

国立国会図書館 調査及び立法考査局

Research and Legislative Reference Bureau
National Diet Library

論題 Title	ゲノム編集技術の医療への応用とその課題
他言語論題 Title in other language	Current Issues in the Application of Genome Editing Technology to Medical Care
著者 / 所属 Author(s)	三谷 幸之介 (MITANI Konosuke) / 埼玉医科大学医学部教授
書名 Title of Book	ゲノム編集の技術と影響 科学技術に関する調査プロジェクト報告書 (Genome-Editing Technology and Its Impact)
シリーズ Series	調査資料 2020-5 (Research Materials 2020-5)
編集 Editor	国立国会図書館 調査及び立法考査局
発行 Publisher	国立国会図書館
刊行日 Issue Date	2021-03-30
ページ Pages	89-100
ISBN	978-4-87582-876-1
本文の言語 Language	日本語 (Japanese)
摘要 Abstract	ゲノム編集治療のこれまでの代表的な前臨床及び臨床試験を紹介するとともに、ゲノム編集技術に特有で、近年明らかになってきた技術的な課題について解説する。

* この記事は、調査及び立法考査局内において、国政審議に係る有用性、記述の中立性、客観性及び正確性、論旨の明晰（めいせき）性等の観点からの審査を経たものです。

* 本文中の意見にわたる部分は、筆者の個人的見解です。

ゲノム編集技術の医療への応用とその課題

埼玉医科大学医学部
教授 三谷 幸之介

目 次

はじめに

- 1 遺伝子治療モデルでの前臨床試験の現状
- 2 これまでの臨床試験の結果
- 3 ゲノム編集の効率と治療効果
- 4 人工ヌクレアーゼによるオフターゲット変異
- 5 免疫応答
- 6 リスクベネフィットから考える対象疾患

おわりに

【要 旨】

ここ数年、日米欧における遺伝子治療薬の承認が進み、遺伝子治療が再び脚光を浴びるようになった。それと並行して、ゲノム編集技術の進歩により、従来の遺伝子治療（いわゆる遺伝子付加治療）では困難であった遺伝子ノックアウトや正確な遺伝子修復による治療戦略も可能になっている。海外では既に約 50 のゲノム編集治療の臨床試験が行われており、安全性だけでなく治療効果が示されたプロトコルもある。一方、ゲノム編集の臨床応用には、従来の遺伝子治療の持つ遺伝子導入効率やベクター・治療遺伝子に対する免疫応答などの課題に加えて、人工ヌクレアーゼのオフターゲット活性などによる DNA 変異導入のリスクや人工ヌクレアーゼに対する免疫応答など、ゲノム編集技術に特有の課題が加わる。より広範な疾患に対する治療法として確立するために、さらなる技術の開発の余地がある。本稿では、ゲノム編集治療のこれまでの代表的な前臨床並びに臨床試験の現状を紹介するとともに、明らかになってきた技術的な課題について解説する。

はじめに

元来、遺伝子治療は、遺伝病の患者に対して生まれつき欠けている遺伝子を薬として投与することで機能を補い治療する、という概念でスタートした。治療遺伝子の標的臓器への導入は、主にウイルスに由来するベクターと呼ばれる運び道具によって導入される。染色体に組み込まれた DNA は安定に保たれるので、繰り返し投与が必要なタンパク補充療法や対症療法と比べ、一回の治療で一生効果が得られる可能性から、大きな期待を集めた。遺伝病に対する遺伝子治療の最初の臨床応用は、1990 年に米国国立衛生研究所（NIH）において核酸の代謝に関わる酵素の遺伝子を持たないために重症複合免疫不全を発症するアデノシンデアミナーゼ欠損症の患者に対して行われた。当時はまだ造血幹細胞に遺伝子を導入する技術がなかったために、遺伝子導入がより容易であるが細胞の寿命も短い T 細胞（リンパ球の一種で免疫を担う）に遺伝子が導入されたが、意外にも長期的な治療効果が得られた⁽¹⁾。同様に、1990 年代には肝臓や肺の遺伝病に対する遺伝子治療も臨床で試みられたが、いずれも遺伝導入効率やベクターへの免疫応答などの問題のために治療効果が持続せず失敗した。また、遺伝病に対してだけでなく、がん細胞へ自殺遺伝子を導入して殺したり、がん抑制遺伝子を補ったりする戦略のがん遺伝子治療もスタートしたが、やはり、遺伝子導入効率の低さから成功しなかった。

