ゲノム編集を用いた遺伝子治療製品の開発状況や安全性評価の在り方について

Current status of gene therapy products using gene editing tool and its safety issues.

金沢工業大学／日本薬科大学
山口照英
国立医薬品食品衛生研空所
内田恵理子

第46回日本毒性学会学術年会

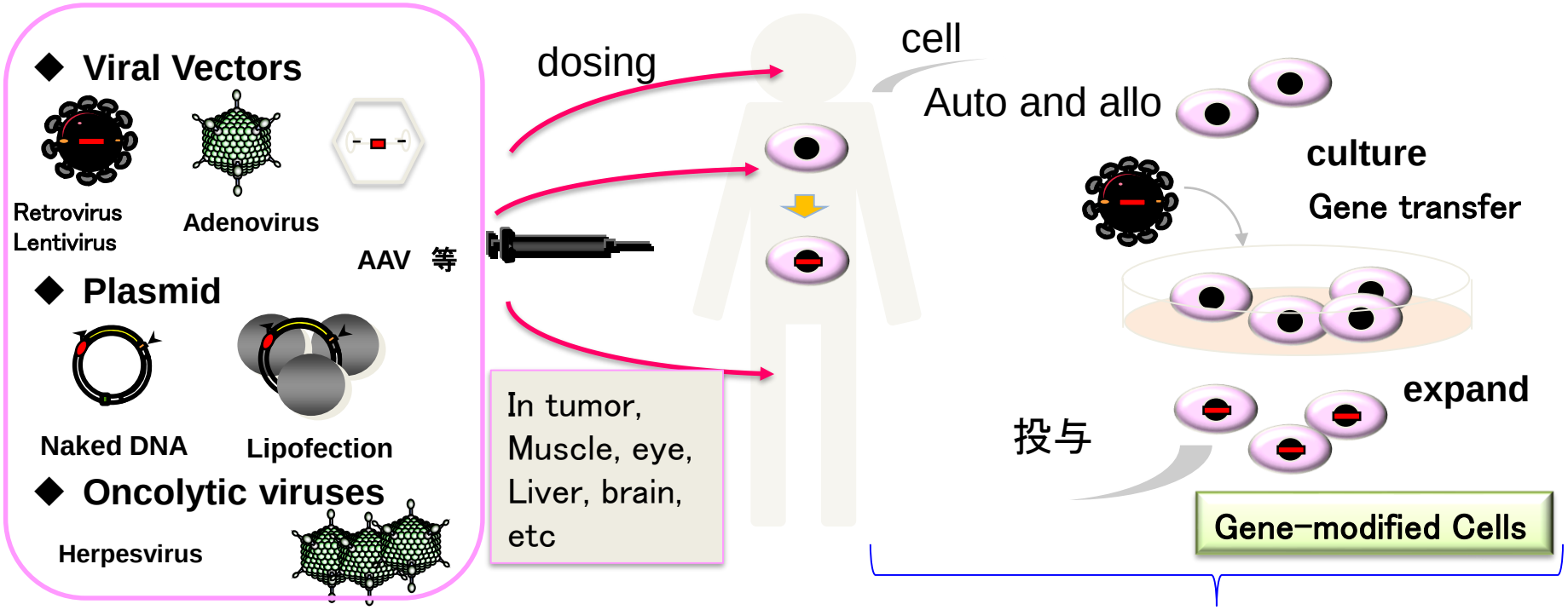
2019.6.27

- 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

- ゲノム編集技術の開発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
- ゲノム編集の安全性や品質評価

Guideline for Quality and Safety of Gene Therapy Products 遺伝子治療製品の品質及び安全性の確保に関する指針

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

遺伝子治療製品の品質・安全性確保に関する指針

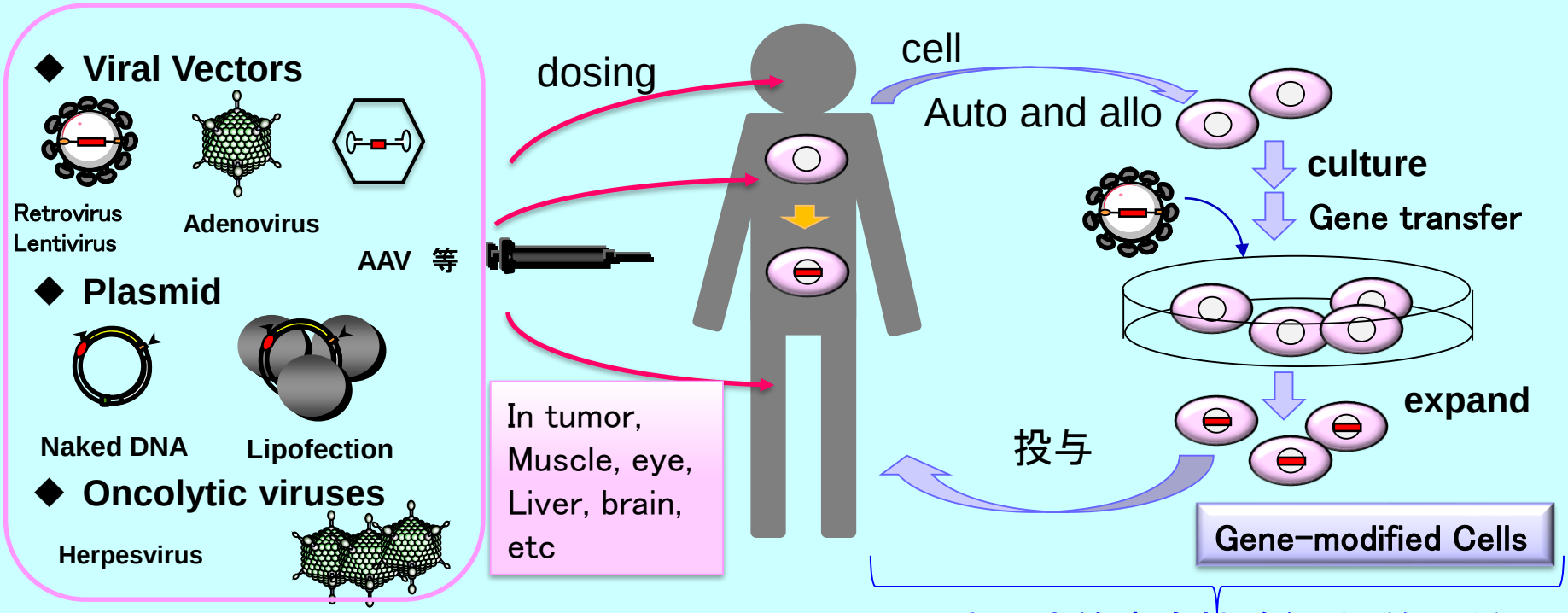
遺伝子治療等臨床研究に関する指針と関連法規（指針で記載されている定義は遺伝子治療製品にも適用される）

