行う治療全体を遺伝子治療ということに今はなっています。方法としては2つあって、直接、遺伝子を打つという方法もありますし、もう1つは遺伝子を導入した細胞、自分の細胞をまず採ってきて、それに遺伝子を導入して、それを戻すという方法でも行われています。

これが遺伝子治療の歴史なのですが、1970年代に組換えDNAの技術が出てきて、危険の可能性があるということで、Asilomarの会議という有名な規制会議が行われていたのですが、そういう強い規制が行われていたときに、1980年にUCLAのMartin Clineがわざわざイスラエルまで行って遺伝子治療をやったという事件がありました。これは大きな社会的問題になって、Martin Clineはこれで失脚してしまうのですが、その後アメリカでは、遺伝子治療の倫理的な問題が議論されて、ここで言われたのが、その当時問題になっていたフラン

ケンシュタインモンスターを作るような危険な技術であるというのは、生殖細胞の遺伝的改変を行ったときに、そういう心配がある。しかし、体細胞に対する遺伝子治療の場合には、そういうことは問題ないのではないかということがこの米国の生命倫理委員会で提起されて、これは世界中で納得されることになり、それ以後アメリカを中心に遺伝子治療の研究が大変盛んに行われるようになったわけです。

1990 年に世界最初の先天性免疫不全症の遺伝子治療がアメリカで行われました。その後、遺伝病だけではなくて、がんの遺伝子治療が開始され、世界的に遺伝子治療が非常に盛んに行われたわけです。

1995 年には、日本でも先天性免疫不全症の治療が行われています。この当時の遺伝子治療の評価は、最初心配していたような副作用も余り起こらなかったわけです。ただ、治療効果もはっきりしないということで、安全ではあるけれども、大して効かないということが遺伝子治療の評価だったのです。

ところが、1999 年になって状況が大きく変わりました。初めて遺伝子治療が原因で患者が亡くなるという Gelsinger 事件がアメリカで起きました。これは非常に大きな問題になりました。これは遺伝子治療の問題よりも、実は臨床研究全般の問題として、アメリカでは非常に大きく取り上げられたのです。この事件をきっかけにして、アメリカではインフォームド・コンセントのレベルがものすごく上が

ったということがありますし、この事件がきっかけで、今、日本でも言われている COI が非常に大きな問題になったのです。このときの遺伝子治療がうまくいけば、この責任者だった James Wilson とかベンシルバニア大学が非常に多額の利益を受けるようなことになっていたということが後で分かって、これが大きな問題になったのです。これはバッドニュースだったのです。

この年の終わりに、今度はフランスで先天性免疫不全症の治療が非常にうまくいったかもしれないというグッドニュースが入ってきたわけです。この遺伝子治療の成功によって人類は初めて遺伝病を克服したと言われたのですが、この 3 年後に、御存じのようにここで治療を受けた子どもたちが次々に白血病を発症するということがありまして、これで遺伝子治療はしばらく停滞することになったわけです。しかしながら、ヨーロッパを中心にこの数年間、次々と新しい遺伝子治療の成功例が報告されて、「遺伝子治療、カムバック」ということが言われています。

これが全体の流れで、1980 年から 2009 年、最近までです。最初の遺伝子治療が 1990 年に行われましたが、その後、多くの遺伝子治療が、次から次へと各国で行われたという時期です。その後、この Gelsinger 事件とか白血病の問題があって、しばらく停滞していましたが、最近次から次へとグッドニュースがあるということです。

1990 年に最初の遺伝子治療が行われたときに、私は NIH でポスドクをしていました。このグループではなかったのですが、遺伝子治療の最初の臨床研究が始まるときにたまたまそこに居合わせたのですが、このときにアメリカでも遺伝子治療の安全性ということがものすごく議論されていたのです。ちょうど日本で iPS をこれから始めるというときの今の議論と似たようなことがあったわけです。

ただ、ここで 1 つ大きな違いというか、アメリカのこの当時の NIH で行われた議論は、RAC(組換え DNA 諮問委員会)とか遺伝子治療のサブコミッティがあったのですが、これは完全に公開で行われたのです。

そこで問題になった点が 3 つあります。1 つはレトロウイルスを最初にヒトに使ったわけですが、このウイルスベクターの安全性ということです。その当時一番問題になったのは、ウイルスベクターというのはウイルスを改変して、増殖性をなくして遺伝子を組み込むことに改変したということなのです。ただ、これがある頻度で必ず増殖性ウイルスが出現してしまうということがあって、これをどのように評価するかということが問題になりました。そのためには、非常にいろいろな技術的改良が行われたわけですが、完全に増殖性ウイルスをゼロにすることは難しいということで、増殖性ウイルスをいかに検出するかという検出法の開発が行われたわけです。もう 1 つは、サルでの安全性の確認が行われて、ここで一応 OK を出したということがあります。

ます。

もう 1 つは挿入変異の問題が当時も問題になっていたのです。ただ、この当時行われていた動物実験では、ウイルスベクターが染色体に入り込むことによって、特別な問題は起きていなかったのです。これは理論的には問題ではあるけれども、おそらく数としては非常にまれな事象であろうということで OK が出たわけですが、御存じのように 2002 年になって実際にこれが原因でヒトに白血病を起こしたということが明らかになったわけです。

有効性の問題が非常に大きくて、当時これは免疫不全症に対する遺伝子治療をやろうとしたわけですが、骨髄幹細胞でどうしてもやりたいというのが我々の希望だったわけですが、当時はどうしてもこれがうまくいかないということで、やむを得ず末梢の T リンパ球に遺伝子導入することに変えたということがあります。免疫不全症が最初に遺伝子治療で対象になった理由の一つに、一部のリンパ球を治療できれば、growth advantage があるだろうということが理論的に考えられていたのですが、これが動物実験で実証されたことも非常に大きかったわけです。

倫理的な問題が大きな議論になったわけですが、今はこういう考えが日本でも定着していますが、その当時、倫理性の問題で Last hope というのが言われていて、ほかに治療法がないような疾患であれば、

こういう実験的な治療も許されるだろうということが、ここで議論されました。これも当時出てきた考えですが、リスク・アンド・ベネフィットという相対的な評価をすべきであると。絶対的なりスクとか絶対的な有効性というので評価するのではなくて、相対比で考えるべきだということがここで議論されたわけです。

そういう中で、最初は子どもの免疫不全症の遺伝子治療をやろうと言う提案だったわけですが、倫理性の点でやはり子どもでは許可できないということで、最初には末期がんの患者に対する遺伝子標識という形でウイルスベクターをヒトに使うということで、最初の遺伝子治療が認可されたわけです。

これが当時、問題になっていたウイルスベクターなのですが、レトロウイルスの構造は基本的にこういう形なのですが、これをこの間にウイルスの発現、それから Packaging を行う部分を除いた真ん中に目的の遺伝子を入れたということで、最初に作られたのがこの第1世代のウイルスベクターなのです。これは作製段階でどうしても Homologous recombination が起こって、ある頻度で、また増殖性のウイルスが作られてしまうということで、これをどうやって少なくするかということでいろいろな研究が行われたわけです。いろいろな改良が加えられて、第2世代が作られて、これでかなり増殖性ウイルスの発現は低くなつたのですが、しかしながらそれでもゼロにはならな

かった。今、臨床で使われているのは第3世代と言われていて、発現ユニットをさらに分けることによって、元の増殖性ができるにしても3回以上の recombination が起こらなくてはいけないということで、今臨床で使っているものです。ただ、これでも細かく調べるとゼロにはなっていないのです。