しかし、2000 年には（X 染色体上の変異により先天的に免疫系に重篤な障害を生じる）X 連鎖重症複合免疫不全症（X-linked severe combined immunodeficiency: SCID-X1）の患者において、初めて遺伝子治療だけで治療効果が得られて正常な生活を送れるようになるという、ビッグニュースがあった（それまでの遺伝子治療臨床試験は、倫理的観点から、遺伝子治療以外の治療も併用されていた⁽²⁾）。

他方、1999 年に米国ペンシルバニア大学で肝臓の遺伝病の患者がアデノウイルスベクター投与の副作用で死亡した⁽³⁾。また、SCID-X1 の遺伝子治療においても、一部の患者で治療に用いられたレトロウイルスベクターががん遺伝子の近傍に組み込まれることにより生じた白血病

* 本稿におけるインターネット情報の最終アクセス日は、令和 3（2021）年 1 月 27 日である。

(1) R M. Blaese, "Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency," *Pediatric Research*, 33 (1 Suppl.), 1993.1, pp.49-53.

(2) Marina Cavazzana-Calvo et al., "Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease," *Science*, 288(5466), 2000.4, pp.669-672.

が2003年に報告されて、大きな問題となった⁽⁴⁾。

その後、日本において遺伝子治療研究は下火となり、iPS細胞を中心とする幹細胞の治療応用に向けた研究が注目を浴びはじめた。一方、欧米においては遺伝子導入技術の開発と改良、ゲノムプロジェクトの進展による様々な疾患の遺伝子レベルでの病因解明、宿主の免疫応答の理解、など医学生物学全般の進歩により、続々と新たな遺伝子治療プロトコルが、最初は小動物、次に大型動物を用いた前臨床試験で成功するようになった。さらに、臨床試験における成功の積み重ねの結果、欧米初の遺伝子治療薬である2012年のGlybera（家族性リポ蛋白質リパーゼ欠損症（原発性高カイミクロン血症、合併症として急性膵炎を招く）治療用アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus: AAV）ベクター）から2019年のZynteglo（ β サラセミア（グロビン遺伝子の異常により正常なヘモグロビンが生成されず貧血等を招く）治療用レンチウイルスベクター）まで、欧米そして日本においても次々と遺伝子治療薬が承認され始めている⁽⁵⁾。その結果、遺伝子治療は日本でもようやく再び脚光を浴びるようになった。

従来の遺伝子治療技術は、多くの場合は治療遺伝子を細胞に入れてタンパク質を作らせる、遺伝子付加治療とも言えるものである。一方、ゲノム編集では染色体DNA上の狙った配列を効率良く切断することにより、その部分のDNA修復を活性化して染色体を改変する。標的DNAに二本鎖切断を導入した後の修復の形式としては、比較的に不正確な非同源末端結合（non-homologous end-joining: NHEJ）と、切断と同時に標的染色体配列に相同なDNA配列を鋳型として導入することで正確に修復・改変する相同組換え修復（homology-directed repair: HDR）とがある。特に、NHEJを利用すれば、これまでの遺伝子治療技術では不可能であった遺伝子ノックアウトを比較的高い効率で達成でき、遺伝子治療の適用疾患が大きく広がった。また、HDRを利用すれば、従来の遺伝子付加治療とは異なり正確に変異を修復でき、安全で安定した遺伝子発現が期待される染色体部位（genomic safe harbor 部位とも呼ばれる⁽⁶⁾）への治療遺伝子の組み込みも可能となる。

ゲノム編集技術は瞬く間に医学生物学の分野で、広く基礎研究に使われるようになった。遺伝子治療の一技術としても、特に、遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインを利用したゲノム編集治療は、後述するように既に臨床試験に入っている⁽⁷⁾。最近注目を集めている、染色体DNAに二本鎖切断を導入せずに一塩基置換を可能にするbase editor（塩基編集）や数十塩基の欠失や挿入を可能にするprime editorといった新たなゲノム編集ツールも、近い将来に臨床で用いられることになろう⁽⁸⁾。

1 遺伝子治療モデルでの前臨床試験の現状

前臨床研究の報告を元に、ゲノム編集の治療モデルでの現状について紹介する。例えば、ヒ

(3) Suryanarayan Somanathan et al., "Adenovirus-Antibody Complexes Contributed to Lethal Systemic Inflammation in a Gene Therapy Trial," *Molecular Therapy*, 28(3), 2020.3, pp.784-793.

