

2020.1.15

第2回Translational and Regulatory Science Symposium
@東京大学弥生講堂一条ホール



ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の 規制と安全性評価の現状



国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子医薬部
内田 恵理子

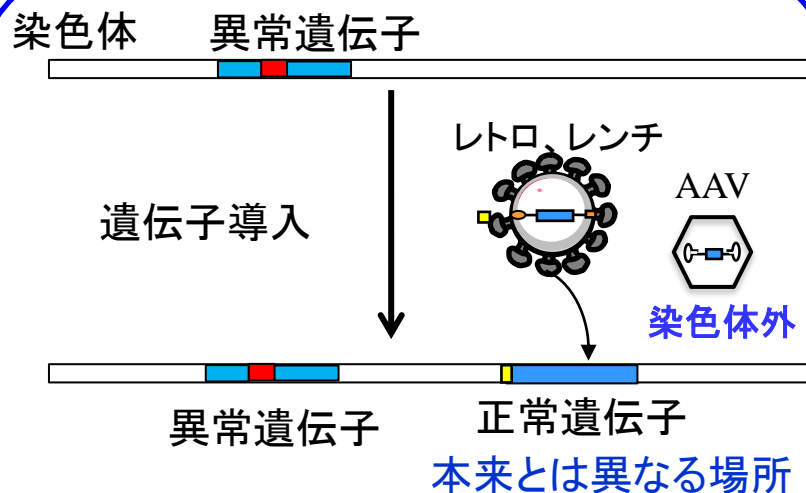


国立医薬品食品衛生研究所

National Institute of Health Sciences

従来の遺伝子治療とゲノム編集遺伝子治療の違い

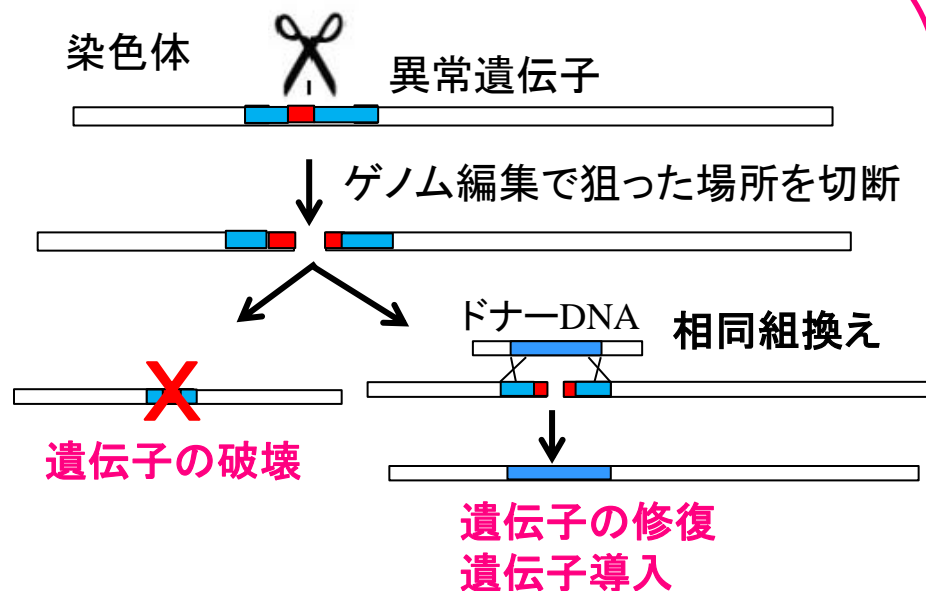
従来の遺伝子治療



- 遺伝子を補充・付加する治療法
- 異常遺伝子は残ったまま
(優性遺伝病は対象外)
- 遺伝子の組込部位はランダム
→ 挿入変異によるがん化のおそれ
- 発現調節ができない

従来の遺伝子治療の限界

ゲノム編集遺伝子治療



- 異常遺伝子や不要な遺伝子を破壊できる
- 異常遺伝子の変異を修復可能
- 安全な部位への遺伝子導入が可能
- 異常遺伝子の修復では本来の遺伝子の発現調節機構が働く

従来の遺伝子治療では実現できない治療、
究極の遺伝子治療が可能になると期待

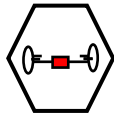
ゲノム編集を用いた遺伝子治療の方法

体内 (in vivo) ゲノム編集
(ゲノム編集ツールの投与)

体外 (ex vivo) ゲノム編集
(ゲノム編集細胞の投与)

ゲノム編集ツール

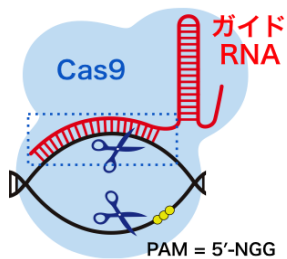
◆ ベクター



◆ mRNA

◆ タンパク質 /sgRNA

DDS



直接投与

標的細胞を取り出す

(自己、同種)