それで分かったことは、実はゲノムの recombination は実際にはものすごい頻度で起こっていて、ほとんど数ベースの Homology があるだけで recombination が起こり得るのだと。しかも、Homologous ではない nonhomologous recombination もかなり起こっていて、調べてみると、実際には何でこういう形のものが作られたのか分からないようなものも出てきている、ということが分かっているのです。だから、こういった組換えで作れるものをゼロにすることはできないと、今我々は考えていて、それよりも、できるだけ努力はすべきだけれども、組換えが起こったか起こらないかをどうやってチェックするかというのが重要だと考えているのです。

世界最初の遺伝子治療がこういう形で、リンパ球に対する繰り返し投与ということで行われました。これも倫理的な問題で、その当時開発された酵素補充療法を同時に行うということで行われたわけです。

これがフランスで行われた 1999 年の治験で、ここで初めて造血幹細胞に対する治療が行われて、これは 1 回だけの治療で、非常にうま

くいったと。10人の患者のうち9人でうまくいったということで大変騒がれたわけですが、その3年後に次々に白血病が発症したわけです。

これで一時、停滞していたのですが、全体的な流れからすると、遺伝子治療は2009年に副腎白質ジストロフィーという神經の脱髓疾患なのですが、これもミゼラブルの遺伝性の疾患で、これに対する遺伝子治療が非常にうまくいったと。これは治したわけではないのですが、進行を止めることができたということで、「Gene Therapy, come back」ということで取り上げられています。

その他にもいろいろな疾患で遺伝子治療がうまくいったという報告はあるのですが、一番インパクトがあるのは血友病に対する遺伝子治療です。去年発表されたのですが、血友病は遺伝子治療の対象としては昔から考えられていた疾患なのですが、なかなかうまく治療ができなかったのです。ここでAAVという新しいウイルスベクターを患者に投与するということで、6人の患者に行われたのです。血友病は今、治療法としては凝固因子の定期的な投与が行われているわけですが、この治療を受けた6人中4人で凝固因子の投与が必要なくなったと。後の2人についても、回数が非常に減ったということで、非常にうまくいったということになっています。しかも、血友病の治療を遺伝子治療で行うことで、年間の医療費が10分の1以下に減らすことがで

きるということで、今大変期待されているわけです。

多くの遺伝子治療で治療がうまくいってということで、アメリカでは米国の遺伝子治療学会がここ数年以内には「Target 10」というのですが、10個の疾患に対する遺伝子治療が実用化できるということを言っています。大手の製薬企業も遺伝子治療に参入してきています。遺伝子治療のウイルスベクターが初めて治験薬としてヨーロッパで承認されたということも起こっています。

一番問題になったのはウイルスベクターの安全性ということなのでですが、ここでここまで問題になっている治療に使われた中で、92人でレトロウイルスを用いた治療が行われています。そのうち11人で白血病が発症したということが問題になっているのですが、実際これで亡くなったのは1人だけで、白血病についても治療がうまくいっていて、結果としては治療ができていると。遺伝病も治療できているし、白血病も治療できたという評価なのです。

この白血病に対して、今、正にいろいろな検討が行われているのですが、1つにはレトロウイルスが染色体に入ったということなのですが、これはLM02というがん遺伝子がレトロウイルスによって活性化したことが明らかになっていますが、実はこれだけではなくてセカンドヒットが非常に重要であるということが言われています。LM02は、ほかの遺伝子治療でも活性化されている例があるのですが、必ずしも

これだけでは白血病にはなっていないのです。ですから、必ずセカンドヒットが重要であるということがあります。

幾つかのことが明らかになりました。1つは、レトロウイルスベクターがランダムに組み込まれるのではないかということが言われていたのですが、実際には、そういうことではなくて、遺伝子、特にがん遺伝子関係の遺伝子の転写開始地点の近傍に入りやすい。そういう意味では危険性が高いということがはっきり分かってきています。

レトロウイルスがプロモーターの近傍に挿入されることによって、oncogene が直接活性化されるということが分かっています。そのほかにも、ウイルスベクターが遺伝子の中に入ることによって、異常な mRNA やタンパク質が作られるようになり、これが原因で細胞の異常増殖が起こっているということも最近言われています。最近の面白い例では、マイクロ RNA の Target sequence を読まないようなキメラ遺伝子を作ってしまって、そのために細胞が増殖しているという例も報告されています。

挿入変異を回避できるかということで、今考えられているのは、ベクターを改良して周囲の遺伝子発現に影響を与えないようにする研究が行われています。それから、ベクターをいかに安全な場所に組み込むかということも、今、研究されています。もう1つ、iPS を使った遺伝子治療が検討されています。レトロウイルスのベクターの改良は、

今、非常に盛んに行われていて、技術的には非常に安全なベクターができていると思われています。

Homologous recombinationとかベクターの組込みが、今、iPSでも問題になっていますが、これは例えばプラスミドを入れただけでも組込みは起こりますし、御存じのように、アデノウイルスは組み込まれないベクターとして使われているわけですが、実際にはアデノウイルスは細胞に投与すると、かなりの頻度で組み込まれることが分かっています。ある条件で感染実験をやると、アデノウイルスを入れた細胞のうちの 5% ぐらいでウイルスゲノムが組み込まれていることが分かります。

もう 1 つ言われているのは、ゲノムの Safe harbors、安全な場所を探してそういう所にゲノムを組み込もうということを今検討しています。いろいろな遺伝子から離れた部分、例えば oncogene からは 300Kb 以上離れた部分での組込みが必要だろうということ、こういう Safe harbors という考えも今検討されています。

今、遺伝子治療ではこういう技術的な改良とともに、将来的に iPS で遺伝子治療ができるば、こういう遺伝子治療が可能になるのではないかと考えられています。これは iPS を作りますね。この段階で遺伝子の修復をするわけですが、先ほど言ったように Homologous recombination とか、こういった Target integration の頻度はもの

すごく低いわけです。ただ、iPSでやる場合には、これはクローンとして扱えるわけですから、これによって遺伝子修復ができた、あるいは安全な場所に組み込まれた細胞をセレクションすることができるわけですから、これを使って、例えば Hematopoietic stem cell のようなものに分化させることができれば、これは非常に安全な遺伝子治療ということができるだろうと考えています。

○中畠部会長 ありがとうございました。質疑応答に移りたいと思います。最初に柴田先生のプレゼンに対する御質問等ありましたら、よろしくお願ひします。評価すべき遺伝子として Tier1 と Tier2 の 2 つは必ずチェックをする必要があるというプレゼンだったと思うのですが、Tier1 に分類される遺伝子としては、実際には現時点では幾つで、Tier2 は幾つになるのでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 その数字は正確に出していませんが、おそらく Tier1 に入るものは、せいぜい 20 個ぐらいかと思います。Tier2 は、これは少し定義が曖昧で、いろいろながんの中でトップ 10 に入るぐらいということになりますと、がん種が増えれば増えるほど少し数も増えますが、100 から 200 ぐらいの間ぐらいになるかなというところです。したがって、合わせて 200 ぐらいで大体含められるのではないかという印象です。

○中畠部会長 現時点では 200 のリスクの高い遺伝子を、一応チェックをする必要

があるということですか。

○国立がん研究センター 柴田氏 はい。少なくとも Tier1 は必ず調べる必要があると思っていますし、Tier2 は、EGFR とか KRAS といった遺伝子で、がんでは、例えば肺がんや膵がんでは、最初の異常として知られているものです。これが原因となる遺伝的ながん家系がないので、Tier1 からは落ちてしまうのですが、それらは家系とは別に特定のがん種で非常に高頻度に起こっているので、それを落とすというのはちょっと危険かなと思いましたし、やはりそこまで含めて 200 個ぐらいは必要かと思います。