in vivo Gene Therapy

指針全体が適用

総則のみ適用

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

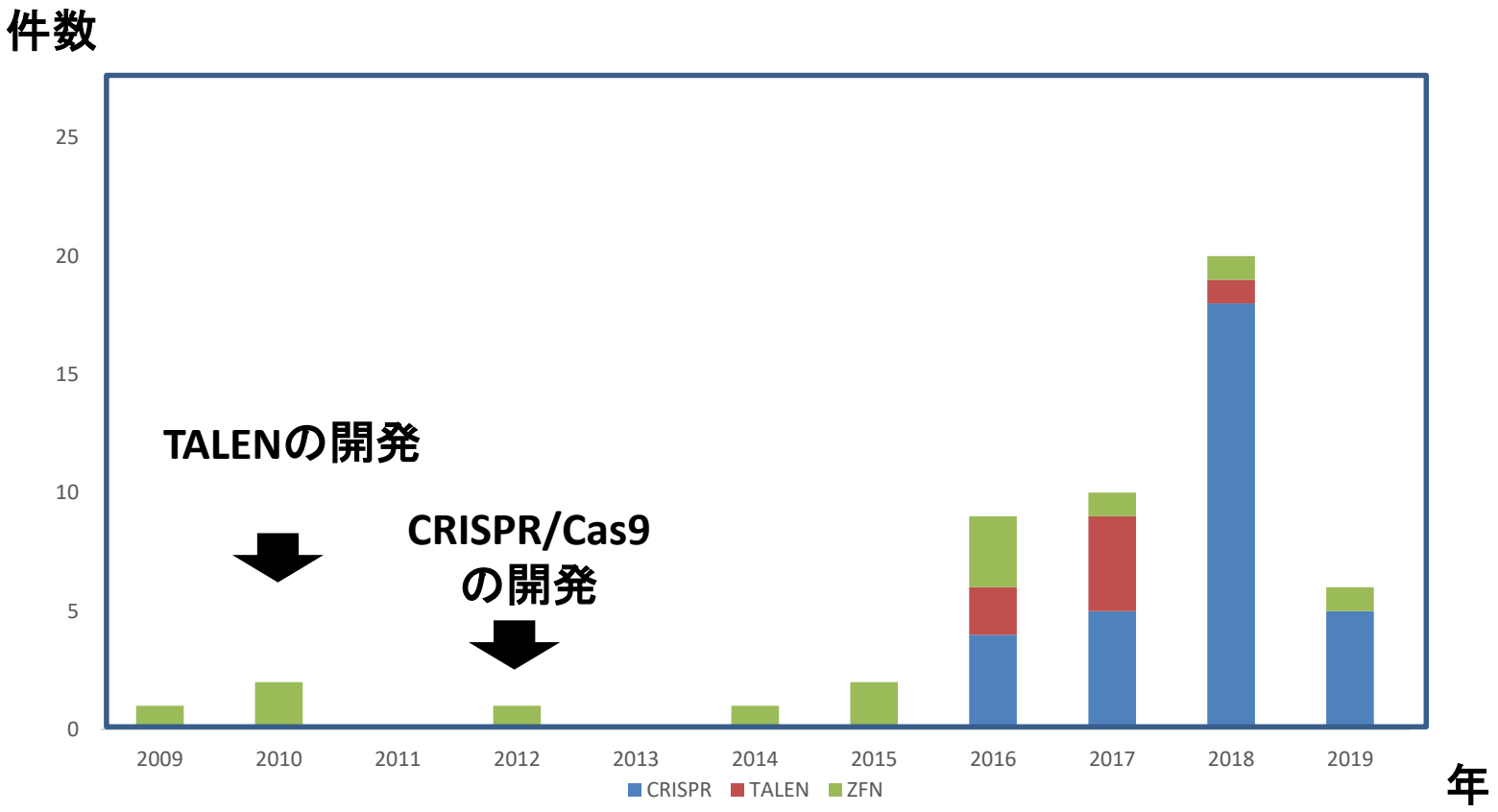
再生医療等安全性確保法（第一種）

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

ゲノム編集治療の臨床試験登録件数

（ClinicalTrials.gov, 2019.6)