造血幹細胞、T細胞、
iPS細胞

培養、増幅

ゲノム編集ツール
Electroporation
Lipofection

ゲノム編集

培養、増幅

患者に投与

ゲノム編集細胞

ゲノム編集遺伝子治療の安全性上の課題

1. 従来の遺伝子治療の課題

- ベクターの挿入変異による造腫瘍性等
(レトロウイルス、レンチウイルス)
- ベクター/発現産物の免疫原性、細胞毒性

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課題

- ゲノム編集酵素の遺伝毒性(オフターゲット変異)
- 染色体切断による転座や大規模な欠失・挿入
- 遺伝子ノックイン時のP53の変異
- ゲノム編集酵素(細菌由来)の免疫原性、細胞毒性

ゲノム編集治療に対する海外の規制の対応

欧米共にゲノム編集を遺伝子治療として規制

欧州医薬品庁(EMA)

- Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. (Draft, 2018.7)
 - ゲノム編集を用いた遺伝子改変細胞製品特有の品質や非臨床安全性に関する考慮事項を提示
 - ✓ オンターゲット効果及びオフターゲット変異の解析
 - ✓ ゲノム編集した細胞のクローナリティーや造腫瘍性
 - ✓ 免疫原性

米国食品医薬品局(FDA)

- Guidance for Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products (Draft, 2018.7)
 - ゲノム編集は宿主ゲノムに永続的な変化を与え、目的外のゲノム改変により、遺伝子発現の異常や染色体の転座、がん化などを生じる可能性
⇒ 染色体組込型ベクターと同様、15年間のフォローアップを求める
 - ✓ フォローアップではオフターゲット活性に関するin silico解析やin vitro解析等の結果に基づいて遅発性有害事象のモニタリング計画を立てること

ゲノム編集治療への日本の指針の対応

遺伝子治療等臨床研究に関する指針(2019.2.28改正)

- ✓ ゲノム編集技術への対応と臨床研究法への対応を考慮した改正
- ✓ ゲノム編集は、従来の遺伝子治療の定義(遺伝子を導入すること)に当てはまらないmRNAやタンパク質を用いた遺伝子を改変の場合でも遺伝子治療と定義
- ✓ 受精卵・生殖細胞のゲノム編集は指針により禁止(法規制も検討)
- ✓ 品質や安全性に関する指針ではない

遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針(2019.7.9改正)

- ✓ 2012-2016年度の研究班で指針の改正案を作成
- ✓ 当時の欧米の指針等を参考(欧米の指針は既に改正案発出)
- ✓ ゲノム編集を用いた遺伝子治療には対応したものではない

医薬品医療機器総合機構(PMDA)の動き

- PMDAの科学委員会(Scientific Board)にゲノム編集専門部会設置(2018年)
- ゲノム編集という新しいToolの品質や安全性について議論を行い、報告書作成
- 「ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の品質・安全性等の考慮事項」報告書
- 報告書の発出により、ゲノム編集を利用した遺伝子治療の開発を促進すると共に安全性確保を図ることが目的

AMED医薬品等規制調和・評価研究事業

ゲノム編集を利用した遺伝子治療用製品の 安全性評価に関する研究

H28.6.15～H31.3.31

研究代表者:内田 恵理子(国立衛研)

研究分担者:内藤 雄樹(DBCLS)

研究分担者:小野 竜一(国立衛研)

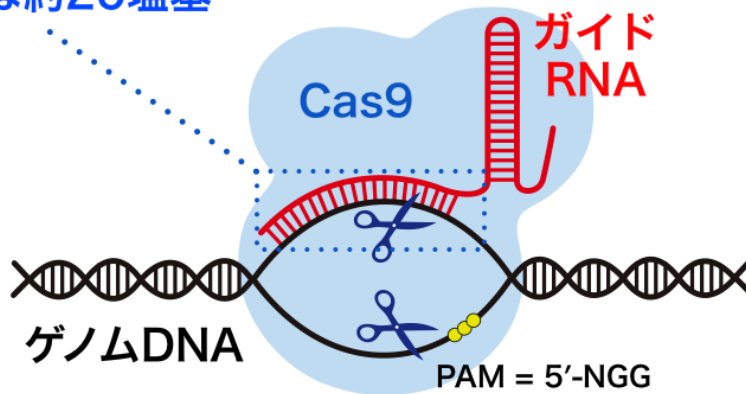
目的: *ex vivo*ゲノム編集の安全性評価に関する
技術的ガイダンス案を作成

ゲノム編集遺伝子治療の安全性の課題1

目的外の類似配列(オフターゲットサイト)を編集してしまう可能性
(オフターゲット効果、オフターゲット変異)