○中畠部会長 その点、いかがでしょうか。

○佐藤陽治臨時委員 大体 200 個ぐらいというお話で、Tier1 だと 20 個ぐらいというお話だったのですが、そうなると、例えば感度などのことを考えると、PCR のようなメソッドで増幅したほうがいいとかいうことはあるのですか。Ultra deep でいくよりも、別の核酸を増幅するような NAT の系でいくという方法はあるのでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 領域を絞り込んだ場合、絞り込んだものを最後は次世代シーケンサーに入れるのですが、その過程は確かに先生がおっしゃるように PCR をかけてエクソンだけを増幅して入れる場合もあります。あるいは、キャップチャードとて、遺伝子を mRNA のような bait で hybridize ってきて、濃縮するという方法もあります。

どちらがいいかというところは難しいのですが、PCRの場合、どうしてもエラーが起こる可能性があると思います。もちろん、キャプチャーでも実はPCRをかけるのですが、PCRをかける回数が少ないというところがありまして、その辺は次世代シークエンサーにもっていくまでのエラーをどのようにコントロールするかというところにかなり依存すると思います。

○中畠部会長 ほかにはいかがでしょうか。高橋先生、何か意見はありますか。

○高橋委員 質問があるのですが、mutationをシークエンスする際は1万リードぐらいが望ましいというお話なのですが、一方で構造の変化を見るときはすごく薄いシークエンスでいいと先ほど御説明いただきまして、それは前提として構造変化がドライビングであるということなのでしょうか。薄いシークエンスだと、マイナーな細胞の構造変化は当然見えないような気がしたのですけれども。

○国立がん研究センター 柴田氏 おっしゃるとおりですね。それは先生がおっしゃるように、マイナーなクローンに起こっている構造異常は、今回見落とす可能性があります。それを見るために、やはり全ゲノムでディープに読む必要があるけれども、それは現時点ではコスト的にまだそこまでシークエンサーのコストが下がっていないところで、現実的に難しいだろうというところで除外しました。でも、確かに先生がおっしゃるように、今回私が提案した方法でやりますと、マイナーな

クローンに残っている染色体構造異常を見逃す可能性、リスクはあります。したがって、そういうものがもしドライバー異常であれば、それが見落とされる可能性は確かにあります。

○高橋委員 すごく大事なことだというのはよく分かっているので、何かほかの代わりとなる方法は先生、御存じないでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 染色体構造異常を全ゲノムレベルで検出するのには、やはり今のところ全ゲノムシークエンスが少なくとも必要です。あるいはちょっとモダリティが変わりますが、RNA シークエンスをして、融合遺伝子ができているかどうかを見ることが考えられます。つまり、多くのリアレンジメントは、起こったとしても蛋白質を作らないような、無駄な意味のない異常なのですが、中に融合遺伝子、つまり白血病とかを起こすような、特にインフレームに融合して、それが発がん性を付与することが知られています。全ゲノム解読よりもコストが低いので、RNA をシークエンスして融合遺伝子だけを調べるという方法はあるかもしれません。

○高橋委員 そういう場合は、材料としての iPS 細胞で RNA シークエンスするというよりも、実際に医療に使う分化させた後の細胞でシークエンスしたほうがよろしいのでしょうか。

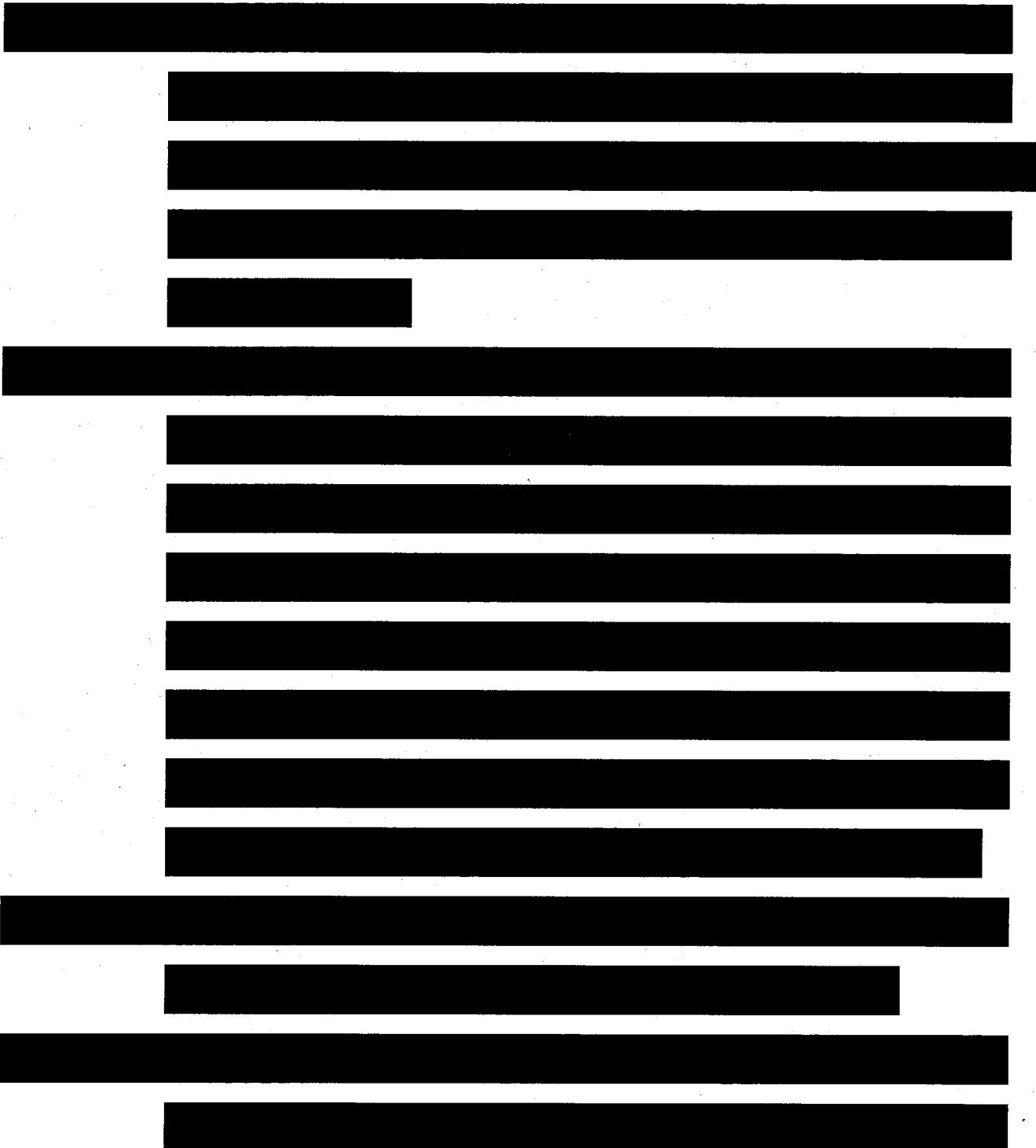
○国立がん研究センター 柴田氏 そうですね。使う時点での品質管理のところなので、各ステップで調べていく必要があると思います。見るべきもの

は発現量とかではなく、要するにキメラ遺伝子があるかないかというところですので、先ほどのペアエンドシークエンスを RNA で行って、2 つのリードが違った遺伝子にマッピングされるようなものが果たしてあるかないかということで、スクリーニングをかけることができると思います。