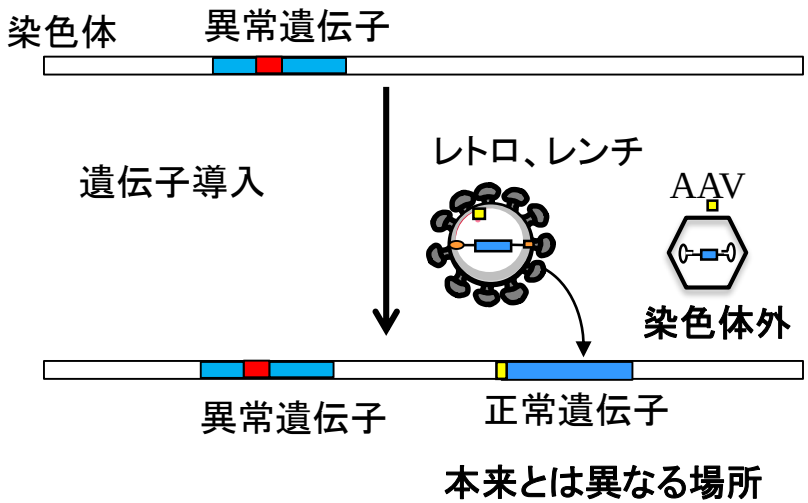
日本ではまだ実施されていないが、海外ではゲノム編集の臨床試験が急増

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
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	非小細胞肺がん	実施中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	子宮頚部前がん病変	未実施	ZFN	plasmid	in vivo	子宮頚部	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頚部上皮内部腫瘍	未実施	TALEN, CRISPR	plasmid	in vivo	子宮頚部	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

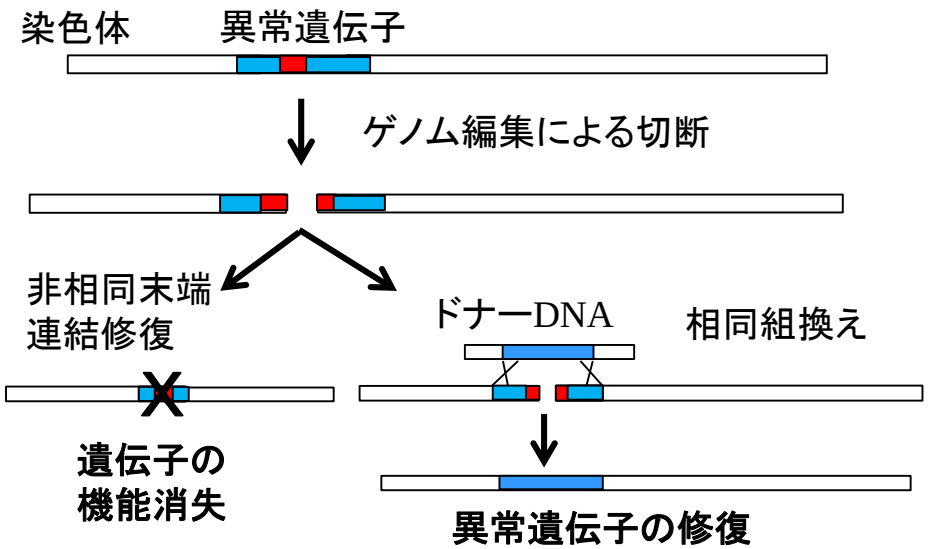
遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い

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

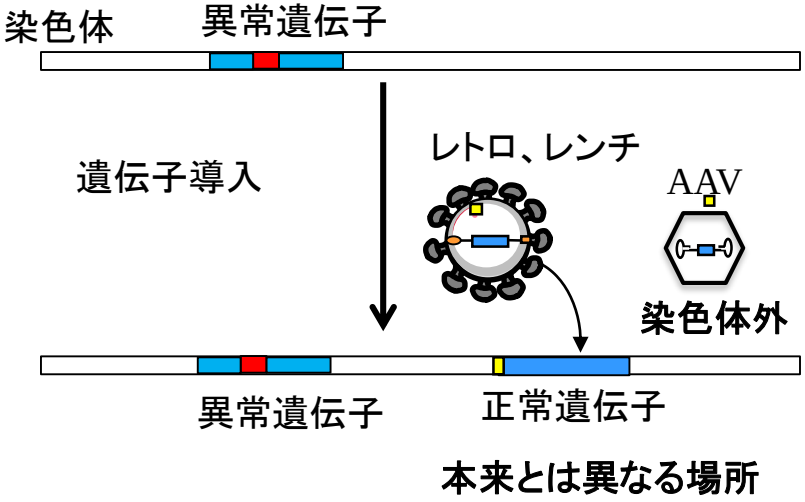


- **異常遺伝子を正常遺伝子に変換可能であれば、究極の遺伝子治療となる可能性**
- **目的とする遺伝子の改変効率の低さを克服**
- **in vivoにも利用可能な新しい技術の開発**