(4) S. Hacein-Bey-Abina et al., "LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1," *Science*, 302(5644), 2003.10, pp.415-419.

(5) High K.A. and Roncarolo M.G., "Gene Therapy," *New England Journal of Medicine*, 381(5), 2019.8, pp.455-464.

(6) Sadelain M. et al., "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome," *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 2011.12, pp.51-58.

(7) Ernst M.P.T. et al., "Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease," *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 18, 2020.9, pp.532-557; Mullard A., "Gene-editing pipeline takes off," *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(6), 2020.6, pp.367-372.

(8) Doudna J.A., "The promise and challenge of therapeutic genome editing," *Nature*, 578(7794), 2020.2, pp.229-236.

トの CD34 陽性造血幹前駆細胞（自己複製しつつ血液細胞への分化能を持つ）における *ex vivo* ゲノム編集（体外に取り出した細胞にゲノム編集を施した後に体内に戻す方法）に関しては、NOG/NSG 超免疫不全マウス（拒絶反応を起こさずヒト細胞の移植を可能としたマウス）に一次・二次移植して後にマウス血液中に検出される、本当の幹細胞により近いヒト由来細胞集団で評価される。現在は、この種の標的細胞に対しては、最も有名ながん抑制遺伝子であり、DNA 修復、細胞増殖サイクル、アポトーシスなどを制御する p53 遺伝子の一過性の阻害などの様々な工夫を加えることで、遺伝子ノックアウトに関しては 90% を越える細胞で、HDR についても 50% の効率で可能であることが報告されている⁽⁹⁾。例えば、SCID-X1 においては、正常造血幹細胞が患者体内で 10% の割合で存在すればその増殖優位性によって治療効果が得られることが、これまでの骨髄移植や従来の遺伝子治療の例から知られている。したがって、これらの疾患ではこの遺伝子修復効率でも十分に治療効果が期待される。

一方、肝臓においては、マウスでの *in vivo* ゲノム編集（生体内での直接のゲノム編集法）モデルにおいて脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle: LNP）を用いて CRISPR-Cas9 を導入することによって、83% という高頻度で NHEJ が得られている⁽¹⁰⁾。さらに、サル肝臓においてもメガヌクレアーゼという種類の人工ヌクレアーゼを AAV ベクターで導入することによって、約 40% の効率で NHEJ による遺伝子ノックアウトが得られている⁽¹¹⁾。HDR に関しては、AAV ベクターを用いた CRISPR-Cas9 の導入で、マウスの成獣で 1.4~9% の効率で得られているが⁽¹²⁾、一般に、新生児であればその効率は更に高くなることが期待される⁽¹³⁾。また、驚くべきことに、base editor をマウスへ AAV で導入することによって、肝臓の 38% を筆頭に様々な臓器で HDR よりも高い頻度で 1 塩基置換が得られている⁽¹⁴⁾。

筋肉では HDR の効率はまだまだかなり低いが、筋ジストロフィーモデル動物において、変異の入ったエクソン（DNA でタンパク質合成に必要な情報を持つ部分）を、両側を認識する 2 つのガイド RNA（gRNA）で切り出すか、NHEJ でスプライスアクセプター（mRNA を作る際にエクソンの合成に必要な塩基配列）部位を壊して変異エクソンをスキップする方法で、治療効果を得る研究が行われている。その結果、AAV を用いた全身投与において、マウスでは約 20%⁽¹⁵⁾、イヌでは 5~10%⁽¹⁶⁾、ブタでは 5~20%⁽¹⁷⁾ の DNA レベルでの効率で期待するゲノム編集が得られ、ある程度の治療効果が見られた。DNA レベルでの効率は低くても、筋繊維

(9) Pavel-Dinu M. et al., "Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells," *Nature Communications*, 10(1), 2019.4, p.1634; Ferrari S. et al., "Efficient gene editing of human long-term hematopoietic stem cells validated by clonal tracking," *Nature Biotechnology*, 38(11), 2020.11, pp.1298-1308.

(10) Yin H. et al., "Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing," *Nature Biotechnology*, 35(12), 2017.12, pp.1179-1187.