● ゲノムDNAを
配列特異的に編集

● 標的は約20塩基



よく似た配列も編集してしまう
= 「オフターゲット」効果

がんなどの発症の恐れ

本来の標的配列

ガイド GGGTGGGGGGAGTTTGCTCC
|||
標的 GGGTGGGGGGAGTTTGCTCC

オフターゲット配列

ガイド GGGTGGGGGGAGTTTGCTCC
||X||X||
標的 GGATGGAGGGAGTTTGCTCC

ガイド GGGTGGGGGGAGTTTGCTCC
X|X|X|
標的 CGGGGAGGGAGTTTGCTCC

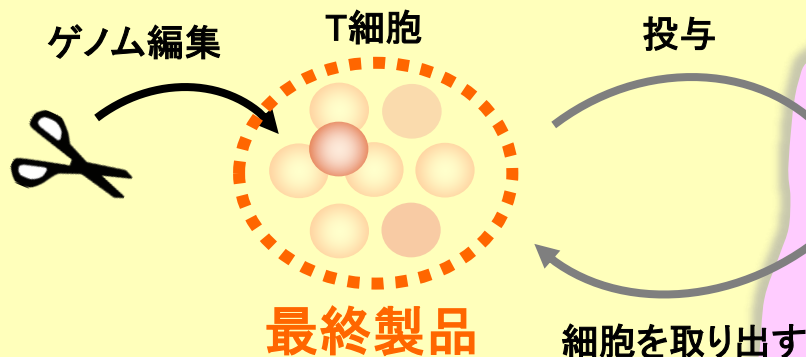
オフターゲットサイトの評価法

検出法	概要	欠点
In silico解析	gRNAとの類似塩基配列の塩基配列検索ソフトによる予測	全てのオフターゲットサイトを予測できる保証はない
In vitro Cell 解析	細胞のゲノム編集時にタグ等を取り込ませて切断部位を網羅的に検出 BLESS (2013)、Guide-seq (2015) HTGTS (2015) など	細胞への取り込み効率やゲノムへの組込み効率が影響する可能性
In vitro Cell free解析	抽出したゲノムを用いてゲノム編集酵素による切断部位を網羅的に検出 Digenome-seq (2015)、SITE-seq (2017)、Circle-seq (2017)など	細胞内での反応を反映するとは限らない
全ゲノム解析	NGSによる全塩基配列のシーケンス	細胞培養による自然変異と区別できない

