

遺伝子治療臨床研究におけるゲノム 編集を巡る議論

- Revision of guideline for gene
therapy clinical study based on the
novel technology of gene editing

金沢工業大学／日本薬科大学
山口照英

第24回日本遺伝子治療学会

2019.1.17

- Current Situation of Gene Editing for Gene Therapy and Adaption of Gene Editing to Guideline for Gene Therapy Clinical Study
- Safety and Quality Issues of Gene Editing Tool

- ゲノム編集技術の現状と遺伝子治療等関連指針の問題点と海外を含めた状況
- ゲノム編集に安全性や品質評価

Guideline for Gene Therapy Clinical Study and the related Law

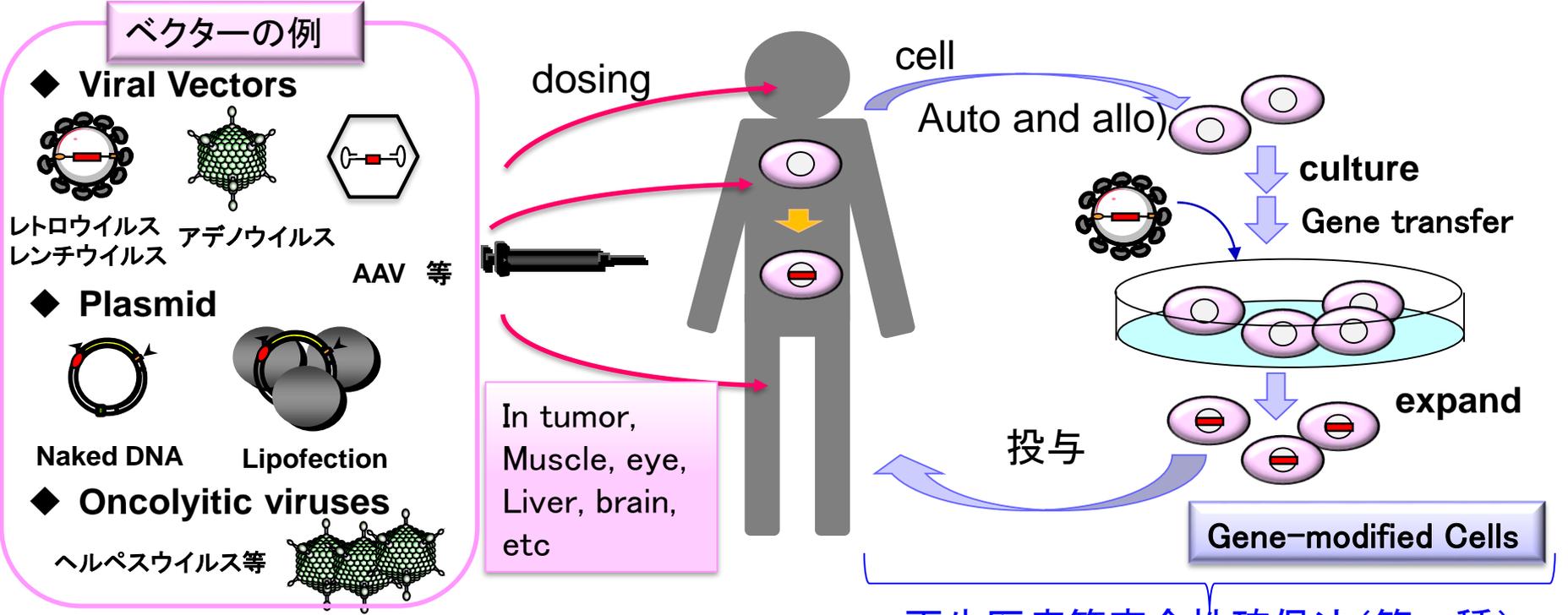
遺伝子治療等臨床研究に関する指針と関連法規

指針全体が適用

総則のみ適用

in vivo Gene Therapy 遺伝子治療

ex vivo Gene Therapy



Review Board for Gene Therapy clinical Study
遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

再生医療等安全性確保法(第一種)