○中畠部会長 前々回、3 回前ですか、間野先生からプレゼンをいただいて、一応チェックをしたほうがいい遺伝子という形で、先生にもお渡しましたかと思うのですが、『Cancer Research』で報告された 2012 年のがん遺伝子とがん抑制遺伝子と、最低あればチェックする必要があるということだったのです。先生の今日のプレゼンで、先ほどの Tier1 と Tier2 の中で、おそらく先生の中に入っている遺伝子と、あるいは入っていない遺伝子があると思うのですが、その辺についての先生の考え方はいかがでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 正確に両者を比較していませんが、おそらく多くの部分はオーバーラップしていて、少しそれぞれのリストでのみ選ばれている遺伝子があるかと思います。その辺は、もちろん調べれば調べるほどいいのですが、あとはコストとの兼ね合いになるかと思います。Tier2 も厳密に今回定義したわけではなく、トップ 10 ぐらいであればどうかというところです。その辺はリストを作るところで、また専門家で議論していくのがいいのではないでしょうか。言いたか

ったことは、これまでがんゲノムをシークエンスして分かった遺伝子を全部調べるのではなくて、優先順位を付けて層別化して調べるべきであるというところです。



○中畠部会長 先ほどの Tier1 と Tier2 のリストを先生のほうで挙げていただいて、それを例えば最後のまとめのときに表として付けるということは何か可能でしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 それは可能です。

○末盛委員 がんに関連した遺伝子をスクリーニングといいますか、検査するということですが、がん抑制系の遺伝子ですね。抑制をするほうの遺伝子を調べると、あとがん遺伝子の活性化型ですと解析のしかたが違ってくるのかなと。抑制型であればエクソンを全部調べないとならないし、活性型で主に悪影響があるだろうということであれば、特定のポイントを調べればいいと。そういう区分けも含めてリスト化することが可能、あるいは適切であるかと。その辺りはどうですか。

○国立がん研究センター 柴田氏 それもおっしゃるとおりで、がん遺伝子の場合、つまり活性型変異の場合は、ホットスポットと言われる特定のアミノ酸に mutation が集中していることが知られていますので、コストにもよるのですが、先生がおっしゃるようにがん遺伝子の場合、そういうホットスポットのみを調べ、がん抑制遺伝子の場合はどこに mutation が起こっても、Nonsense mutation、あるいは frameshift mutation が起こればいいので、全エクソンを調べるというように、

遺伝子の機能に応じて調べる領域を変えることはもちろん可能です。

○岡野副部会長 提案でシークエンスで全ゲノムでのいろいろなパターンをお示しになっていましたが、実際にいわゆるエンハンサー領域とか制御領域での insertion、deletion をしようかというのは、ある程度関連性の高い領域というのは分かってきているのでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 それは正に今、研究が進んでいるところで、それを調べるために非常にたくさんの全ゲノムデータが必要になります。それを今、世界中で集めているところです。したがって、まだそういういった例は余りないのですが、最近 1 例、TERT といって、テロメラーゼのプロモーター領域に非常に高頻度に mutation が起こっている、somatic mutation が起こっていることが知られております。それは遺伝子の制御領域なのですが、そういったことが最近、報告されております。おそらくそういうものはまだまだあるだろうと思うのですが、それをゲノムワイドに事前の知識なしでデータドリブンに調べるために非常に大きなデータセットが必要で、それは現在進行中です。先生がおっしゃるように、そういったところまで調べる必要があるかというところは、現時点ではデータがないので言えませんが、そういうデータが出てくると、それも先ほどの Tier2 なりに加えていく必要があるのかと思います。

○中畑部会長 あと、染色体の構造異常をどういう方法で調べるかということで、

先生は一応、whole genome のシークエンスの方法を使って調べるの
が、一番しっかりと把握できるのではないかということで、御提案だつ
たと思うのです。それについては、皆さんいかがでしょうか。いろい
ろな調べ方があると思うのですが、通常の karyotype を調べたり、あ
るいは幾つかの方法があると思うのですが、それについて何かお考え
はありますか。高橋先生、今はどういう方法でやっていますか。

○高橋委員 karyotype とコピーナンバーを調べようと思っています。その 2 つだ
けです。

○中畠部会長 それについてはどうでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 karyotype の場合、どうしても小さな
rearrangement は見落とされる可能性があります。またコピーナンバ
ーは非常に大事ですので、それは是非とも調べるのがよいかと思いま
す。全ゲノム解読をやれば、同時にコピーナンバーも見られるので
が、×10 ぐらいの薄いロー・デプスシークエンスですと、コピー数
をきちんと計測するには少しデータがばらつきますので、もしコピー
数をきちんと見るのであれば、SNP アレイのようなアレイ系のコピー
数解析が必要だと思います。

○中畠部会長 何らかの方法で染色体の構造異常をチェックする必要がある。それ
はおそらく皆さん合意できると思うのですが、どういう方法がいいか
ということは今後、議論していくことになると思うのですが、という

ことでよろしいでしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 はい。

○中畠部会長 ゲノムの不安定性の評価ということで、iPS 細胞で継代を繰り返すことによりゲノムの不安定性が増すかどうかということが 1 つの議論で、樹立されて 10 継代ごとぐらいに一応チェックしたらどうかということの議論があったのです。それについて、先生は何かお考えがありますか。

○国立がん研究センター 柴田氏 やはりそういった基礎データはとても大事だと思いますし、それによってどのぐらいの頻度でこういった遺伝子を調べていくかというところに、とても大事なデータですので、そういうところをきちんと取っておくのはとても重要だと思います。

○中畠部会長 一例ごとにゲノムの不安定性があるかないかということを全部チェックするのは、結構難しい問題だと思うのですが、例えば CiRA で幾つかの iPS 細胞を使って継代を繰り返すことによるゲノムの不安定性が増すのか増さないのかという基礎的なデータを出すと。それは非常に必要なことだと思うのですが、その辺の今後の研究の進め方について、先生から何かアドバイスがありましたらお願ひします。

○国立がん研究センター 柴田氏 そういった研究はとても大事ですし、そういう基礎データは必要ですし、もしかしたらクローンによって mutation の率にばらつきが出る可能性があります。その場合、その背後にある

原因といいますか、なぜそんな違いが出るのかというところも、もしかれば、そのデータも品質管理にはとても大事だと思いますので、そういったところも含めて調べる必要があると思います。各 iPS クローンがそれぞれ同じような mutation 頻度を示すよりも、もしかしたらもっとばらつくのではないかという気がしますので、やはり幾つかのクローンについて経過を追って調べていく必要があると思います。



○中畠部会長 次に、島田先生のプレゼンに対して御質問等はありますか。遺伝子治療と iPS を使った遺伝子治療というのは別に置いて、iPS の樹立に伴う造腫瘍性のリスクについてこの会では議論しているわけです。そ

ういった観点から、iPS 細胞自身は挿入した遺伝子が、遺伝子治療の場合はそれがずっと働いて、例えば蛋白を作り続けていることが1つの治療目的ですが、iPS 細胞の場合は樹立のときには必要ですが、樹立されてしまえば、挿入した遺伝子は働かない、サイレンスをされていることのほうが iPS として非常に大事な性格になります。そこには遺伝子を、同じ導入することに対する考え方の違いは少しあるのではないかと思うのですが、先ほどの島田先生の御意見を聞いて、その辺について皆さん御意見はありますか。

○佐藤陽治臨時委員 御発表ありがとうございます。遺伝子ベクターによっては、*Homologous recombination* によって、普通は細胞質で効くようなベクターでも、例えばアデノウイルスベクターでは結構な頻度で入るという話でしたが、例えばプラスミド、AAV、アデノ、あるいはセンダイと比べていったときに、どれが一番残りにくいものなのでしょうか。