オフターゲット変異をどのように予測・評価するか

ex vivoゲノム編集

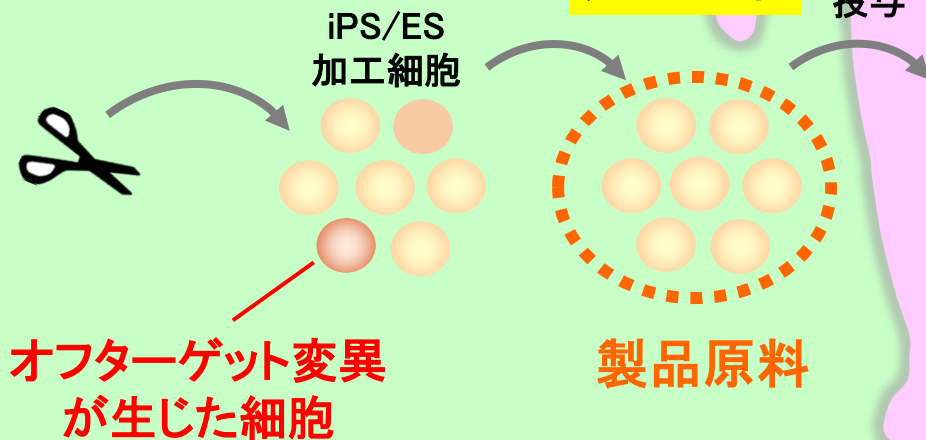
非クローン化



製品の オフターゲット変異
解析不可

↓
変異の
予測

クローン化

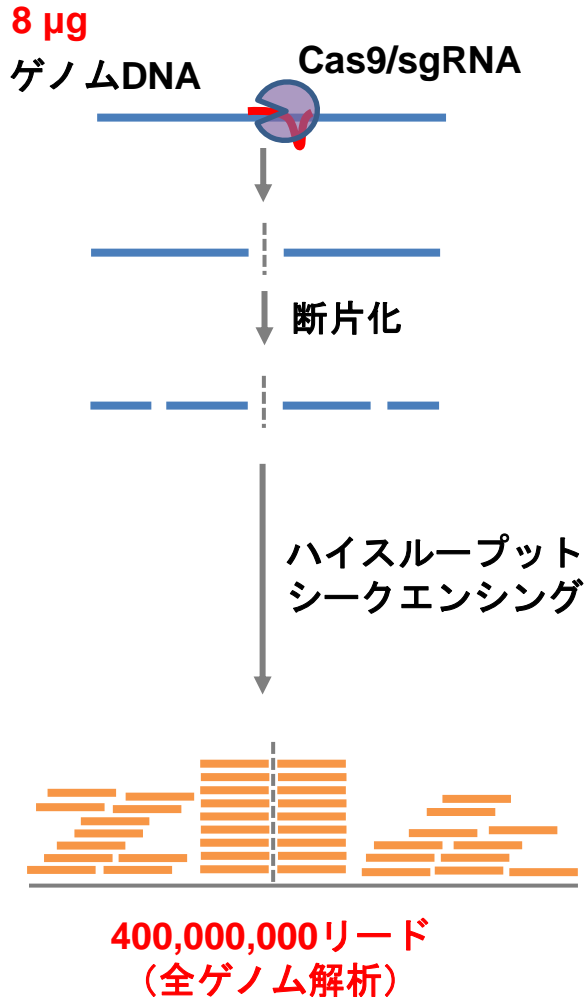


製品の オフターゲット変異
解析可

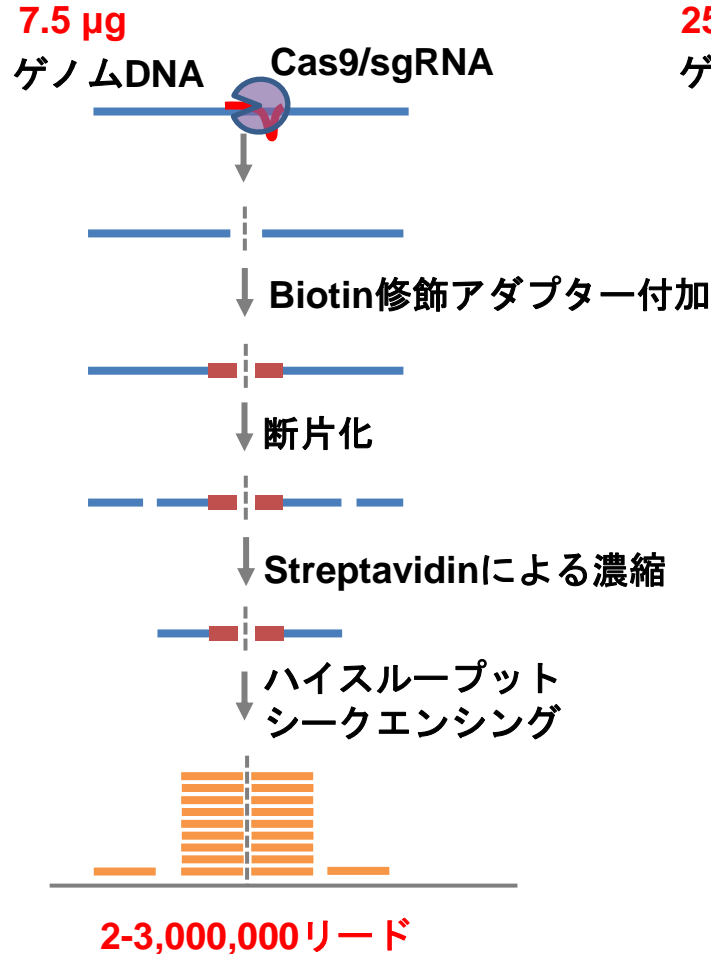
↓
変異の
特定

Cell free解析によるオフターゲット部位の評価