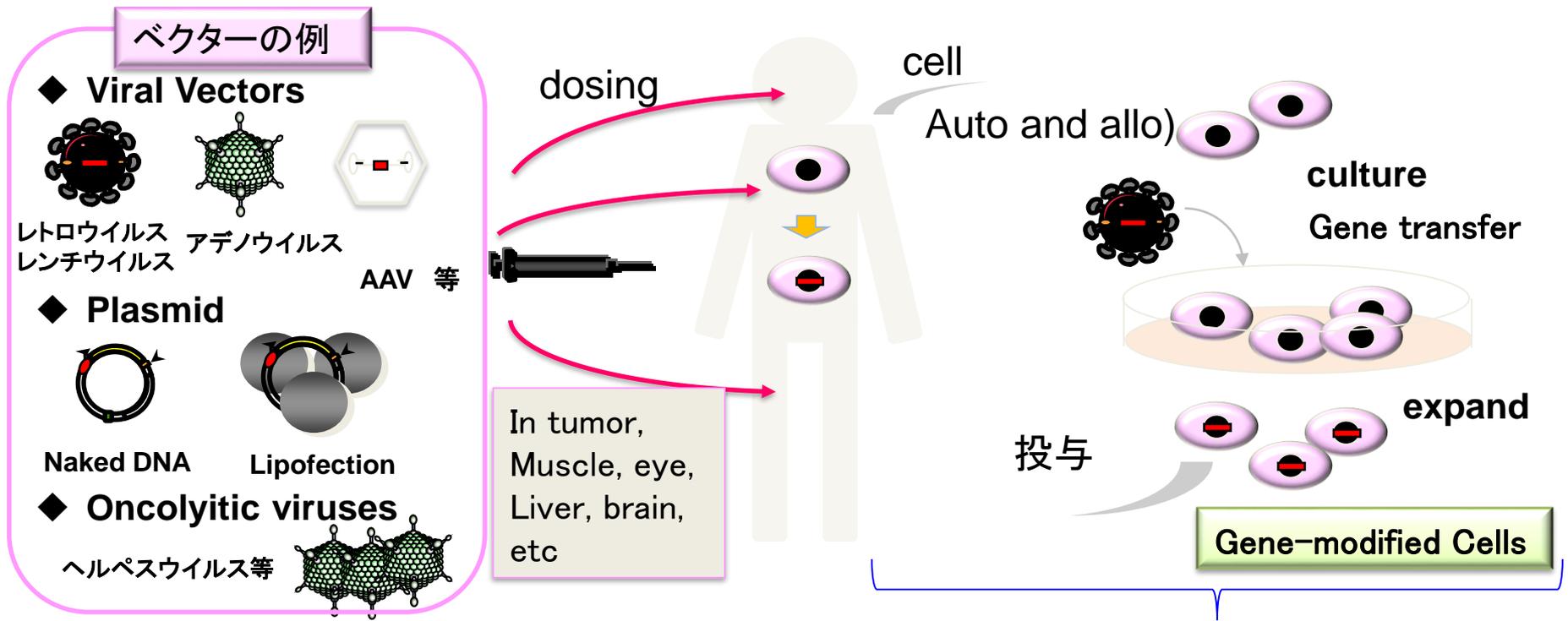
特定認定再生医療等委員会

MHLW committee for regenerative medical treatment
再生医療等評価部会

Guideline for Quality, Safety and Efficacy Gene

Therapy Products 遺伝子治療製品の品質、安全性、有効性の指針

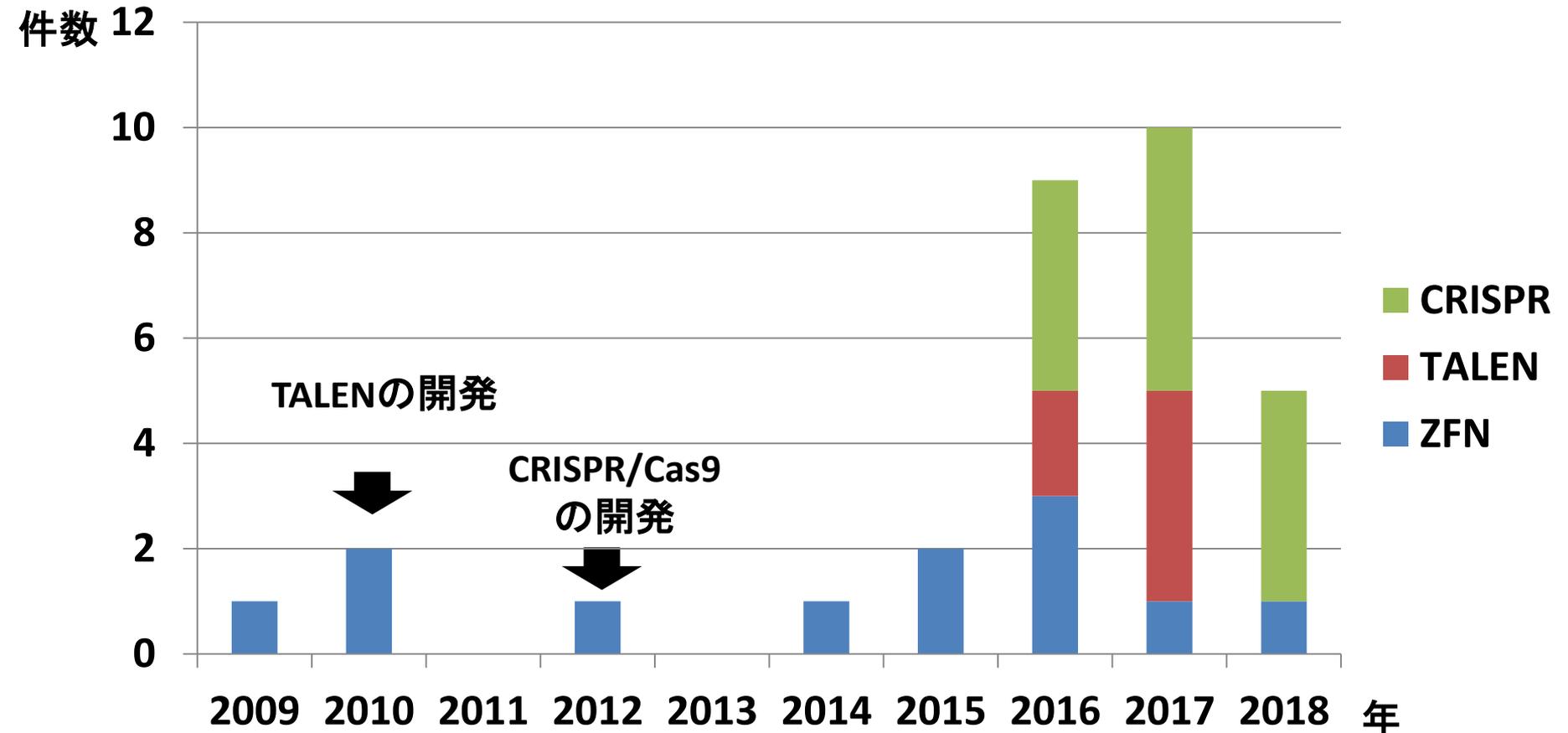
Cover the in vivo and ex vivo Gene Therapy products 遺伝子治療製品全てに適用



Definition : Gene Transfer or Administration of Gene-transferred Cells to Human for the treatment of diseases. 遺伝子治療の定義: 疾病の治療等を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること

Clinical Trials using Gene Editing Tools

(ClinicalTrials.gov, 2018.7のデータより)