(11) Wang L. et al., "Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol," *Nature Biotechnology*, 36(8), 2018.9, pp.717-725.

(12) Krooss S.A. et al., "Ex Vivo/In vivo Gene Editing in Hepatocytes Using "All-in-One" CRISPR-Adeno-Associated Virus Vectors with a Self-Linearizing Repair Template," *iScience*, 23(1), 2020.1, p.100764.

(13) Yang Y. et al., "A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice," *Nature Biotechnology*, 34(3), 2016.3, pp.334-338.

(14) Levy J.M. et al., "Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses," *Nature Biomedical Engineering*, 4(1), 2020.1, pp.97-110.

(15) Zhang Y. et al., "Enhanced CRISPR-Cas9 correction of Duchenne muscular dystrophy in mice by a self-complementary AAV delivery system," *Science Advances*, 6(8), 2020.2, eaay6812.

(16) Amoasii L. et al., "Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy," *Science*, 362(6410), 2018.10, pp.86-91.

(17) Moretti A. et al., "Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy," *Nature Medicine*, 26(2), 2020.2, pp.207-214.

は多核細胞なので、細胞単位若しくは組織全体として治療効果が表れやすい、という利点がある。

さらに最近、AAVによる base editor の全身投与による早老症（早期老化症、老化が実年齢より早く全身に見られる遺伝病）のモデルマウスのゲノム編集治療が報告された⁽¹⁸⁾。様々な臓器で20~60%の効率で点変異が修復されて疾患マウスの寿命も2倍に伸び、ヒトへの応用まではまだ時間がかかると予想されるが、大きな可能性を感じさせる研究である。このように動物レベルでは、様々なタイプのゲノム編集治療法の有効性が示されつつある。

2 これまでの臨床試験の結果

ヒトに対しても、比較的低いゲノム編集効率でも治療効果が得られそうなプロトコールについて、少しずつ臨床研究が進められている。現在進行中の臨床応用の代表例として、後天性免疫不全症候群（AIDS）の治療や（T細胞にキメラ抗原受容体を導入しがん細胞を攻撃する）ユニバーサルキメラ抗原受容体発現T細胞（chimeric antigen receptor-T cell: CAR-T）の樹立が挙げられる。前者は、ヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus: HIV）の感染に必須のCCR5共受容体遺伝子をZFN若しくはCRISPR-Cas9を用いてノックアウトすることによって、これらCCR5欠失免疫細胞がHIV感染に対して抵抗性になる。大きく期待されている治療法であったが、治療効果はそれほど顕著ではなかった⁽¹⁹⁾。ユニバーサルCAR-Tは、患者ごとにCAR-Tの樹立が必要な従来法とは異なり、ヒト白血球型抗原に拘束されずに様々な患者で共通に使用可能なCAR-T細胞株である。最初の例では、CD19標的CAR-T細胞のT細胞受容体 α 鎖遺伝子がTALENによってノックアウトされた。このユニバーサルCAR-T細胞はB細胞性急性リンパ性白血病の小児患者に用いられ、顕著な治療効果を生んだ⁽²⁰⁾。また、米国における初めてのCRISPR-Cas9の臨床応用の例であるが、がん特異的T細胞から単離したNY-ESO-1（がん細胞に特異的に見られる抗原の一種）を標的とするT細胞受容体を患者由来のT細胞にレンチウイルスベクターで導入すると同時に、治療効果を促進する目的で2つのT細胞受容体遺伝子（ α 、 β ）とPD-1遺伝子がノックアウトされた。最初の患者3名（2名の進行性多発性骨髄腫と1名の粘液円形細胞型脂肪肉腫）の例では、ノックアウトの効率はそれぞれの遺伝子座について15~45%であり、また、NY-ESO-1T細胞受容体の導入効率は1.4~4.5%であった⁽²¹⁾。末期のがん患者のために明白な治療効果は得られなかったが、目立った副作用もなく、さらに対象人数を増やしての結果が注目される。

一方、血液の遺伝病のゲノム編集治療の例として、 β グロビン遺伝子の異常で発症する鎌状赤血球症（赤血球が鎌状になり酸素運搬機能が低下し貧血を招く）や β サラセミアについて、ゲノム編集を利用した遺伝子治療の臨床試験が始まった。両疾患に対する戦略は同じであり、胎児ヘモグロビンを構成する γ グロビンの発現を成人細胞で抑制しているBCL11A遺伝子の赤血球特異的エンハンサー配列（遺伝子の転写量を増やすDNAの領域）をゲノム編集で破壊する。それによって、これらの疾患で量的若しくは質的異常のある成人型ヘモグロビン

(18) Koblan L.W. et al., "In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice," *Nature*, 2021 Jan 6.