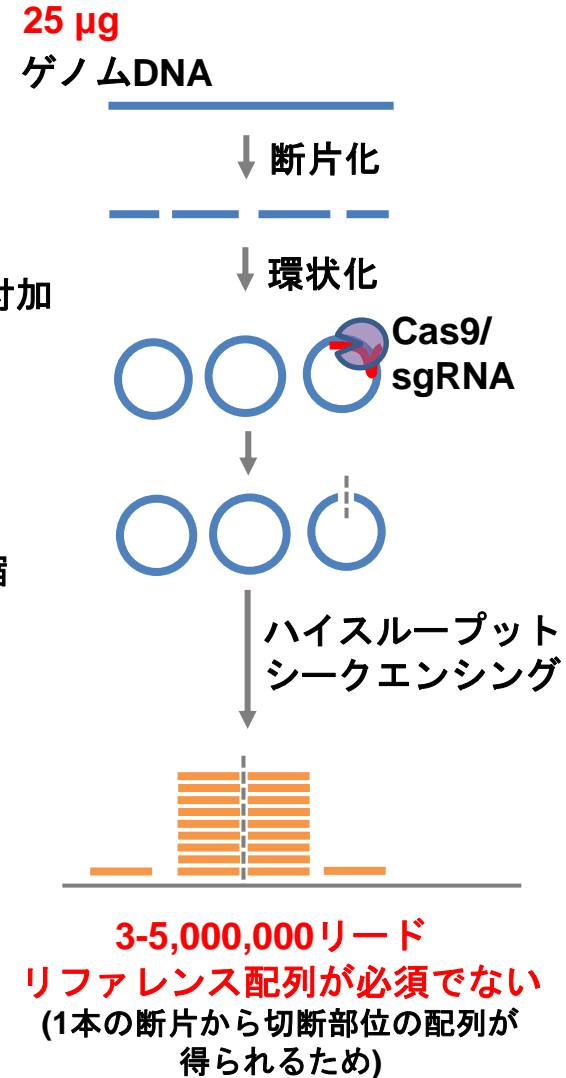
Digenome-seq



SITE-seq



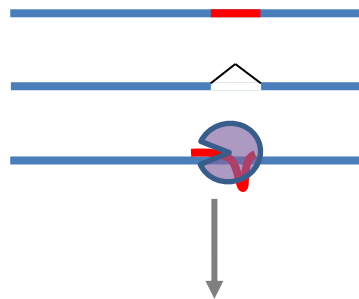
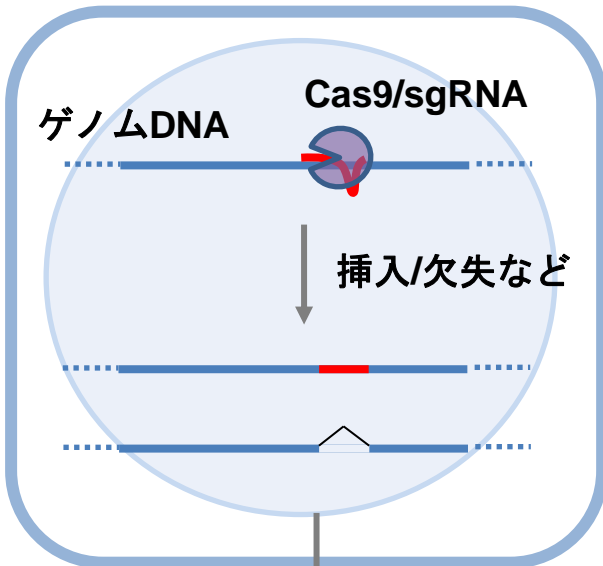
CIRCLE-seq



Cell解析によるオフターゲット部位の評価

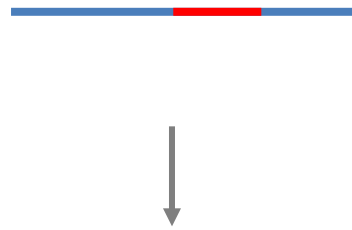
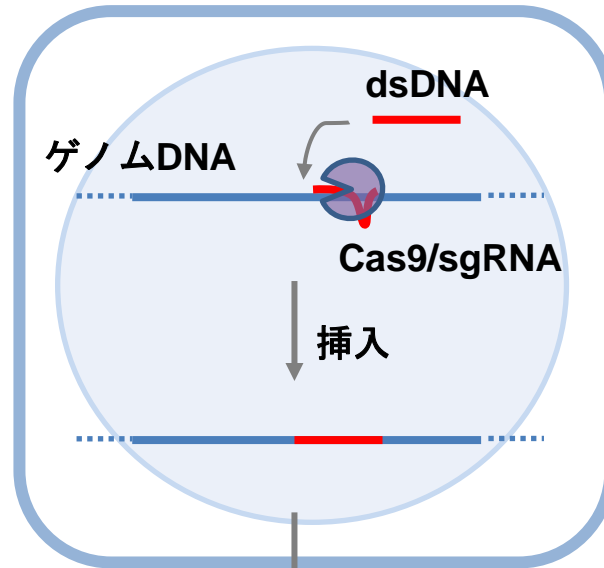
Digenome-seq