○日本医科大学 島田氏 今の話だとセンダイは DNA ではないので、おそらく残るということは考えにくいです。ただ DNA の場合はプラスミドだろうが、アデノウイルスだろうが、基本的にはかなりの頻度で組み込まれてします。ただ、これまでこういう研究はほとんど行われていないため、実は余りデータとしてはないわけです。最近、相同組み換えで遺伝子を修復するためにアデノウイルスを使ってやろうとして、やってみると、*Homologous recombination* でちゃんと入ってくれるのは少

ないのですが、全然関係ない Non Homologous でどういうメカニズムで入ったのか分からぬような断片がものすごく Chromosome の中に入ってしまっているのです。そういうことからすると、DNA を細胞の中に入れるのは、そういうリスクがあることは、例えばプラスミドだとしても、考えておくべきだと思います。

○中畠部会長 ほかにいかがでしょうか。

○岡野副部会長 iPS 細胞の治療の場合、いわゆるクローニングされて、株化されたものを使いますので、前もって調べておくことが可能かと思います。例えば、今まで我々が議論してきたのはエピゾーマル・ベクターで、高橋さんが言っているようなことです。とにかくインサーション・フリーアのクローニングを選ぼうというのは 1 つのやり方だと思います。一方、何らかの形で Homologous recombination を誘導する場合か、レスキュー実験、今言ったようなゲノムメンティングをする場合というのは Off-Target effect というのは当然あろうかと思います。いろいろな方法によっても Off-Target effect の方法はかなり違うと思います。Zinc finger などそれぞれ違うと思います。今のところ、どの方法が一番遺伝子治療の立場で推奨されているか。

○日本医科大学 島田氏 今、一番期待されているのは、遺伝子配列特異的に 2 本差切断を起こさせて、そこで起きる遺伝子修復の際に外部から遺伝子を挿入させる方法が一番研究としては行われています。ただその効率

は低いし、Off-Target ももちろんあるわけですが、iPS を対象にするのであれば、それをセレクションできるから多分将来的には可能だろうと考えています。

○岡野副部会長 セレクションすることでシーケンシングするとか、腫瘍原性を見るとか、そういうことですよね。

○中畠部会長 今もありましたように、最初はレトロウイルスベクターを使って、iPS 細胞が樹立されたわけですが、完全に integration-free にはならなくても、それに近い方法でやろうということで、今、プラスミド、エピゾーマル・ベクターを使う方向できていると思うのです。

しかし、そういった形で作られた iPS 細胞であっても、当然その中に挿入した遺伝子、あるいはその一部が入ってしまうことは絶対ないとは言えないので、そういったものをいかに排除するかということで、今まで議論があって、先生が言われたように、iPS 細胞というのは 1 つのクローンであるという考え方からすると、iPS 細胞のクローンを挿入した遺伝子、あるいはその断片であっても、それはいろいろな方法でチェックをして、そういったものが残っていないクローンをセレクトしていく方向が考えられているわけです。

そういった形でチェックをしていくことによって、iPS 細胞の遺伝子導入に伴うリスクというのはかなり軽減できるのではないかと思います。そういった方向で進めるということで、先生、それでよろしい

でしょうか。

○日本医科大学 島田氏 感度の問題はもちろんあると思いますが、それこそディープのシークエンスをきちんとやれば、それは限りなくゼロにディレクトすることはもちろん可能だと思います。

もう 1 つ、遺伝子治療で我々の経験からすると、やはりターゲットの細胞が分化した細胞かどうかというのが非常に重要だと思います。

今まで白血病を起こしたのは、幹細胞に対する遺伝子治療の結果で、例えばリンパ球に対する遺伝子導入はものすごい数をやっているのですが、全然そういうことが起こっていないわけです。明らかに oncogene の所で入っているようなクローンもあるのですが、特にそれが増殖することも T 細胞の場合にはないのです。ですから、そういう視点も一方においては重要だと思います。細胞がいかに分化しているかという点です。

○佐藤陽治臨時委員 先ほど NIH で行われた議論、3 ページの倫理性のところで遺伝病の小児から末期がんの大人の患者に変更になったのですが、若ければ若いほど細胞の増殖性が高いのでリスクがあるとか、そういう発想でなったわけではないですか。

○日本医科大学 島田氏 この議論はそういうことではなくて、要するにインフォームド・コンセントが取れる大人か子どもか、というのがここでは議論になったのです。

○佐藤陽治臨時委員 分かりました。

○中畠部会長 先ほどのリスクとベネフィットを考慮して、十分インフォームド・

コンセントを取ってやることは当然必要なわけです。今までの議論の中で、そのサイエンスでできるだけベストな方法を使って、iPSを使った実際の再生医療というのは行われるわけですが、リスクは科学的に見てもゼロとはなかなか言えないということで、限りなくゼロに近いように努力をしてやっていく。そのこと自身を十分患者さんに説明をして、しっかりインフォームド・コンセントを取って行うといった議論で今までできているわけです。そういう方向でよろしいでしょうか。先生の先ほどの倫理性ということも少し議論されましたか。

○日本医科大学 島田氏 今の時点では、逆にそれしか方法がないのではないですかね。

○佐藤陽治臨時委員 9ページの造血幹細胞遺伝子治療の所で、92人中11人に白血病が発症したのですが、死亡したのは1人だけで、大体はレスキューラーされているというお話をしたが、これは要するに何かが起こったときの対応策をしっかりと作っておくことが大事なことだと思います。現在、我が国、あるいは海外で臨床研究をするときに、事後の、何かあったときの対策を、どこまで規定として書き込めという形にはなっているのですか。

○日本医科大学 島田氏 これは当然プロトコールとしてはすごく重要な点だと思

います。最近では、日本で行われている臨床研究でもそういう議論が
行われているのだと思います。

○中畠部会長 先ほどの白血病の話は、あらかじめそういったリスクも想定してイ
ンフォームド・コンセントを取ったわけではなくて、たまたまそうい
った遺伝子治療を行った群の中から非常にたくさん白血病が出てきた
と。それもかなり、ある特定の種類の白血病が出てきたということで、
おそらく遺伝子治療を受けた患者さんが、もともと持っていた異常と、
かなりリンクした形で白血病が出てきたということで、結果的には、
そういったことで説明はつくわけですが、それは最初から想定してイ
ンフォームド・コンセントを取ったということではないわけですね。

○佐藤陽治臨時委員 今はある。

○中畠部会長 今では、できるだけ今のサイエンスでベスト、最大限の安全性を保
証するようなことをやっていくのですが、それであったとしても、リ
スクはゼロではないと。予期せぬことが起こる可能性は絶対ゼロでは
ない、ということをしっかりと患者さんに伝えることになるのではないか
かと私自身は思うのですが、反対の方がいればあれですが、いかがで
しょうか。

○日本医科大学 島田氏 遺伝子治療の場合は後から考えてみると、疾患の特性も
影響しているのです。同じような免疫不全でも、もう1つ有名な ADA
欠損症がありますが、これは30何例やっているのですが全然白血病

は起こらないのです。同じような T 細胞の異常である X-SCID と呼ばれているものでは、20 人中最終的には 5 人に白血病が発症しているわけです。これは患者細胞で欠損している分子の特性とか、発症機序の違いが影響していて、後から考えてみるとこれは納得がいくのです。この疾患はこのやり方でやると、白血病が起りやすいということが分かってきているのです。