- 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

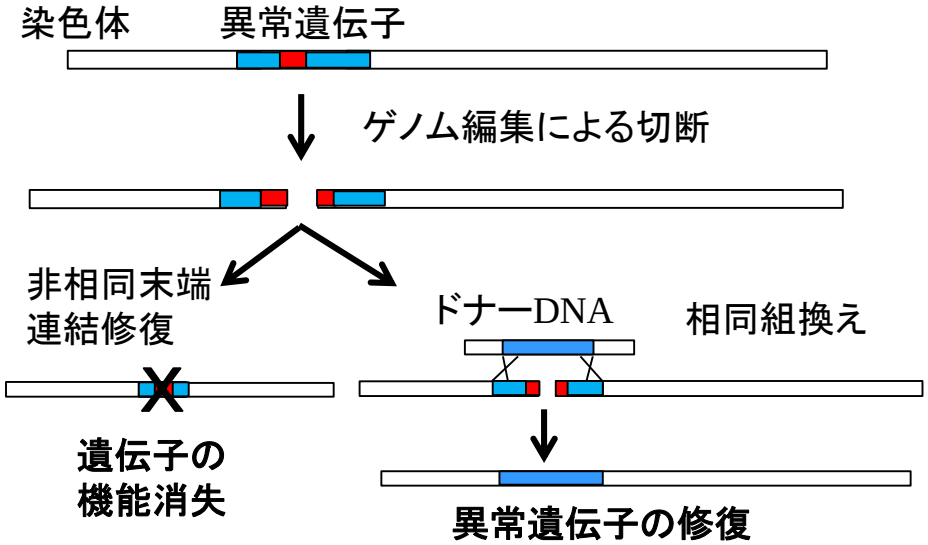
遺伝子治療技術とゲノム編集技術の違い

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
- ■従来の遺伝子治療の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

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

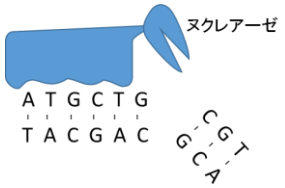
定義の問題にとどまらず、どのようなゲノム編集を遺伝子治療とするかが重要

指針に基づく審査が行われない

ゲノム編集技術のどこまでを遺伝子治療と見なすべきか

「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」における
遺伝子治療の定義についての議論

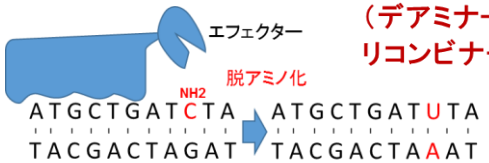
遺伝子切断するゲノム編集



DNA二本鎖切断 → 欠失／挿入
相同組換え

DSBを伴うDNA配列の改変を行う技術は、安全性の観点（オフターゲット効果など）から、遺伝子治療等の定義に含めるべきである。

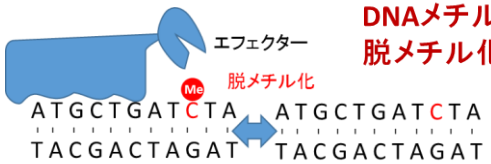
遺伝子切断しないゲノム編集



脱アミノ化（デアミナーゼ） → 点変異
リコンビナーゼ → 組換え

Base-editing

DNA配列の改変を行う技術は、安全性の観点（オフターゲット効果など）から、遺伝子治療等の定義に含めるべきである。



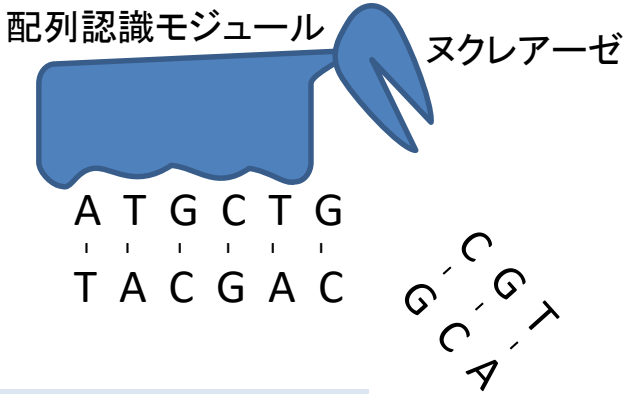
DNAメチル化/脱メチル化 → 遺伝子発現制御

DNA配列を改変しないものの、特定のDNAの修飾（メチル化／脱メチル化）を行っており、遺伝子治療等としても違和感はなく、また安全性上の観点（オフターゲット効果やDNAの切断の可能性の懸念）から遺伝子治療等の定義に含めるべきである。

厚生労働省「第5回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（平成29年10月30日）」資料1p3を参考に作成