類似法 : WGS

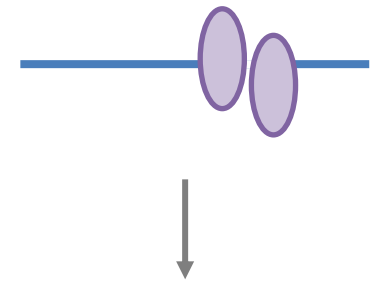
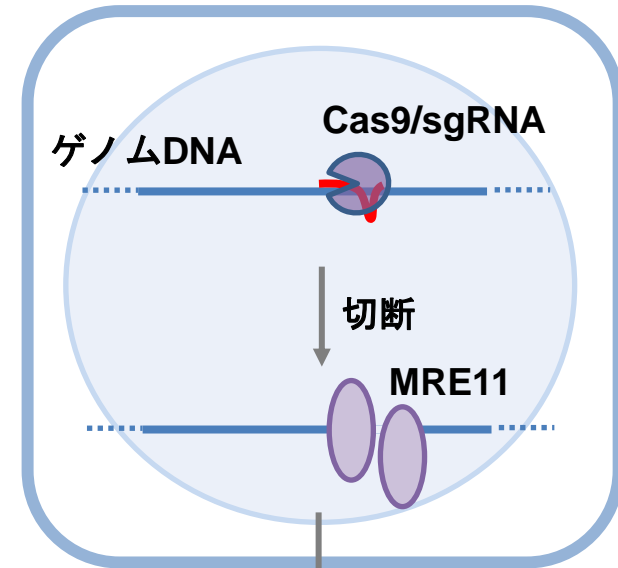


GUIDE-seq

類似法 : IDLV capture,
TEG-seq, iGUIDE



DISCOVER-seq



ハイスループットシーケンシング

Ex vivoゲノム編集細胞の目的外の遺伝子改変に関する 安全性評価(案): オフターゲット変異の解析方法

ex vivo
クローン化

ex vivo
非クローン化

(製品・バンク化細胞の)評価

手法の評価・変異予測

In silico 解析

オフターゲット候補サイトの
探索

超絶高速ゲノム配列検索

GGGenome など

Cell free 解析

候補サイトの絞り込み

Digenome-seq, SITE-seq, CIRCLE-seq etc.

Cell 解析

候補サイトの絞り込み

全ゲノム解析
Amplicon-seq
Digenome-seq
etc

Amplicon-seq
Digenome-seq
etc

Cell 解析

目的細胞での変異特定

オン/オフターゲットサイトの
ゲノム編集効率の評価

オフターゲット変異のリスク評価

- ① 変異の位置と種類
- ② 変異遺伝子の評価 (p53等のがん関連遺伝子)

Ex vivoゲノム編集細胞の目的外の遺伝子改変に関する 安全性評価(案)オフターゲット変異の解析方法

ex vivo
クローン化

(製品の)評価

ex vivo
非クローン化

手法の評価・変異予測

In silico 解析

超絶高速ゲノム配列検索

●オフターゲット変異に関する留意事項

- ✓特異性の高いガイドRNAの設計
- ✓In silico解析(配列検索)はミスマッチや挿入/欠失を許容して検出可能な方法を使用 (GGGenomeなど)