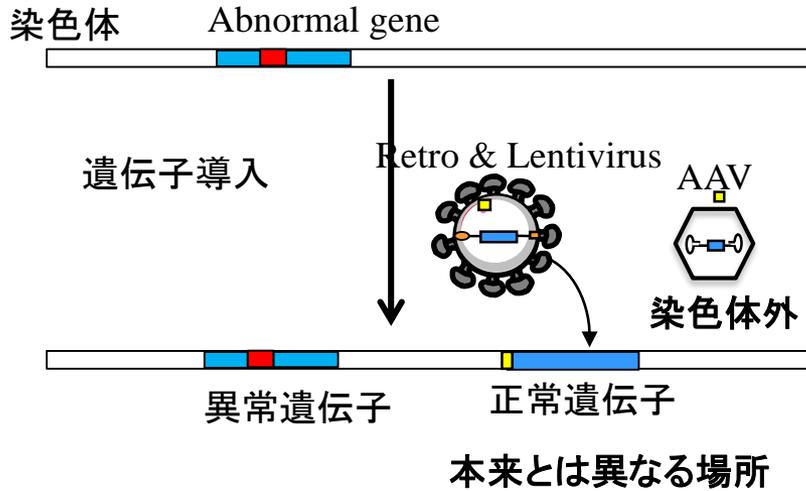
日本ではまだ実施されていないが、海外ではゲノム編集の臨床試験が急増

Clinicaltrial.govに登録済のゲノム編集臨床試験

受理年	対象疾患	状況	ゲノム編集の種類、導入法			標的細胞・組織・臓器	標的遺伝子	ゲノム編集目的	治験段階
			ZFN	アデノ	ex vivo				
2009	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2012	HIV	実施中	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2014	HIV	実施中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	造血幹細胞	CCR5	KO	Phase 1
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2016	血友病B	リクルート中	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ムコ多糖症1型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ALL、CML	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	非小細胞肺癌	実施中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	子宮頸部前がん病変	未実施	ZFN	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV	KO	Phase 1
2016	小児ALL	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	膀胱がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	腎細胞がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	前立腺がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	ムコ多糖症2型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2017	EBウイルス性腫瘍	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	パピローマウイルス性子宮頸部上皮内部腫瘍	未実施	TALEN, CRISPR	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV16, HPV18 E7	KO	Phase 1
2017	食道がん	リクルート中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 2

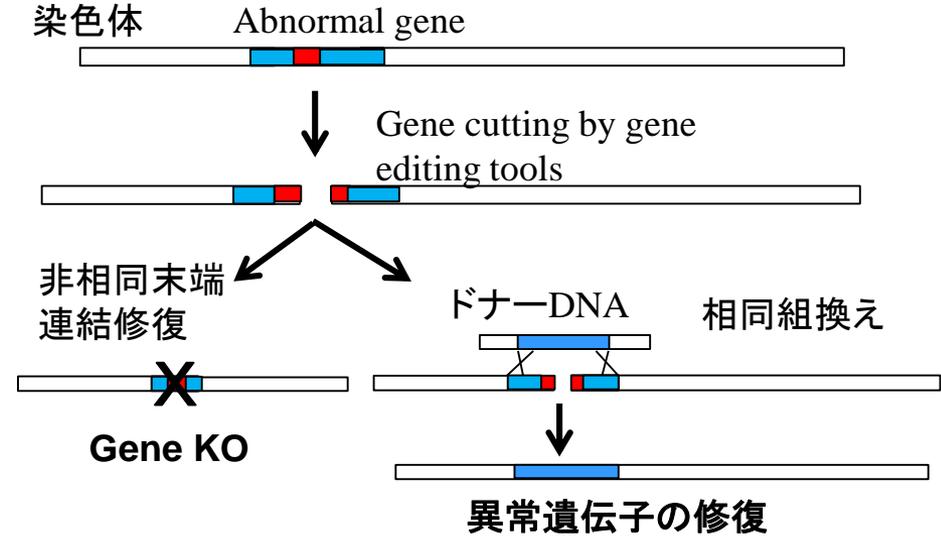
Gene therapy by gene addition ⇔ Human gene editing 遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い

Gene therapy by gene addition



- 遺伝子を補充・付加する治療法
- 異常遺伝子は残る
- 正常遺伝子の組み込み部位は制御不能
→がん化の可能性
- 導入遺伝子の発現調節は困難

Gene therapy by gene editing tool

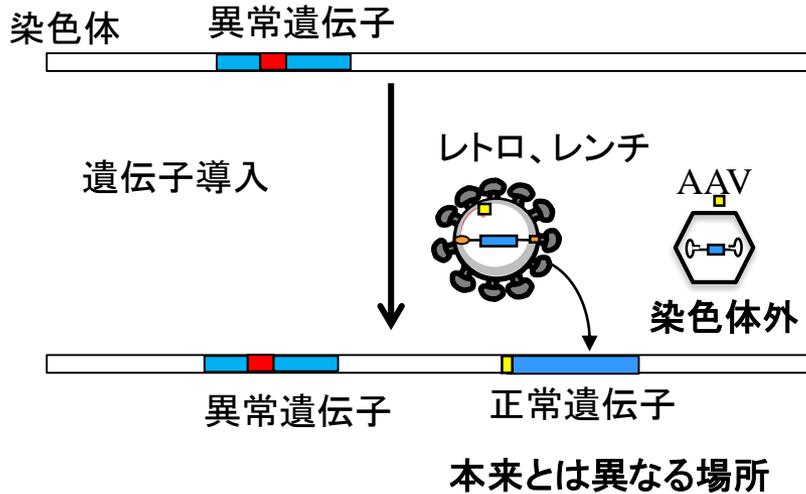


- 異常遺伝子を正常遺伝子に変換可能であれば、究極の遺伝子治療となる可能性
- 目的とする遺伝子の改変効率の低さを克服
- *in vivo*にも利用可能な新しい技術の開発