○佐藤陽治臨時委員 これは経験がないと分からない。

○日本医科大学 島田氏 なかなかそれはそうですね。治療前の時点というのは難しいですね。

○坂本再生医療製品等審査部長 先ほど分化した細胞かどうかが大事だとおっしゃられましたが、そうしますと、遺伝子治療は分化した細胞で実施するというのが、今の世界の論調になっているのですか。

○日本医科大学 島田氏 それは、それで治療できるものが限られてしまいますが、我々としては、幹細胞への治療でどうしても治療したいものもあるわけです。一方において、分化した細胞で治療できるものもあります。それは分けて、両方ともやりたいというのが方向です。

○坂本再生医療製品等審査部長 メカニズムについては、何か議論されているですか。

○日本医科大学 島田氏 やはり、一旦分化した細胞で、たまたまレトロウイルスが oncogene の近くに入っても、多くの場合はそれはそれだけなので

す。そこで分化がだんだん起こっていく途中でそれが起こってしまうと、それ以外のことが起こり得るということです。

○岡野副部会長 先ほどの質問に少し関連しますが、これまでの iPS 細胞の開発の流れとしては、最初のレトロではなくて、インサーションライズということで、山中研を中心にエピゾーマル・ベクターを開発されてきましたが、唯一、挿入型を作る可能性があるとすると、むしろフェール・セーフ・システムで「自殺遺伝子」を入れることになろうかと思いますが、そのときの最もベストな方法と、どのローカスを選ぶか、先生のお考えを教えていただけますか。

○日本医科大学 島田氏 現在考えられているベストな遺伝子挿入法は、*Homologous recombination* で、その効率を上げるために部分に遺伝子切断を起こすという方法です。

○岡野副部会長 その中でも一番よいと言われているのはローカスとかですね。例えば、AAVS1 は使っているということはあります。

○日本医科大学 島田氏 AAVS1 領域に AAV が挿入されるのはたまたまですが。一番、今、やられているのは 13 ページに 1 つの例が書いてあります。これは Zinc finger protein という、ある DNA の配列を認識できる蛋白質に nuclease を組み込んだキメラ蛋白で、こここの部分にブレイクを起こすと、ここでの Homologous recombination の数百倍上がると言うのです。こういうことがうまくできて、しかもその iPS クローン

ができれば理想的な遺伝子治療になるという考えです。

○中畠部会長 ほかにはいかがですか。最初にお断わりしなかったのですが、今日の議論は非公開の情報もかなりありますので、一応、議事録をマスキングするという形で対応したいと思いますので、よろしくお願ひします。ほかに何か。時間も大分押し迫ってきましたので。島田先生、あるいは柴田先生のほうでもいいですが、聞き漏らしたということがありましたら。

○梅澤副本部長代理 柴田先生のほうで、ファイリングの 10 ページの上のほうです。「全ゲノム解読で同定した肝臓がん(1例)における染色体構造異常」ということで、1 度全ゲノム解読で得られた情報ということで、先ほど少しコメントをいただいたのですが、karyotyping で、特にこの内側の部分、validated rearrangement の部分で、重要な chimeric gene の情報は、karyotyping で得られませんでしょうか。重要なという意味です。例えば、同じページの下のは、そうではないということを示しているのかと思ったのですが、実際の頻度的にいかがでしょうか。感覚的でも結構です。

○国立がん研究センター 柴田氏 頻度的には確かに、がんを起こすような非常に強い driving force を持つような異常では、やはり染色体間転座が多いです。一方で例えば肺がんでよく言われている融合遺伝子は同一染色体の中でのインバージョンで、例えば KIF5B-RET という融合遺伝子

は 10 番のインバージョンで起こっているのです。これはかなり大きなインバージョンですので、karyotyping で見つけられないかと言わると、我々はその経験がないので分かりませんが、見つけられるかもしれません。確かに現時点では、karyotyping では見つけられないようなドライバー変異というのはすぐには挙げられません。大きなレベルでのゲノム異常がリカレントで起こるということはよく知られています。

○岡野副部会長 今の所に関連して、梅澤先生御自身はユーリング肉腫、融合遺伝子の研究などに非常に詳しいと思いますが、これは全くナイーブな質問ですが、例えば ALK やいろいろな遺伝子とのフュージョンを作り得ると理解しているのですが、がんによっては、今まで全く報告されていないような fusion gene を作っているようなケースというのは、続々見つかっているのでしょうか。それともある特定のステロタイプに分類されているのか。もし前者だったら、先生がおっしゃったように、RNA シークエンスというのはすごく大事になってくると思います。

○国立がん研究センター 柴田氏 現時点では、おそらく白血病、あるいはサルコーマのようなものは調べ尽くされて、それはほぼ終わりに近づいているのですが、それ以外の固形腫瘍での探索が今、正に研究としては注目されています。固形腫瘍からは、頻度は低いのですが、治療標的になるなものが見つかってきています。そういうものはまだまだある

と考えています。

したがって、その中に非常に小さな領域のリアレンジメントが原因で起こったものはないかと言われると、それは、我々はまだ知らないだけで、そういうものはまだあるかもしれません。

○入村委員 柴田先生に伺います。一番最後の所で、iPS 細胞を genetic stability の話をされて、あのときにがん細胞に匹敵する結構、不安定性があるというお話があったと思いますが、私の聞き間違いかもしれませんが、そのときに、もしそれが本当だとしたら、例えば iPS 細胞を分化、あるいはセレクションすることによって、不安定性が低いものを作っていくとか、そういうことをした上でそれを評価することは、今の段階では可能でしょうか。

○国立がん研究センター 柴田氏 不安定性が低いクローンを選ぶということですね。不安定性の原因が、例えば p53 のようなもののように原因が分かっていれば、もちろんそれは除けますが、私の知識でそれをうまくポジティブにセレクションする方法はちょっとと思いつかないです。ネガティブに、つまり原因が分かっているものを除外していくことはできますが、ジェネティックにスティーブルなクローンをポジティブにセレクションする方法はうまく見つけられないです。

○岡野副部会長 先ほど質問させていただいたのとかぶるのですが、最終製品、iPS 細胞そのものを治療に使うわけではないので、例えば筋肉にする

とか、神経にするわけですが、そういった最終製品にしたときの CNV というのはすごく大事で、非常に腫瘍原性の高いものは最終製品にしたときの CNV は非常に著しく高いと。いわゆるゲノム不安定性があるものは、当然除外していくことになるかと思います。やはり、そういうものを見ると、p53 の遺伝子のリクローンの程度は非常に低かったと思うのです。やはり、CNV を最終製品について調べていくのは 1 つの手ではないかと思っています。

○国立がん研究センター 柴田氏 CNV も確かにゲノム不安定性の 1 つの現れですので、そこはきちんと評価して品質管理をすることはとても大事だと思います。

○入村委員 ちょっとと思ったのは、iPS 細胞のゲノム不安定性はこれこれこうであるというのを共通な性質のように語ってしまうのはちょっと危険というか、ミスリーディングの議論になってしまうのではないかと逆に思ったのですが。

○岡野副部会長 それは十分あり得ると思います。特定の細胞に分化したときは、非常にゲノムの不安定性が出てくるというのは十分あり得るのではないかと、最近、自分たちのデータを見ていてそう思っています。だからこそ、iPS 細胞の段階、サイドで見ていただくことはもちろん大事ですが、実際、ユーザーが移植する細胞について、そういった解析を最終製品についてやっていくことはすごく大事ではないかと思っています。