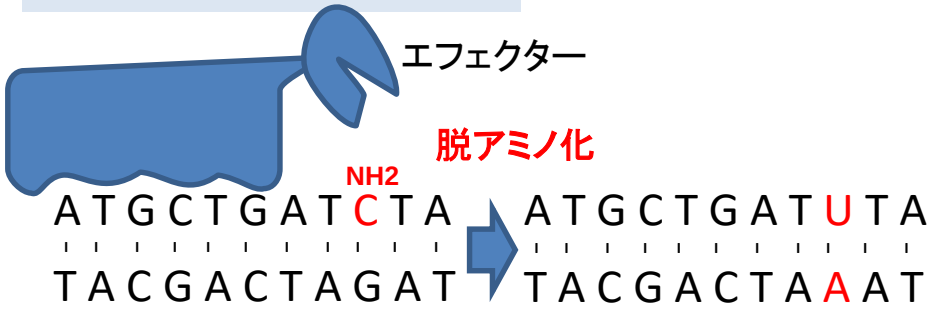
ゲノム編集遺伝子治療の定義と適用範囲

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

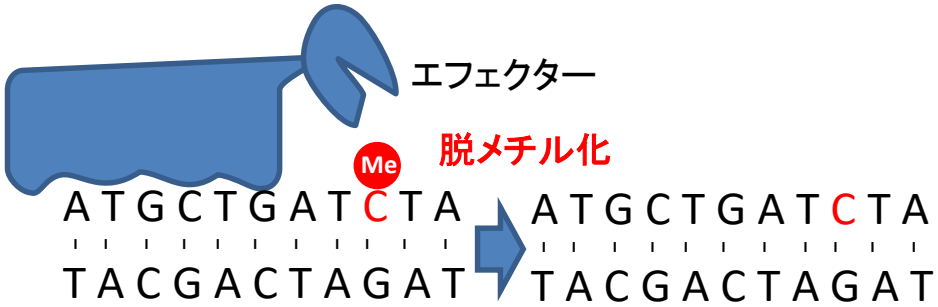
切断しないゲノム編集



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メチル化/
脱メチル化

ゲノム以外の
修飾

→ 遺伝子発現制御

DNAの特異的修飾は
遺伝子治療の範囲

現時点では含めないが
今後の検討課題

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二人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人の女児が生まれたと報告

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

▲ 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

The Guardianの記事より

ICH 見解

「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」(2006.10.25)

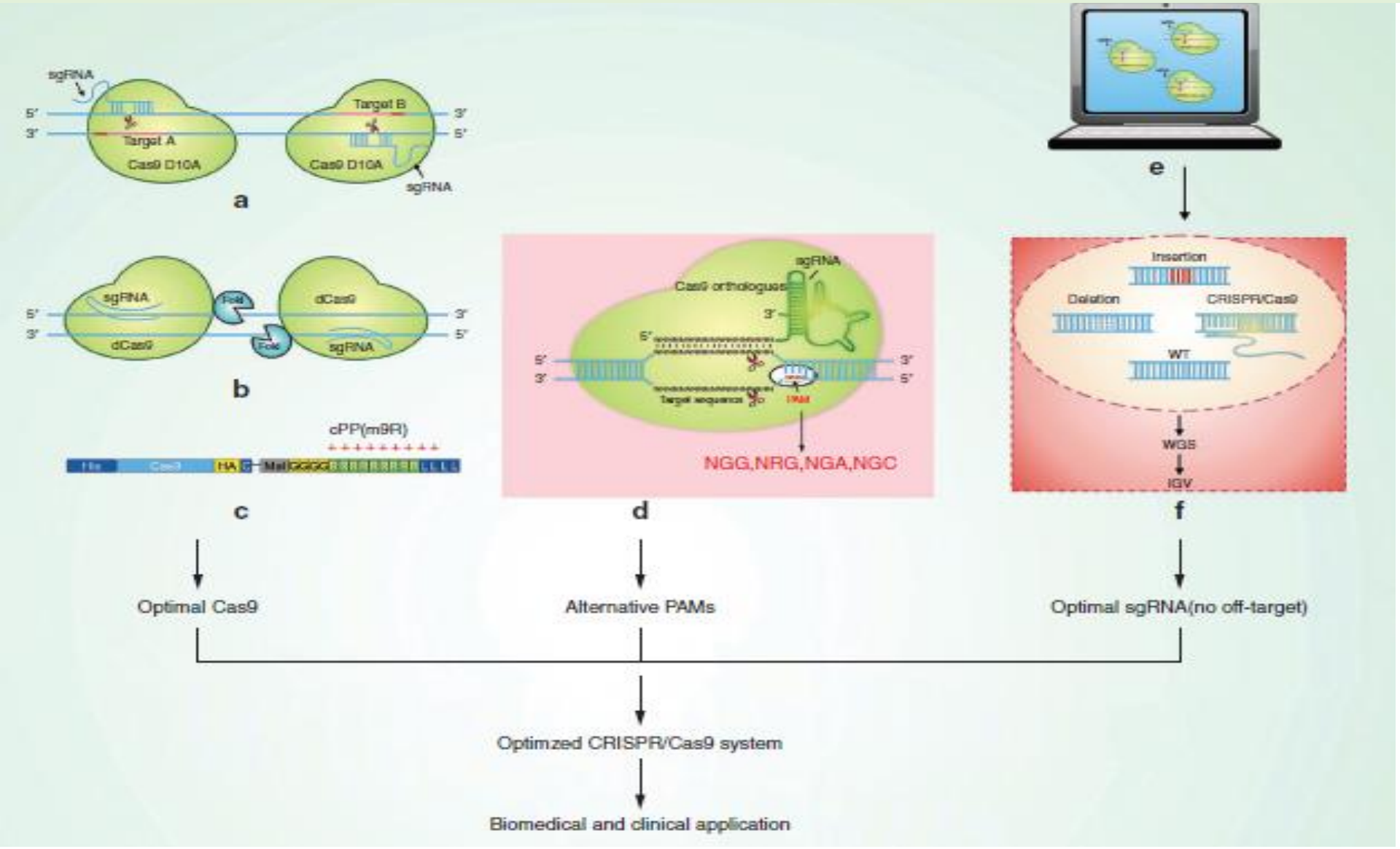
ICH Considerations：General Principles to Address the Risk of Inadvertent Germline Integration of Gene Therapy Vectors

- ICH に参加している規制当局は、現在の科学的、倫理的及び法的な議論に基づき、生殖細胞への直接の遺伝子組み込みを目的とする遺伝子治療の臨床試験は実施すべきではないということで合意している
- さらに各極は、ベクターDNA の次世代への移行につながる可能性のあるものとして、生殖細胞への意図しない遺伝子組み込みリスクを最小にするべきであるということにも同意している