- 異常遺伝子や特定の遺伝子の機能消失（優性遺伝病の治療）
- がん化を生じない安全な部位への遺伝子導入
- 遺伝子の発現調節も可能

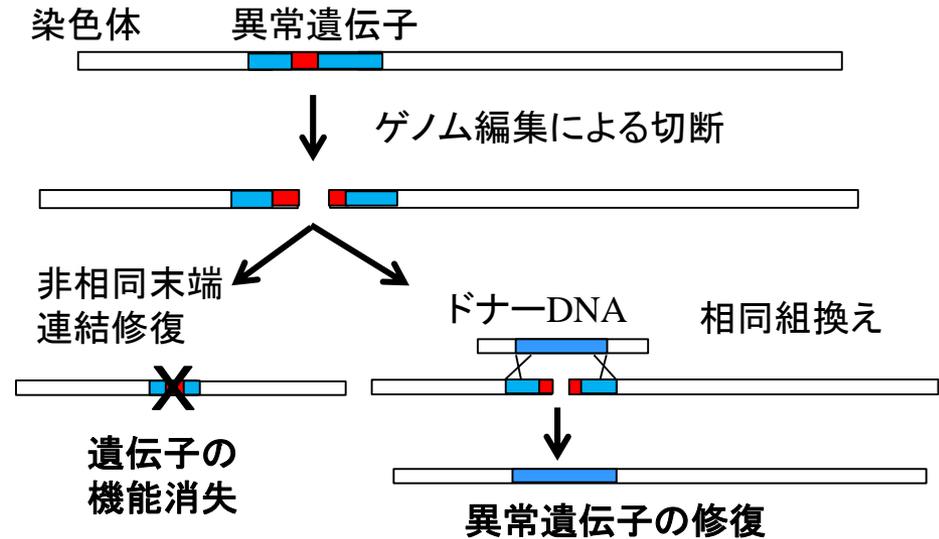
遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い

従来の遺伝子治療



- 遺伝子を補充・付加する治療法
- 異常遺伝子は残る
- 正常遺伝子の組み込み部位は制御不能
→がん化の可能性
- 導入遺伝子の発現調節は困難

ゲノム編集による遺伝子治療



- オフターゲット効果
- 染色体切断に伴う副作用の可能性
- 改変効率を向上させると望ましくない影響も増加

- 実用化にはいくつかの課題
- 従来の遺伝子治療に定義に当てはまらない改変が可能であり、指針の改定も必要

「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の問題点

第一章 総則

第二 用語の定義

— この指針において「**遺伝子治療等**」とは、疾病の治療や予防を目的として**遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること**をいう。

指針Q&A 9: 核酸医薬(オリゴDNA/RNA)の導入は対象外

10: mRNAの導入は対象外

- ベクターを用いるゲノム編集
- 外来遺伝子を導入するゲノム編集

遺伝子治療

- ゲノム編集用酵素をタンパク質やmRNAで導入
- ガイドRNAにオリゴRNA、塩基の書換えにオリゴDNAを用いたゲノム編集

現行指針・Q&A
では対象外



指針に基づく審査が
行われない

CRISPR/Cas9によるヒト受精卵のゲノム編集

- ヒト3前核受精卵のゲノム編集の初めての例

(Protein Cell 2015, 6(5):363–372)

βサラセミアの遺伝子修復治療のモデル実験

βグロビン遺伝子の切断・変異導入

Cas9 mRNA, gRNA, GFP mRNA, ドナーオリゴDNAのマイクロインジェクション

- ヒト3前核受精卵のゲノム編集 2例目

(J. Assisted Reproduction and Genetics 2016, 33; 581–588)

CCR5のノックアウト

Cas9 mRNA, gRNA, ドナーオリゴDNAのマイクロインジェクション

- ヒト正常受精卵ゲノム編集の初めての例

(Mol Genet Genomics: published online March 2017)

βグロビン遺伝子、G6PD遺伝子

Cas9タンパク質、オリゴsgRNA、ドナーオリゴDNAをマイクロインジェクション

ヒト胚をゲノム編集することのリスク

香港大学で開催された国際ヒトゲノム編集サミットで中国の科学者がヒト受精卵のゲノム編集を行い既にふたりの子供が生まれていると報告(2018. 11)
中国の南方科技大学の賀建奎副教授がHIVに感染しないようにヒト胚にゲノム編集を行い2人の女兒が生まれたと報告

Gene editing

Scientist in China defends human embryo gene editing

He Jiankui uses Hong Kong summit to reply to critics of his Crispr-Cas9 trials altering baby DNA for HIV resistance



The Guardianの記事より

▲ He Jiankui says he is proud of the work that has led to the birth of genetically changed twins Nana and Lulu.
Photograph: Imaginechina/Rex/Shutterstock

「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の問題点

第一章 総則

第七 生殖細胞等の遺伝的改変の禁止

人の生殖細胞又は胚の遺伝的改変を目的とした遺伝子治療等臨床研究及び人の生殖細胞又は胚の遺伝的改変をもたらすおそれのある遺伝子治療等臨床研究は、行ってはならない。

これまでCRISPR-Cas9により実施されたヒト受精卵のゲノム編集は、
「遺伝的改変」ではあるが、指針の「遺伝子治療等」には該当しない

内閣府生命倫理専門調査会

- ヒト受精胚へのゲノム編集技術を用いる研究について議論
- 2016年3月中間報告:ヒト受精胚のゲノム編集は基礎研究に限定し、臨床利用は容認できない
- ヒト受精胚ゲノム編集の基礎研究に関する倫理指針等作成の予定はなく、学会等に依存
- 臨床利用できないとする規定は「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」を根拠