Cell 解析

目的細胞での変異特定

Amplicon-seq
Digenome-seq
etc

Digenome-seq
etc

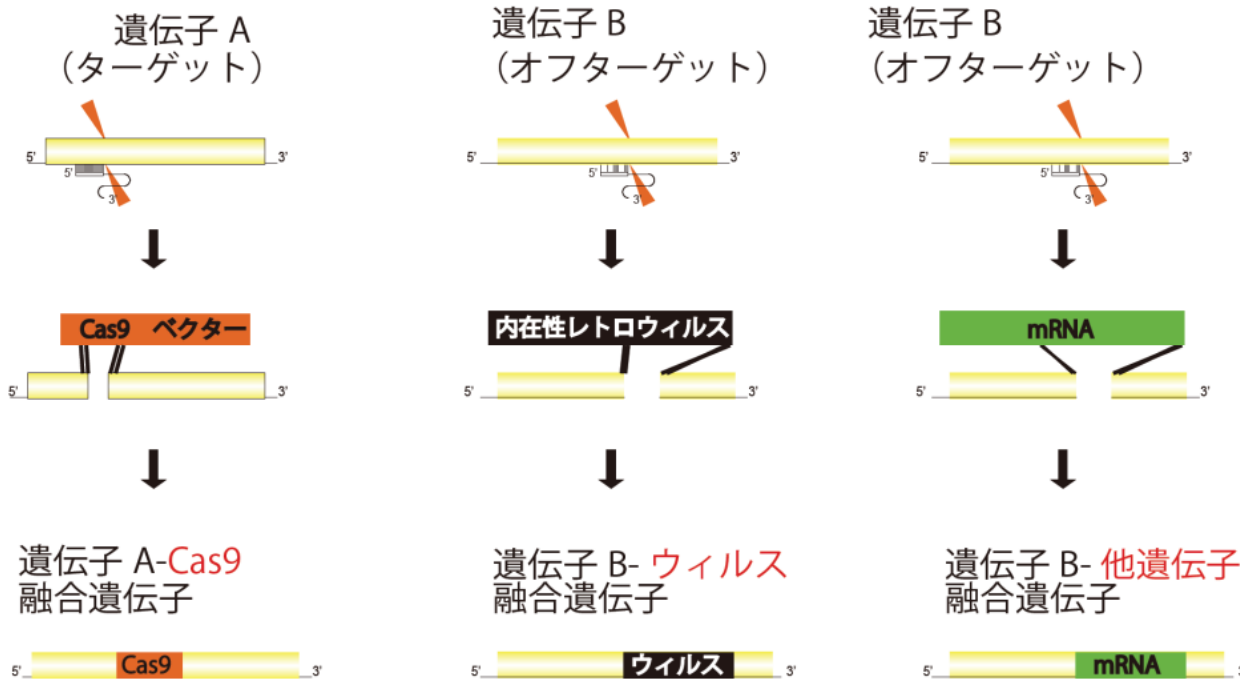
オン/オフターゲットサイトの
ゲノム編集効率の評価

オフターゲット変異のリスク評価

- ①変異の位置と種類
- ②変異遺伝子の評価(p53等のがん関連遺伝子)

ゲノム編集遺伝子治療の安全性の課題2

ゲノム編集目的部位(オンターゲットサイト)に目的外遺伝子の組込み等の変異が生じる可能性



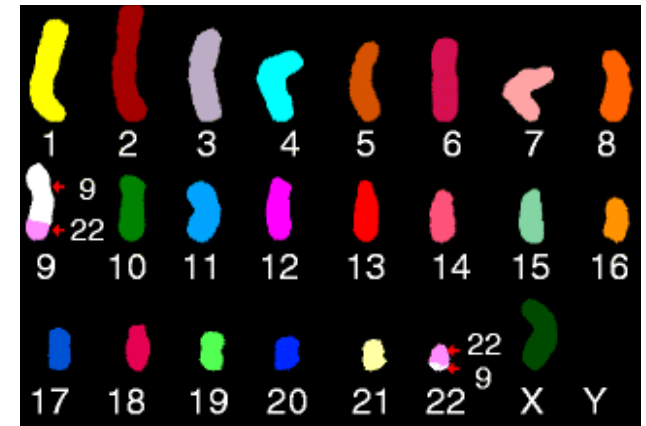
マウス受精卵のゲノム編集において、オンターゲットサイトに目的外配列 (内在性レトロウイルス、CRISPR/Cas9ベクター、mRNAの逆転写配列、ガイドRNAの逆転写配列) の挿入を確認(23.6%)

(Ono R et al: *Sci. Rep* 2015, 5, 12281)

Ex vivoゲノム編集細胞の目的外の遺伝子改変に関する 安全性評価(案)

オンターゲットサイトの評価

- 目的外配列の挿入/大きな欠失
 - ・Long PCR
 - ・ロングリードシーケンス解析等
- 染色体転座・逆位・欠失
 - ・G-band解析、multicolor FISH等



ゲノム編集細胞の造腫瘍性評価

目的外の遺伝子改変のリスクと適用される

細胞の特性、適用疾患の特徴に応じて実施

細胞のがん化のリスク: iPS/ES細胞 > 造血幹細胞 > > T細胞

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の開発動向

内田 恵理子^{*1}, 平松 直人^{*2}, 犬飼 直人^{*2}, 岩井 謙一^{*2}, 渡辺 武志^{*2}, 川崎 秀吉^{*3},
田村 幸太郎^{*3}, 土屋 貴穂^{*3}, 吉見 英治^{*3}, 高橋 則彦^{*4}, 伊原 辰哉^{*5}, 藤本 和則^{*6},
山下 晃人^{*7}, 小野 貴士^{*8}, 高木 観^{*9}, 小野 竜一^{*1}, 内藤 雄樹^{*10}, 井上 貴雄^{*1}

Development of Gene Therapy Using Genome Editing Technologies

Eriko UCHIDA^{*1}, Naoto HIRAMATSU^{*2}, Naoto INUKAI^{*2}, Kenichi IWAI^{*2}, Takeshi WATANABE^{*2},
Hideyoshi KAWASAKI^{*3}, Kotaro TAMURA^{*3}, Takaho TSUCHIYA^{*3}, Eiji YOSHIMI^{*3},
Norihiko TAKAHASHI^{*4}, Tatsuya IHARA^{*5}, Kazunori FUJIMOTO^{*6}, Akihito YAMASHITA^{*7},
Takashi ONO^{*8}, Kan TAKAGI^{*9}, Ryuichi ONO^{*1}, Yuki NAITO^{*10} and Takao INOUE^{*1}

1. はじめに

今日、遺伝子治療は遺伝性疾患の治療に限らず、キメラ抗原受容体発現T細胞(CAR-T)を用いたがんの治療など様々な疾患を対象に臨床試験が実施されている。欧米では

既に *ex vivo* 及び *in vivo* 遺伝子治療製品が複数品目承認されており、日本でも本年3月に初めての遺伝子治療用ベクター製品とCAR-T細胞製品が承認されるなど実用化が始まっている。しかし、従来の遺伝子治療は基本的に欠失遺伝子を補充する、若しくは新たな遺伝子を付加する治