- 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
- ゲノム編集の安全性や品質評価

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

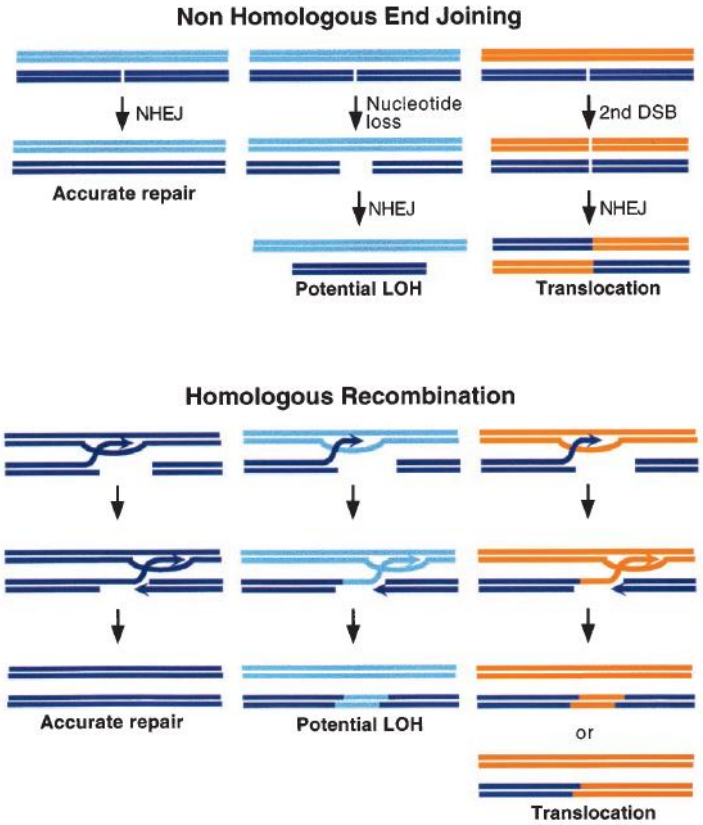
オフターゲット効果のリスク

- オフターゲット結合　転写阻害、転写因子等の結合阻害
- オフターゲット切断　DNA損傷、細胞集遅延、細胞死
- オフターゲット変異　遺伝子機能阻害、**がん化**

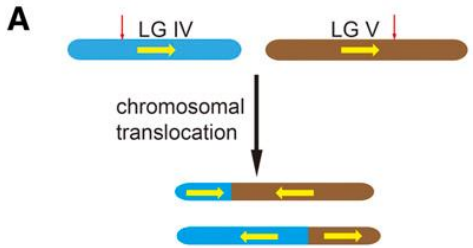
特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント
腫瘍関連遺伝子(Cosmic census + Shibata list)のSNV/Indel 及びコピー数異常(CNV)を評価(iPS/ES細胞等由来細胞の評価に適用）
生労働省医政局研究開発振興課長通知　医政研発0613第3号（2016年）

- アデノウイルスやプラスミド等を用いた遺伝子治療においても低頻度ではあるがゲノム編挿入変異は起きていると考えられている
- 非増殖細胞や分化した細胞、CARTなどのがん治療などでは挿入変異や造腫瘍性についてゲノム変異の解析等を求めることはないのでは