ゲノム編集／遺伝子治療医薬品の定義

- ゲノム編集は生物のDNAの改変を可能とする技術である。これらの技術を用いることによりゲノム上の特定部位への遺伝子の挿入、除去、改変が可能である。(NIH National Library of Medicine)
- ゲノム編集とは、ゲノムDNAの特定配列に意図する改変を導入すること (Komor et al, Cell 2017)
- 遺伝子治療医薬品(GTMP)とは、次のような特性を持つバイオ医薬品である (Commission Directive 2009/120/EC)
 - a. 有効成分として組換え核酸を含む製品から構成され、遺伝子配列の制御、修復、置換、挿入、欠失をヒトに引き起す製品
It contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used it of administered to human beings with a view to regulating, repairing, replacing, adding or deleting a genetic sequence
 - b. 治療、予防、診断の効果が製品に含まれる組換え核酸配列に依存するもの、または組換え核酸からの発現産物が寄与するもの
 - c. 遺伝子治療医薬品には感染症予防のためのワクチンは含まれない

EMAの遺伝子治療ガイドライン

● 遺伝子治療用製品の品質・非臨床・臨床ガイドライン

Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (2018.3)

- **ゲノム編集も考慮した改正**
- This guideline is applicable to GTMPs containing recombinant nucleic acid sequences (e.g. DNA vectors) or genetically modified micro-organisms or viruses. **This may including gene editing tools, listed above if they contain recombinant elements, e.g. delivery vectors.**
- EU規制上の遺伝子治療用医薬品(GTMP)の定義からはずれるゲノム編集ツールもあるが、遺伝子治療としての考え方が適用できる

● 遺伝子改変細胞製品の品質・非臨床・臨床ガイドライン(改正案)

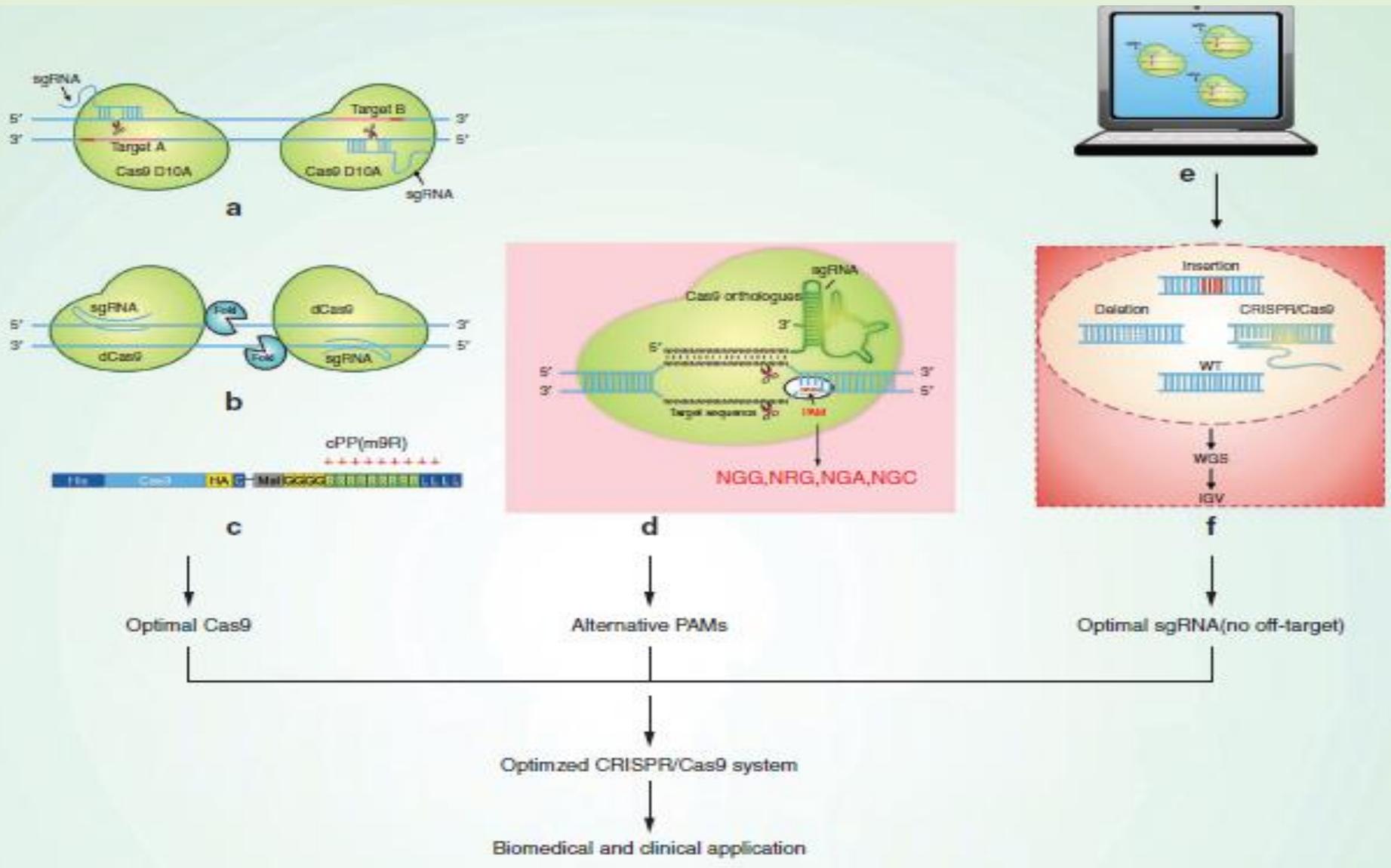
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (Draft, 2018.7)

- **ゲノム編集とCAR-T/TCR-Tを考慮した改正案**
- Genetic modification can be obtained through a variety of methods (e.g. viral & non-viral vectors, mRNA, **genome-editing tools**).