(19) Tebas P. et al., "Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV," *New England Journal of Medicine*, 370(10), 2014.3, pp.901-910; Xu L. et al., "CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia," *New England Journal of Medicine*, 381(13), 2019.9, pp.1240-1247.

(20) Qasim W. et al., "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells," *Science Translational Medicine*, 9(374), 2017.1, eaaj2013.

(21) Stadtmayer E.A. et al., "CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer," *Science*, 367(6481), 2020.2, eaba7365.

の代わりに、胎児ヘモグロビンを産生して病気を治そうというものであり、ZFN（Sangamo 社）と CRISPR-Cas9（CRISPR Therapeutics 社）を用いたプロトコールがそれぞれ臨床試験に入っている。最近、CRISPR-Cas9 を用いた最初の例が輸血依存性 β サラセミアと鎌状赤血球症の患者 1 名ずつについて報告されているが、輸血が不要になる又は疼痛発作が出なくなるなど、めざましい治療効果が得られて注目されている⁽²²⁾。これらの疾患に関しては、もっと高い効率で HDR が得られるようになれば、変異遺伝子配列を正確に修復する究極の遺伝子修復治療も可能になるであろう。

技術的なハードルが高い *in vivo* のゲノム編集治療も行われた。遺伝性代謝疾患であるムコ多糖症（細胞内小器官ライソゾームにおいて酵素が働かず不要なムコ多糖が蓄積し生じる疾患）の患者の肝臓のアルブミン遺伝子座に治療遺伝子を、ZFN を用いてノックインする臨床試験である。おそらく数%と考えられる肝臓での低い HDR 効率を、ノックインする標的であるアルブミン遺伝子座からの高い遺伝子発現で補う（治療戦略については、脚注参照⁽²³⁾）。このプラットフォームが一度完成すれば、様々な肝臓の遺伝病も同様に治療可能となる。初めての *in vivo* ゲノム編集の臨床応用でかつ HDR を利用するプロトコールということで注目されているが、目立った効果は得られずに現在は中止されている。おそらく、AAV を用いて肝細胞で持続的に発現する ZFN に対する細胞毒性と免疫応答の問題が大きいのであろう。また最近、CEP290 遺伝子の優性変異によって起きるレーバー先天性黒内障 10 型（LCA10）で、病因となる CEP290 遺伝子変異をノックアウトする治療が開始された（治療戦略については、脚注参照⁽²⁴⁾）。この例では、SaCas9 と gRNA とをコードする AAV ベクターが網膜下に注射された。初めての *in vivo* での CRISPR-Cas9 の応用であるが、この例も肝臓の場合と同様に、遺伝病とはいえ遺伝子修復よりも効率や安全性の面でハードルが低い、NHEJ を利用したプロトコールである。

これらの先行例を追う形で、現時点では 50 に近いゲノム編集治療の臨床試験が進行中である⁽²⁵⁾。この数はどんどん増えていくことが予想される。

3 ゲノム編集の効率と治療効果

近年の遺伝子治療の成功の背景には、長年にわたる、遺伝子の導入（デリバリー）法としてのベクターの開発・改良による高効率化と安全面での改良、並びにベクターや治療遺伝子に対する宿主の免疫応答に関する研究の進歩などがある。特に、ベクター技術の改良により、様々な標的組織へ 100% 近い効率で遺伝子導入が可能になったことが最もクリティカルであった。人工ヌクレアーゼも同様のベクター技術を用いることで、高効率で標的細胞に導入・発現できる。しかし、ゲノム編集が成功するためには、ゲノム編集ツールを導入・発現した細胞において、更に染色体切断と DNA 修復が効率良く生じる必要がある。したがって、ゲノム編集がより広範な疾患に応用されるためには、DNA 切断や遺伝子修復（NHEJ や HDR）のさらなる高率化も必須だと考えられる。これまでに臨床で用いられているプロトコールの多くは、従来の遺伝子

(22) Frangoul H. et al., "CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and beta-Thalassemia," *New England Journal of Medicine*, 384(3), 2021.1.21.