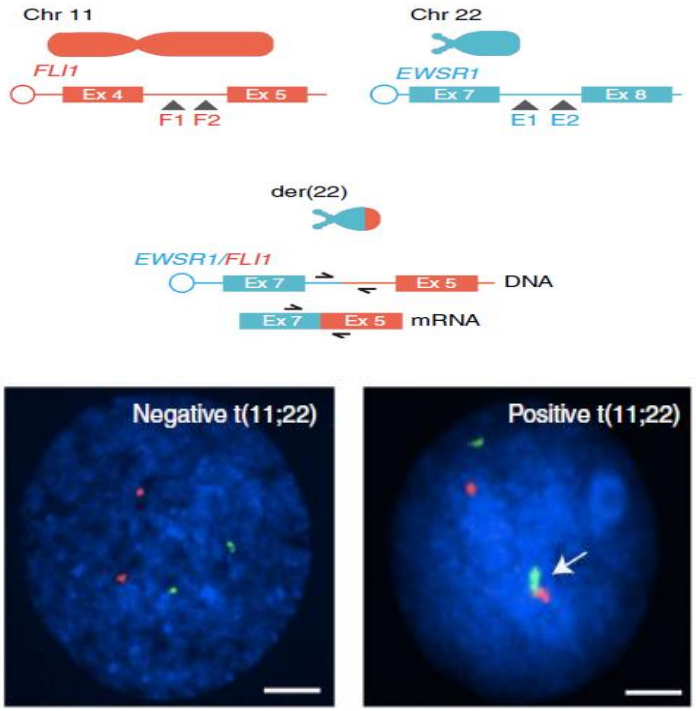
ゲノム編集の安全性評価：染色体転座リスク



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

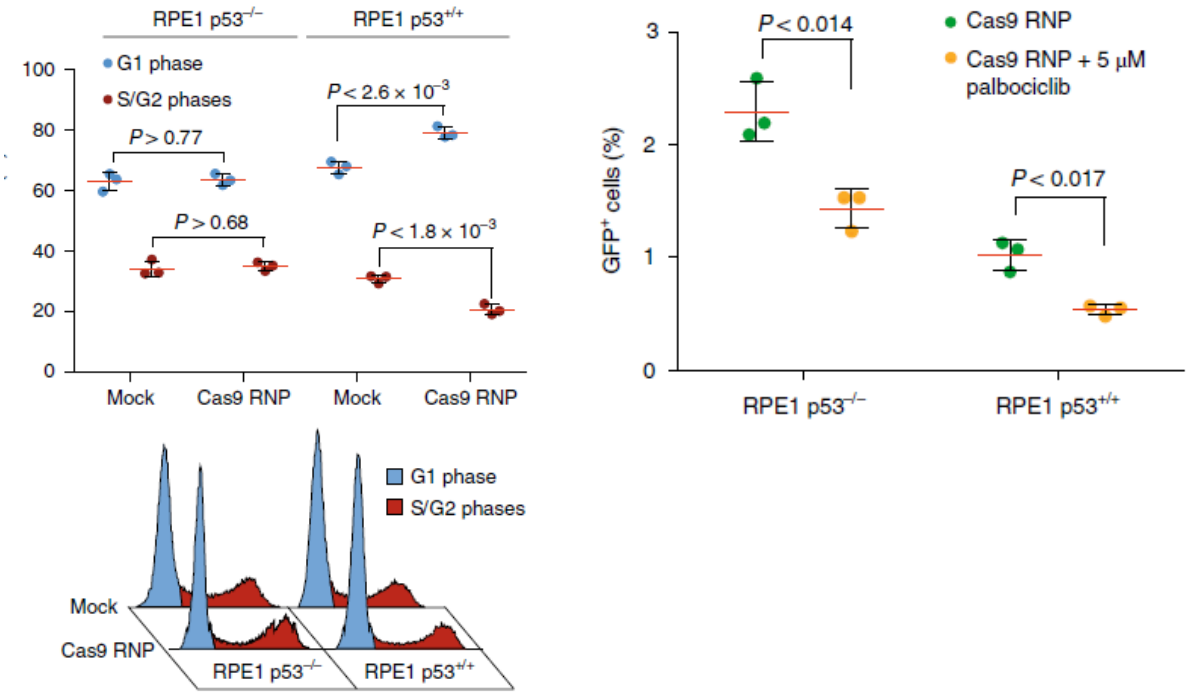


Chen et al:Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in Caenorhabditis elegans. Genome Research 2017



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

がん抑制遺伝子であるP53はCRISPR・CAS9によるゲノム編集を阻害する ⇒ p53がKOされた細胞で下ゲノム編集が起きやすい



CRIPSPR/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

従来のウイルスベクターやプラスミドを用いて遺伝子治療とゲノム編集技術のリスク要因の違い

- 従来の遺伝子治療
  - ウイルスベクター
  - プラスミド

挿入変異
レトロ／レンチウイルス　⇒高
アデノウイルス/プラスミド ⇒低
センダイウイルス　⇒無

- これまで挿入変異によるがん化が認められたのは造血幹細胞
- プロモータの作用が主？
- アデノウイルスやプラスミドでもに低い確率ではゲノムへ挿入されるが挿入部位はランダム

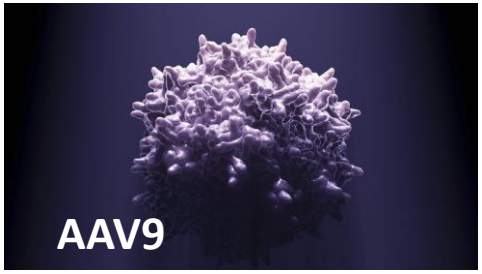
その他の重篤副作用

- **アデノウイルスベクターの大量投与による異常免疫反応により死亡（米・1999年）**
- Gelsinger 事件

AAVベクター開発の契機に

高容量のAAV9を投与した若年のサルやブタで肝臓や神経障害が発症（2018）

ウイルスベクターの大量投与のリスク



ゲノム編集に用いられる技術
Tools for Gene Editing

従来のウイルスベクターを用いた遺伝子治療のリスク＋ゲノム編集の遺伝子改変に伴うリスク

- 改変手段
  - ウイルスベクター
  - プラスミド
  - mRNA
  - タンパク質
- 投与方法
  - ex vivo遺伝子治療
  - in vivo遺伝子治療

従来の遺伝子治療同様ゲノム編集酵素の遺伝子発現にプロモータが使用

主なリスクはゲノム編集による遺伝子改変に付随するリスク

細胞の選択が可能
造血幹細胞への適用は高いリスク
相同組換えではp53等の変異のリスク
非増殖細胞や体細胞では

ウイルスベクターを用いるリスク
ゲノム編集による遺伝子改変に付随するリスク

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コンセプトペーパー（CP)の発出を目指す（2019）
- これまで専門部会で3回の議論を行い、課題についてまとめている
- CP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る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
- 2019年2月に改正大臣告示を発出

遺伝子治療用製品について

- ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療製品について、PMDAの科学委員会で品質や安全性に関するCPを2019年にまとめる予定

EMAのゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の対応

Stance of EU

ゲノム編集医薬品開発の重要課題

- ゲノム編集用ツールの設計の適切性確認
- オンターゲット効果及びオフターゲット変異の解析
  - どのような種類、どの程度の変異がおこるのか
  - オフターゲット変異により起こりえる結果の解析
- 遺伝子改変と提案されている治療効果との相関
- 治療コンセプト（mode-of-action）に依存した有効性を示唆する結果（POC）、薬理効果、in-vivoの生体分布試験など
- 安全性試験：
  - オンターゲット効果やオフターゲット効果の同定、及びゲノム編集ツールの投与の経路等を考慮した一般毒性試験
  - 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