- Current Situation of Gene Editing for Gene Therapy and Adaption of Gene Editing to Guideline for Gene Therapy Clinical Study
- Safety and Quality Issues of Gene Editing Tool

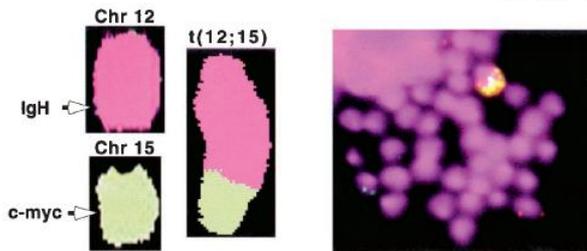
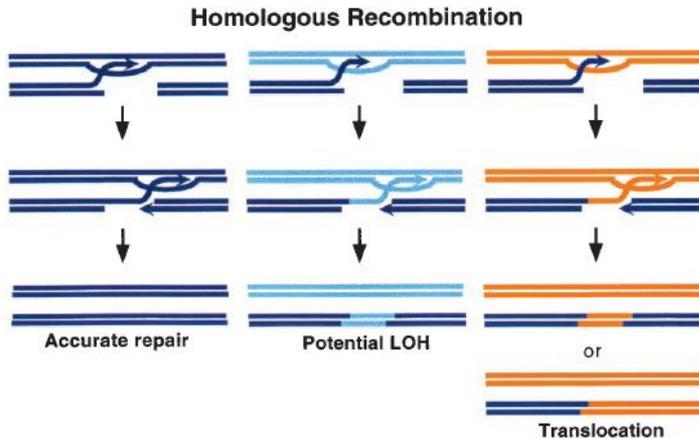
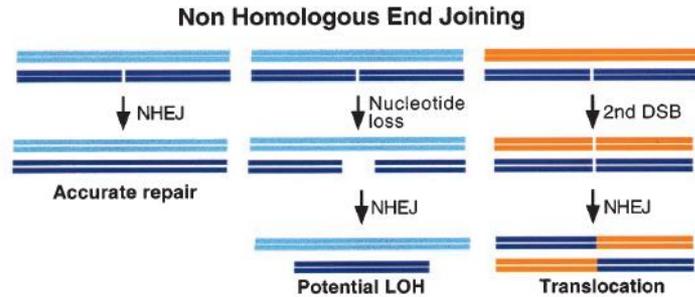
- ゲノム編集技術の現状と遺伝子治療等関連指針の問題点と海外を含めた状況
- ゲノム編集に安全性や品質評価

ゲノム編集の安全性評価: オフターゲット効果評価

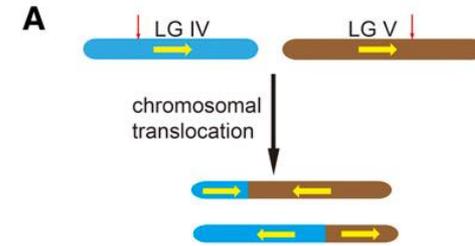


種々の条件下でのCRISPR/Cas9によるOff-targetをWGS解析による解析からCas9、PAM配列、SgRNAの最適化
 Zhang et al : Off-target effect in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. Molecular Therapy-Nucleic Acid.4, e264; 2015

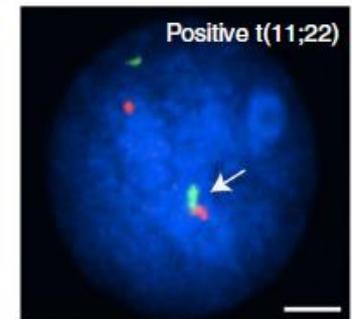
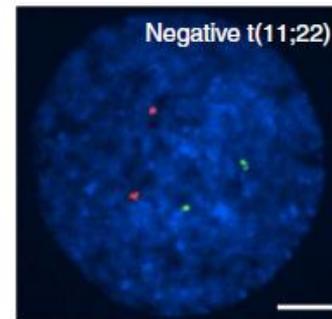
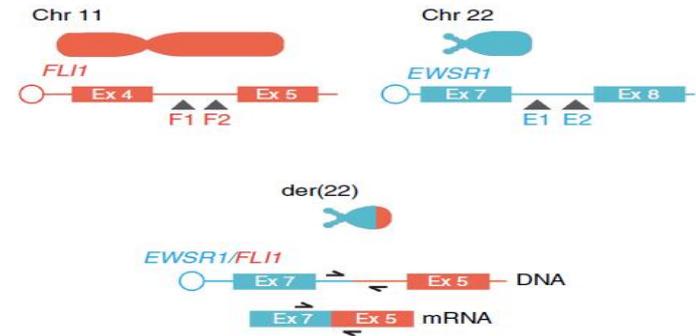
ゲノム編集の安全性評価：染色体転座リスク



Ferguson & Frederick :DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572 (2001)