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
^{*2} 武田薬品工業株式会社 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 (〒251-8555)
Takeda Pharmaceutical Company Limited, 26-1 Muraoka-higashi 2-chome, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan
^{*3} アステラス製薬株式会社 茨城県つくば市御幸が丘21 (〒305-8585)
Astellas Pharma Inc., 21 Miyukigaoaka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan
^{*4} 大塚製薬株式会社 徳島県徳島市川内町加賀野463-10 (〒771-0192)
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima 771-0192, Japan
^{*5} 小野薬品工業株式会社 福井県坂井市三町山岸50-10 (〒913-8538)
Ono Pharmaceutical Company Limited, 50-10 Yamagishi, Mikuni-cho, Sakai-shi, Fukui 913-8538, Japan
^{*6} 第一三共株式会社 東京都江戸川区北葛西1-16-13 (〒134-8630)
Daiichi Sankyo Company Limited, 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan
^{*7} 大日本住友製薬株式会社 大阪府大阪市此花区春日出中3-1-98 (〒554-0022)
Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., 3-1-98 Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka 554-0022, Japan
^{*8} 田辺三菱製薬株式会社 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000 (〒227-0033)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, 1000 Kamoshida, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-0033, Japan
^{*9} 田辺三菱製薬株式会社 埼玉県戸田市川岸2丁目2-50 (〒335-8505)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, 2-2-50 Kawagishi, Toda, Saitama 335-8505, Japan
^{*10} ライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS) 静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所内 (〒411-8540)
Database Center for Life Science (DBCLS), National Institute of Genetics Campus, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の規制と安全性評価

内田 恵理子^{*1}, 山下 拓真^{*1}, 小野 竜一^{*2}, 内藤 雄樹^{*3},
ゲノム編集治療安全性タスクフォース^{*4}, 井上 貴雄^{*1}

Regulations and Safety Evaluation for Genome Editing Therapy

Eriko UCHIDA^{*1}, Takuma YAMASHITA^{*1}, Ryuichi ONO^{*2}, Yuki NAITO^{*3},
Task Force for Safety Assessment of Genome Editing Therapy^{*4} and Takao INOUE^{*1}

1. はじめに

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療は、高効率・特異的なゲノムの切断・修復を利用して、特定の遺伝子の破壊や変異遺伝子の修復といった従来の遺伝子治療技術では実現できない治療が可能な次世代の遺伝子治療として期待されている。一方で、ゲノム編集では目的外の部位を切断して編集してしまう可能性や、ゲノム編集による切断部位に目的外的変異が生じる可能性など、従来の遺伝子治療とは異なる安全性上の課題がある。前報(本誌8月号)¹⁾では、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療について臨床段階にある候補品を中心に開発動向を概説するとともに、米国で臨床試験が実施されている品目の一部については、米国国立衛生研究所(NIH)の組換えDNA諮問委員会(RAC)での安全性に関する議論も併せて取り上げた。

本稿では、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療に関する日本欧米の規制の現状と、国立研究開発法人日本医療研究開

発機構(AMED)レギュラトリーサイエンス研究班(AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業「ゲノム編集を利用した遺伝子治療用製品の安全性評価に関する研究」, 研究代表者: 内田恵理子)で検討を行ってきた、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療を行った *ex vivo* 遺伝子治療製品(ゲノム編集細胞製品)の安全性評価のうち、特にゲノム編集により生じる可能性がある目的外の遺伝子改変の安全性評価に関する議論について紹介する。

2. ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療に関する規制の現状

2.1 欧州の規制

欧州医薬品庁(EMA)は、ゲノム編集を考慮して二つの遺伝子治療関連ガイドラインの改正を行っている。一つは2018年3月に改正された「遺伝子治療用製品(*in vivo* 製品)の品質・非臨床・臨床に関するガイドライン」(Guideline

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
^{*3} ライフサイエンス統合データベースセンター 静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所内 (〒411-8540)
Database Center for Life Science, National Institute of Genetics Campus, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan
^{*4} ゲノム編集治療安全性タスクフォース(日本製薬工業協会, 代表: 犬飼直人)のメンバーは以下の通り。アステラス製薬: 川崎秀吉, 田村幸太郎, 土屋貴穂, 吉見英治; 大塚製薬: 高橋則彦; 小野薬品工業: 伊原辰哉; 第一三共: 藤本和則; 大日本住友製薬: 山下晃人; 田辺三菱製薬: 小野貴士, 高木観; 武田薬品工業: 犬飼直人, 岩井謙一, 平松直人, 渡辺武志。