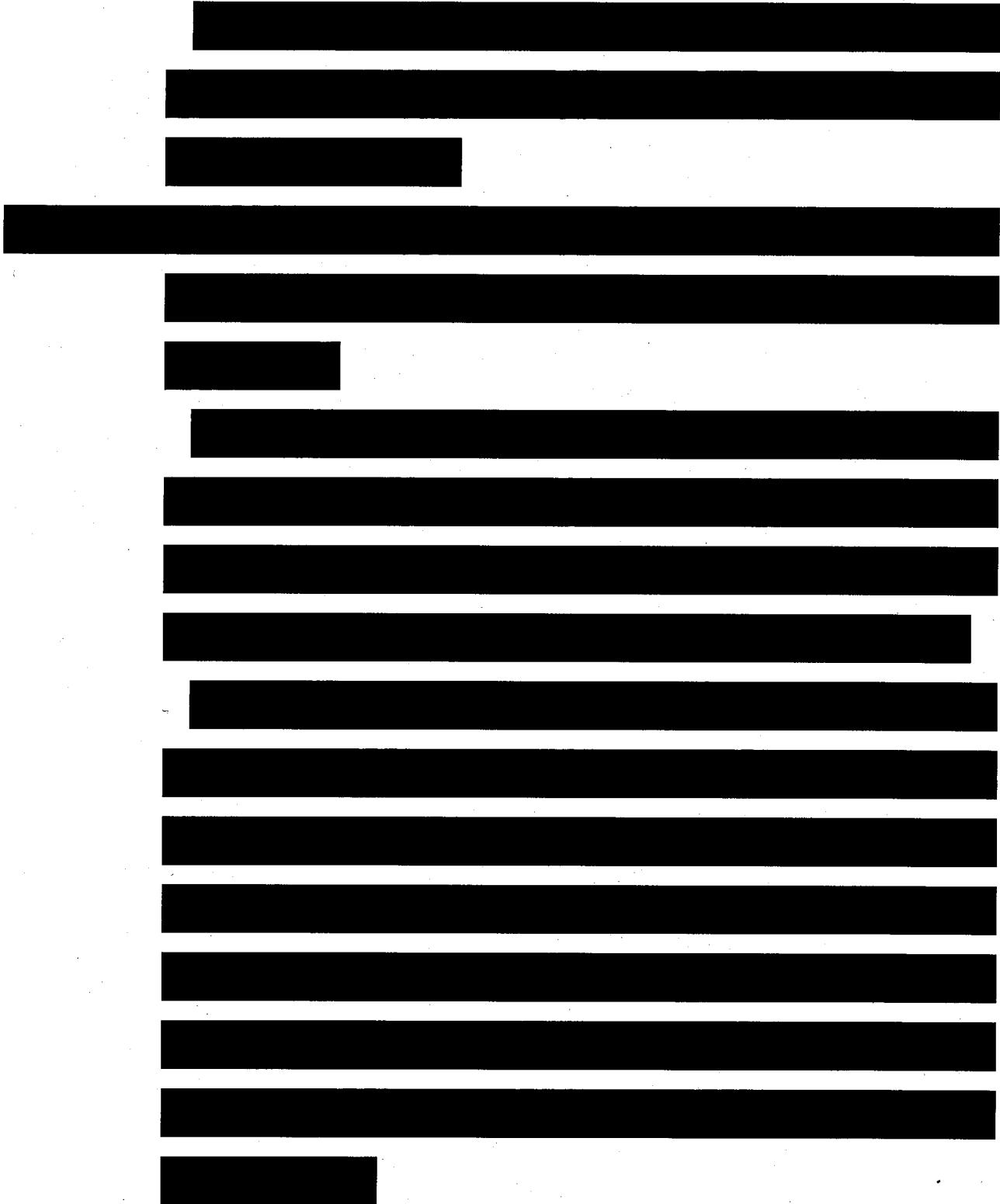
ます。

○中畠部会長 ほかにはいかがでしょうか。13 ページの肝がんでの、いろいろな染色体の構造異常を示されていましたが、肝がんでも部位によって組織も違うということで、いろいろな mutation が見つかってくると思います。iPS 細胞の場合は 1 つのクローンとしてスタートしていますので、こういった形でたくさんの染色体異常が出てくるということはおそらくないと思うので、クローンとしてしっかりいろいろな方法で構造異常がないかどうかチェックしていくば、かなりの品質管理ができるのではないかと思いますので、そういう方向でよろしいかどうか。それだけ伺っておきます。

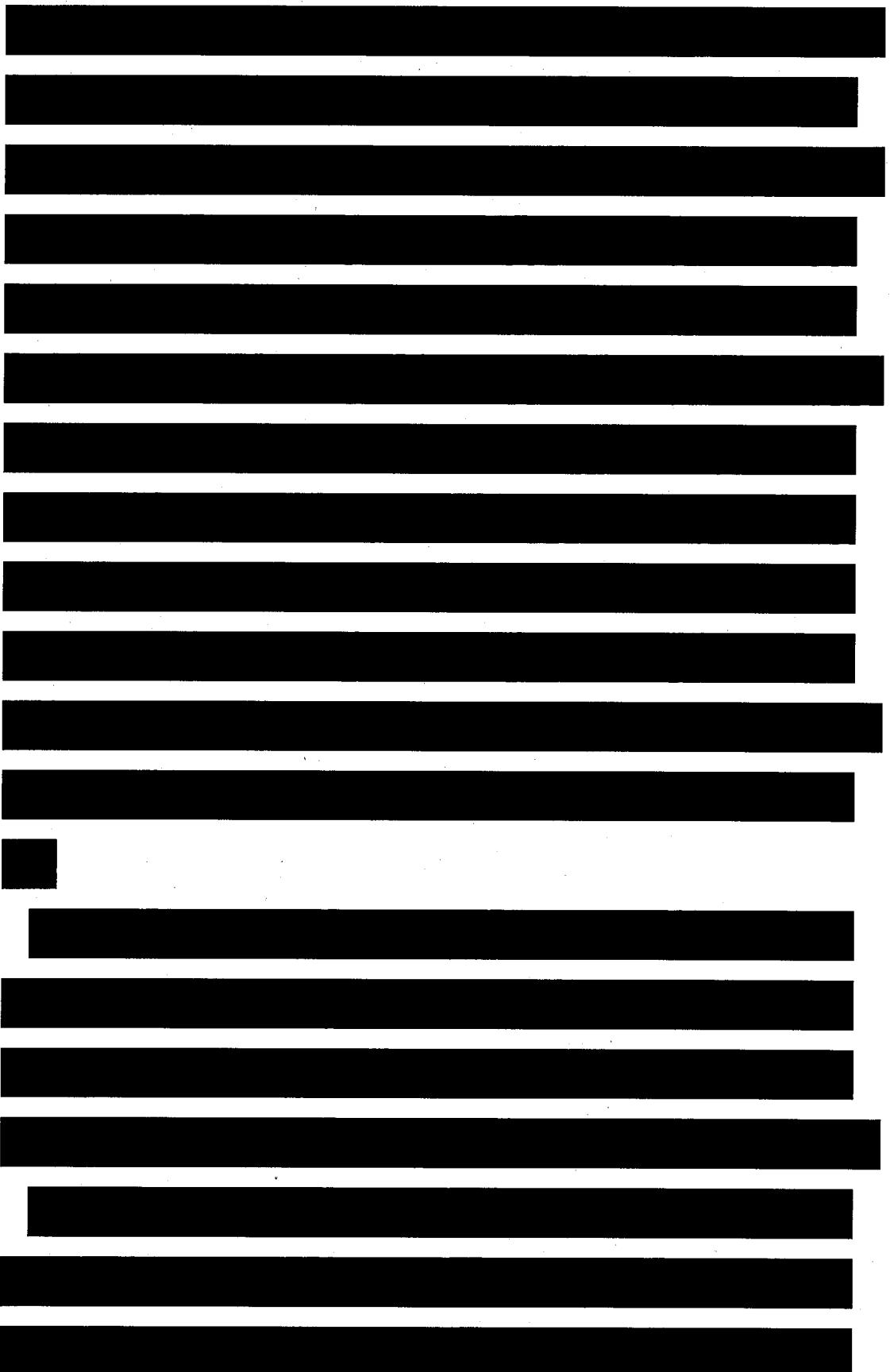
○国立がん研究センター 柴田氏 クローンはもちろんエクスパンドしていく過程で必ず中に heterogeneity が生まれる可能性があるので、その辺は先ほどの genetic instability の頻度、どれくらいの程度で起こるのかということの情報が大事です。もちろんクローニングしたから永遠に同じということはないと思いますので、複数の段階で調べる。先生がおっしゃるように、最終的なところで調べても構いませんし、どこかの段階できちんと情報を取っておくのはとてもいいと思います。