M. Renner: EU regulatory aspects of genome editing改変

Stance of EU

オフターゲットサイトの解析（1）

予測されるオフターゲット部位

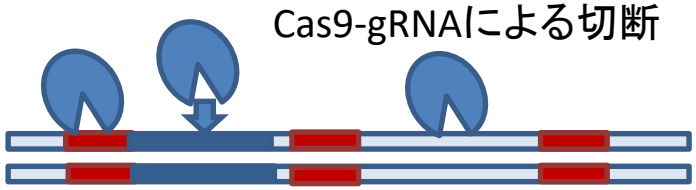
目的とする部位

コンピュータ予測

in-silico解析による数塩基のミスマッチを許容する相同塩基配列の同定、予測（CRISPOR, Cas-Oft-Finder等による解析）

+

Cas9-gRNAによる切断



ターゲット配列のPCR増幅

細胞内あるいはin virto（cell free)でのゲノムワイドで偏りのないオフターゲット切断候補部位の評価（GUIDE-seq、BLESS、CIRCLE-seq等）

評価されたオフターゲット部位

代表的な標的細胞/組織でCasによる変異部位の検出

相同性に基づく方法と基づかない方法により同定されたオフターゲットサイトについて、代表的な細胞種（in vitro and/or in vivo）を用いて次世代シークエンサーやLAM-HTGTSにより解析

LAM-HTGTS: Linear amplification-mediated high throughput genome-wide translocation sequencing

注：改正案には具体的評価法までは記載されていない

M. Renner: EU regulatory aspects of genome editing改変

Stance of EU

オフターゲットサイトの解析（2）

- 評価試験において、Indel（挿入欠失）単独の頻度と（Indel の頻度＋ゲノム編集ツール）を定量
  - 改変した細胞での評価
  - 検出法の感度、閾値の妥当性（ゲノム編集細胞 VS. 細胞）
  - ゲノム編集の様式と編集される遺伝子の大きさの決定
  - オフターゲットゲノム編集によって引き起される事象の評価

- 染色体の転座や欠失の解析
  特に目的としない異なる部位で起きている可能性の解析
  - 例：FISH、核型分析、アレイを用いたゲノムハイブリダイゼーションアッセイ（CGH）

Indel-frequency: ゲノムの挿入ないしは欠失、あるいはその両方の頻度

M. Renner: EU regulatory aspects of genome editingより

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).

米国の遺伝子治療関連ガイドラインとゲノム編集技術への対応

FDAの遺伝子治療関連ガイダンス

- **遺伝子治療製品のIND申請における化学、製造、品質管理情報に関するガイダンス（改正案）**

Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)　(Draft, 2018.7)

- 腫瘍溶解性ウイルスやバクテリアベクター、ゲノム編集、ex vivo遺伝子改変細胞等の新たな製品やCTD（医薬品承認申請のための国際共通化資料）を考慮した改正案
- ゲノム編集特有の記載はほとんどなし

- **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（改正案）**

Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products (Draft, 201.7)

- これまでの遺伝子治療の臨床経験と、ゲノム編集やトランスポゾンベクターなどの新しい遺伝子治療を考慮した改正案
- ゲノム編集技術はオフターゲット変異をゲノムに与える可能性があり、未知の予測不能なリスクを被験者や患者に与えるリスク、遅発性の有害事象を生じるリスクがある
- ゲノム編集技術を用いた場合は全て長期フォローアップ(LTFU)観察を行う必要がある

Stance of FDA　ゲノム編集用製品での安全性評価

- ゲノム編集による遅発性有害事象のリスク要因　(ex vivo, in vivo)
  - ゲノム編集は宿主ゲノムに永続的な変化を与える
  - ゲノム編集は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、悪性腫瘍の誘導などをもたらす可能性がある
  - 組込型ベクターを用いてゲノム編集コンポーネントを導入する場合は挿入変異によるがん化のリスクがある
  - ゲノム編集コンポーネントや発現産物に対する免疫応答の可能性

- 非臨床安全性評価で考慮すべき事項
  - ゲノム編集に用いる技術
  - ex vivoで改変する細胞の種類
  - ゲノム編集コンポーネントのデリバリーに用いるベクター
  - 臨床での投与経路

Stance of FDA　ゲノム編集用製品の臨床での考慮事項

フォローアップ期間：15年間（組込型ベクターと同じ）

1. オフターゲット活性に関する非臨床試験（INDELに関するin vivo, in vitro, in silico解析等）の結果に基づき遅発性有害事象のモニタリング計画を立案すること
（例：肝細胞でがん抑制遺伝子に影響する場合、フォローアップ観察に肝がん発生の評価のモニタリング計画を組み込む）

2. 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

3. ゲノム編集の標的組織を直接モニタリングすることが困難な場合（脳など）、ゲノム編集用製品の効果について代替案を提案すること

4. オフターゲット活性とオンターゲット活性の量比を求め、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フォローアップ計画を立てること

5. ゲノム編集用製品を全身投与する場合、臨床での安全性モニタリングは標的組織・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も調べること

まとめ

- 欧米は、ゲノム編集技術を考慮した遺伝子治療関連ガイドラインの改正（案）を2018年に公表
- 欧米共に、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るが、ゲノム編集特有の考慮事項もある、としている
- 欧州は、ex vivo遺伝子改変細胞製品のガイドライン改正案に、ゲノム編集による遺伝子改変細胞に対する考慮事項を詳細に提示
- 米国は、長期フォローアップガイダンスの改正案で、ゲノム編集はゲノムに永続的な改変をもたらすことから、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る