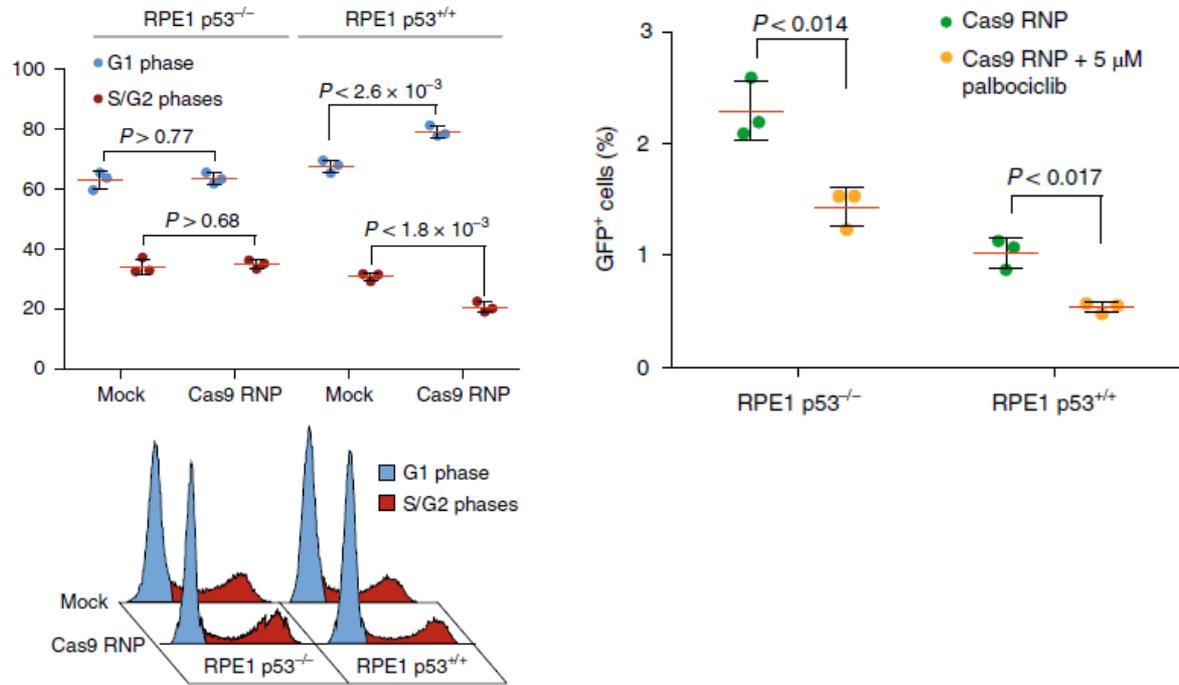


Chen et al: Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 2017



Torres et al: Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR–Cas9 system. *Nature Communications* 2014

CRISPR・CAS9によるゲノム編集はp53によるDNAダメージを引き起す



CRISPR/Cas9によるゲノム編集をがん抑制遺伝子であるp53KOヒト網膜細胞に適用すると効率よくゲノム編集できるが、正常細胞ではクリスパーに対抗してがん抑制遺伝子が働き、編集に失敗しやすいことを報告。P53の影響で細胞が死んだり、増殖が停止するという。著者らは、結果としてがん化の恐れが高い細胞が多く残る可能性がある」と指摘

Haapaniemi et al: CRISPR/Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat. Med. 2018
 Ihry et al: p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells Nat. Med. 2018

ゲノム編集を見据えた遺伝子治療臨床研究指針の改定

Revision of Guideline for Gene Therapy Clinical Study

- タンパク質やmRNA 導入によるゲノム編集技術は、従来の遺伝子治療の定義に合致しない可能性。しかし、短期のみならず長期の安全性について遺伝子治療と同等の評価が必要と考えられる
- EU及びFDA: タンパク質やmRNAを用いたゲノム編集技術も遺伝子治療とする
- 現時点で想定されるゲノム編集技術を用いた遺伝子改変を遺伝子治療とみなすためには、現行の指針の定義等を変更する必要がある。ヒト胚への適用も従来の遺伝子治療と同様に禁止する必要がある。

遺伝子治療臨床研究指針の改正

- 多様なゲノム編集技術 (Gene Editing Tools) について、遺伝子治療と定義に適合するように改正。海外規制当局との動向と調和した改正としている。

厚生労働省「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の改正発出予定(2019. 3)

改正の方向性

- 「遺伝子治療等」及び「最終産物」の定義として、外部から遺伝子を導入せずに行うゲノム編集技術を用いる場合を追加。
- 研究計画書の記載事項として、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療等臨床研究に対応するため、研究計画書に記載すべき事項として、遺伝子の改変に用いるタンパク質、核酸等の情報に関する事項を追加。

改正の方向性	現行
「遺伝子治療等」の定義（第二の一）	
この指針において「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること、 及び特定の塩基配列を標的として人の遺伝子を改変すること又は遺伝子を改変した細胞を人の体内に投与すること をいう。	この指針において「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与することをいう。
「最終産物」の定義（第二の十六）	
この指針において「最終産物」とは、被験者に投与する最終的に作製された疾病の治療又は予防のための遺伝子が組み込まれたDNA 及びこれを含むウイルスその他の粒子（以下「組換え遺伝子等」という。） 、 又は特定の塩基配列を標的として遺伝子を改変するために用いるタンパク質若しくは核酸等 をいう。	この指針において「最終産物」とは、被験者に投与する最終的に作製された疾病の治療又は予防のための遺伝子が組み込まれたDNA 又はこれを含むウイルスその他の粒子（以下「組換え遺伝子等」という。） 等をいう。
研究計画書の記載事項（第十八）	
①～⑦ （略） ⑧ 導入する遺伝子及び遺伝子の導入方法 (1) 開発の経緯 (2) 導入する遺伝子 (3) 遺伝子の導入方法 (4) 被験者に投与する最終産物の組成 ⑨ 遺伝子の改変に用いるタンパク質又は核酸等の情報 <u>(1) 開発の経緯</u> <u>(2) 導入するタンパク質や核酸等</u> <u>(3) 遺伝子の改変の方法</u> <u>(4) 被験者に投与する最終産物の組成</u> ⑩～⑳ （略）	①～⑦ （略） ⑧ 導入する遺伝子及び遺伝子の導入方法 (1) 開発の経緯 (2) 導入する遺伝子 (3) 遺伝子の導入方法 (4) 被験者に投与する最終産物の組成 (新設) ⑨～⑳ （略）

特定の遺伝子発現を制御するための、ヒストン修飾(アセチル化／脱アセチル化、メチル化／脱メチル化)については、

- **遺伝子治療等という言葉の観点**で考えると、直接DNAに作用しないため、**必ずしも遺伝子治療等とはいえないものの**、Cas9酵素の代わりにどのような酵素を使用するか(DNAを修飾する酵素を使用するか、ヒストンを修飾する酵素を使用するか)によって遺伝子治療等への該当の有無が変化することは適切ではなく、また、特定の遺伝子の発現を制御するという点から、遺伝子治療等という範疇でこの指針において取り扱うことも可能である。
- **安全性の観点**で考えると、ヒストン修飾の状態が継続性のあるものかどうかによって、遺伝子治療等への該当性を判断するという考え方もあるが、それが一過的か、継続的かは、実際に検査しなければわからないため、そのような観点で、遺伝子治療等の定義の境界を決めることは困難である。しかしながら、**DNAを切断しないとされるCas9酵素を使用したとしても、DNAを本当に切断しないのかどうか現時点で明らかではなく、オフターゲットも含め、安全性上の課題も残っている。**