○中畠部会長 ほかにはいかがでしょうか。もしございませんでしたら、今日の議論はこのぐらいにしたいと思います。今まで議論してきましたので、本日のプレゼンの内容も一部先取りした形で、副部会長とも相談しな

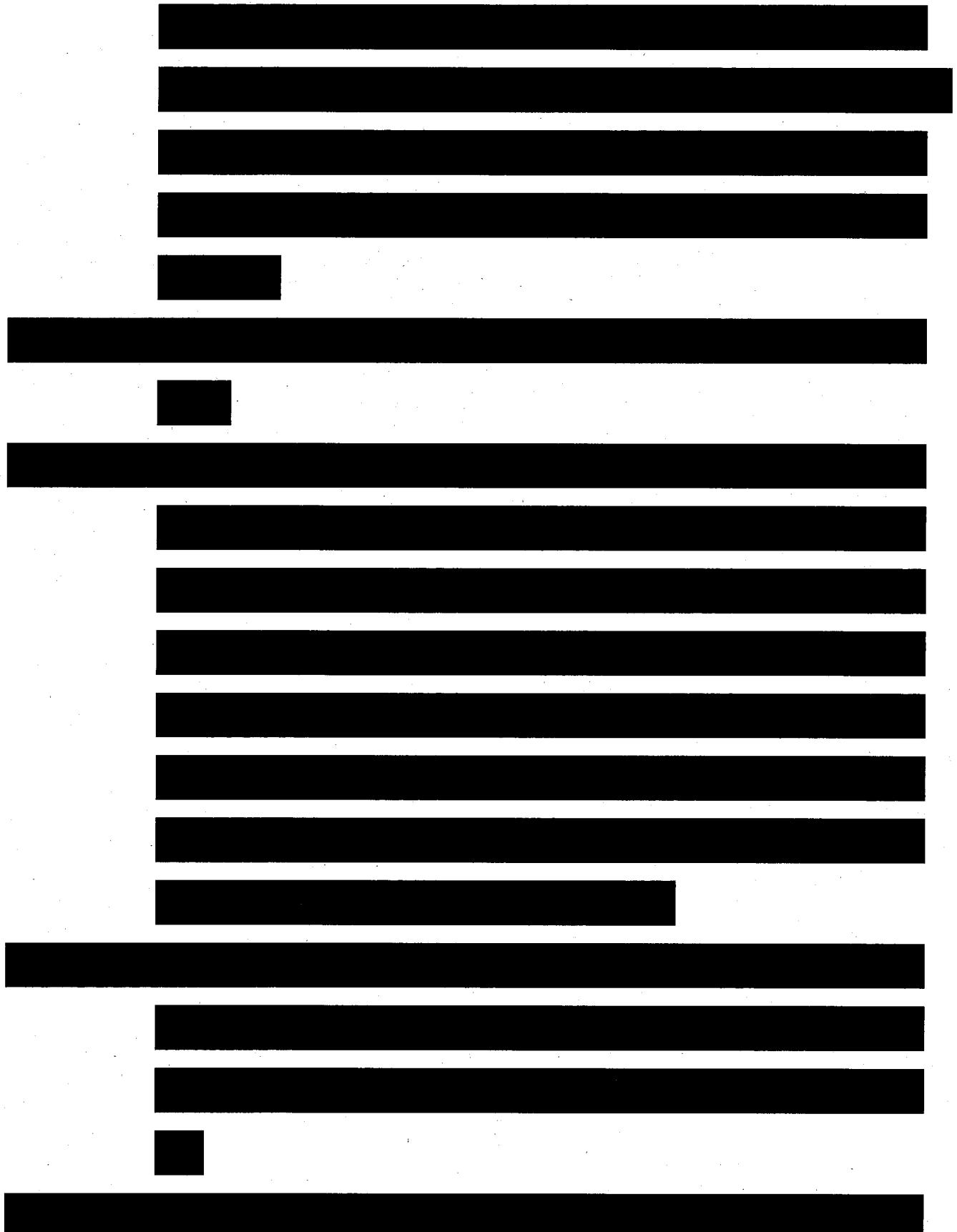
がら、今までの造腫瘍性に対する議論についての1つのたたき台をまとめましたので、それを事務局から配っていただきます。



[REDACTED]



[REDACTED]



[REDACTED]

○中畠部会長

[REDACTED] 大分議論も煮詰まってき

ましたので、一応今日の御議論あるいは今までの何回にも及ぶ造謄癱性の問題についての皆さん方の御意見を参考にして、細かい用語とか表現などの修正は、私と副部会長、審査等改革本部と相談して、今後詰めていきたいと思います。メールでやり取りすることもあるうかと

思いますが、最終的には私に一任していただくという形で御了解いただけたらと思います。それを基にして科学委員会に出すという形にしたいと思います。その点について、何か御議論はありますか。一応 8月 20 日に科学委員会という親委員会がありますので、それに提出する方向でいきたいと思います。最終的には御一任いただくという形にしたいと思います。どうもありがとうございました。

それでは、本日の専門部会はこれで終わりにしたいと思います。事務局から何か連絡はありますか。

○吉田事務局長 2 点ほど手短に報告します。1 つは、報告です。参考資料 2-1、2-2 の再生医療関係の法改正等の動きがありますので、それを資料としてお配りしています。参考資料 2-1 は薬事法の改正法案です。これは以前にも御紹介した内容ですが、正式に国会に提出されており、継続審査の扱いです。中身としては再生医療関係の内容も入っておりまして、2-1 の 3 ページに、薬事法案の中で新しく章立てするとか、新しい条件・期限付承認制度を導入するといった内容が入っています。

参考資料 2-2 は 1 枚紙です。先ほどは業態として行う薬事法の世界ですが、こちらは研究も含めた再生医療全体の規制として、安全性確保を見直す形で、新しい法律が提出されています。中身としては 2 ページですが、リスクに応じて再生医療等の提供に際し、様々な手続きが必要になるということですし、2 ページの下の方に、いわゆる加工

とか保存等については許可制をとり、外部に一部の業務を委託することも可とするというものです。その辺りについては薬事法の流れにも沿った対応がなされるということです。本法案についても、同じように継続審査ということで、御紹介させていただきます。それが1点目です。

2点目は、次回の専門部会の日程調整については、部会長、副部会長とも相談させていただきながら、後日行いたいと思います。よろしくお願ひいたします。以上です。

<閉会>

○中畠部会長 それでは、これで本専門部会を終わりにしたいと思います。遅くまでありがとうございました。