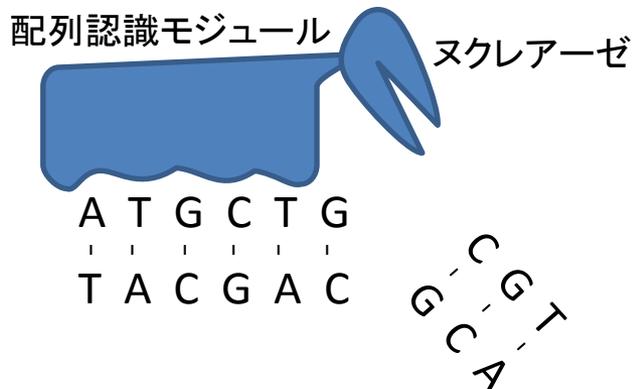
以上のことから、**指針の定義の中では、ヒストン修飾の指針への該当性は明確にせず、当面は、通知等により、遺伝子治療等の定義の中にも含める運用とし、知見を積み重ねて、最終判断するのが適切ではないか。**

なお、**ゲノム編集技術は、日々進歩しているため、固定的に指針の中でそれを定義し、ゲノム編集技術という言葉**を**遺伝子治療等の定義に取り入れることは避けた方がよい。**しかしながら、定義が何を指しているのかについて、研究者や一般国民に分かりやすく伝えるためには、通知等の解説の中でゲノム編集技術という言葉を用いて、改正の趣旨を説明することが適切である。

また、ゲノム編集技術に関わらず、現在想定外の技術まで取り込んだ形で定義することは難しいため、**今後、遺伝子治療等の定義から外れる新たな技術が登場した際には、その都度、検討し、必要に応じ指針の改訂を行うことが必要である。**

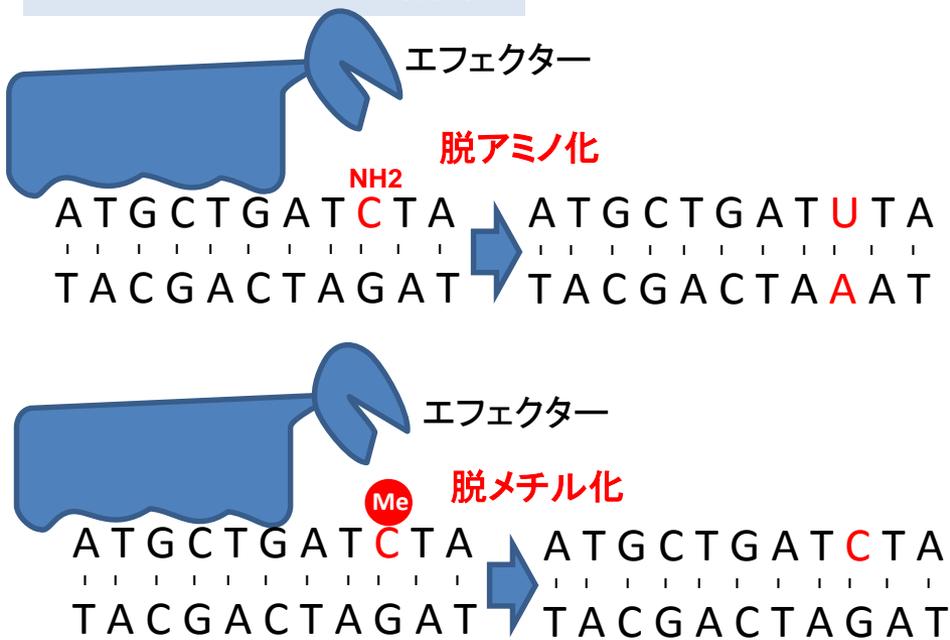
ゲノム編集遺伝子治療の定義と適用範囲

ゲノム編集による遺伝子切断



DNA二本鎖切断 → 欠失／挿入
相同組換え

切断しないゲノム編集



脱アミノ化
(デアミナーゼ) → 点変異
リコンビナーゼ → 組換え

遺伝子改変
に該当

DNAの特異的修飾は
遺伝子治療の範囲

DNAメチル化/
脱メチル化

ゲノム以外の
修飾

遺伝子発現制御

現時点では含めないが
今後の検討課題

ゲノム編集に用いられる技術

Tools for Gene Editing

品質の評価に関する指針

• 改変手段

- ウイルスベクター
- プラスミド
- mRNA
- タンパク質

遺伝子治療指針

mRNA製品については対応指針無し

ICHバイオ医薬品ガイドライン

• 投与方法

- in vivo
- ex vivo (細胞加工物)

遺伝子治療指針

再生医療等臨床研究指針

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が設置(2018年)
- ゲノム編集専門部会においてゲノム編集という新しいToolについて品質や安全性について議論を行いPTCの発出を目指す(2019)
- これまで専門部会で2回の議論を行い、課題についてまとめている
- PTC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を確保する

まとめ

遺伝子治療臨床研究指針

- ゲノム編集技術を用いた治療には、タンパク質やmRNA、オリゴDNAを利用するなど、現行の「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の対象外となるものがある
- ゲノム編集による遺伝子改変の範囲を明確化し、従来の遺伝子治療の定義に当てはまらないゲノム編集により遺伝子改変についても指針に含まれるように改正を行った
- タンパク質やmRNAを用いて遺伝子改変を行う場合の品質や安全性に関して提出すべきデータについて明確にし、ゲノム編集の安全性についても必要なデータを提出するように求めた
- これらの改正は臨床研究法への適合に関する改定と共に発出予定

遺伝子治療臨製品について

- ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療製品について、PMDAの科学院会で品質や安全性に関するPTCをまとめる予定
- これらの改正は臨床研究法への適合に関する改定と共に発出予定