(23) Ou L. et al., "ZFN-Mediated In Vivo Genome Editing Corrects Murine Hurler Syndrome," *Molecular Therapy*, 27(1), 2019.1, pp.178-187.

(24) Maeder M.L. et al., "Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10," *Nature Medicine*, 25(2), 2019.2, pp.229-233.

(25) Ernst M.P.T. et al., *op.cit.*(5)

治療と同様に、ウイルスベクターを用いて高効率で高レベルでのヌクレアーゼの発現を達成している。しかし、従来の遺伝子治療では有利となる安定した遺伝子発現が、ヌクレアーゼの発現の場合には免疫原性やオフターゲット効果の点からデメリットとなるかもしれないので、今後は、これまで遺伝子治療ベクターの開発では比較的重点を置かれていなかった一過性でヌクレアーゼを強発現することの出来るベクターの開発が必要となる可能性が大きい。一方、安全性の観点から非ウイルスベクターの開発も急速に進んでいるが、効率が一番のネックである⁽²⁶⁾。

4 人工ヌクレアーゼによるオフターゲット変異

治療法を開発する上で、効果を得るためのプロトコルの確立が最優先ではあるが、人間に用いる以上、最も重要なのは「安全性」である。遺伝子治療全体の課題として、遺伝子導入に用いられるベクターに由来する免疫原性や細胞毒性がある。また、レトロウイルスやレンチウイルスなどの染色体に組み込まれるベクターを用いる場合には、染色体挿入変異などの遺伝毒性（染色体DNAに対する悪影響）が問題となる。それに加えてゲノム編集技術に付随する問題点は、人工ヌクレアーゼの免疫原性、細胞毒性、遺伝毒性（いわゆるオフターゲット変異）が挙げられる。さらに、ドナーDNAを用いる場合には、ドナーDNAが染色体に組み込まれることによる遺伝毒性も生じる。

ヌクレアーゼによるオフターゲット変異は、様々な方法で解析される⁽²⁷⁾。理論的に一番正確なのは、全ゲノムシーケンスであろう⁽²⁸⁾。しかし、仮に全ゲノムの100倍のカバレッジ（同一の箇所を重ねて読み出すこと）で1つの変異を見つけたとしても検出感度としてはたかだか1%という計算になる。多くの臨床応用では対象細胞が 10^8 個のオーダーを越えることを考えると、 10^6 個近い細胞に変異が入っていても検出出来るかどうかの低い感度となる。たった1個の変異細胞でも最終的にがんを引き起こす可能性があることを考えると、この検出感度では不十分である。

一方、オフターゲット部位の予測に関しては、標的配列に類似の配列をコンピューター解析によって同定する方法が簡便であるが、実際のオフターゲット部位とはそれほど一致しないと考えられている。網羅的であり、かつ偏りのない方法の代表例として、培養細胞で人工ヌクレアーゼを発現して切断場所を検出する方法（GUIDE-seq⁽²⁹⁾など）や、標的細胞から抽出したDNAを人工ヌクレアーゼによって試験管内で切断する方法がある（Digenome-seq⁽³⁰⁾、CIRCLE-seq⁽³¹⁾など）。特に後者は、個人間のゲノム配列の一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）⁽³²⁾によって新たに生じるかもしれないオフターゲット部位も検出可能である。よく誤解されているが、これらの方法は全て、ゲノム編集処理をした細胞でオフターゲット

(26) van Haasteren J. et al., "The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing," *Nature Biotechnology*, 38(7), 2020.7, pp.845-855.

(27) Bao X.R. et al., "Tools for experimental and computational analyses of off-target editing by programmable nucleases," *Nature Protocols*, 16(1), 2021.1, pp.10-26.

(28) 次世代シーケンサーを用いて、例えば約30億塩基対からなるヒトの全ゲノム配列を解読する方法。

(29) Tsai S.Q. et al., "GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases," *Nature Biotechnology*, 33(2), 2015.2, pp.187-197.

(30) Kim D. et al., "Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells," *Nature Methods*, 12(3), 2015.3, pp.237-243.

(31) Tsai S.Q. et al., "CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets," *Nature Methods*, 14(6), 2017.6, pp.607-614.

(32) DNAの塩基配列の個人差の一種で、1つの塩基だけが別の塩基に置き換わっているもの。

ト変異を直接検出する方法ではなく、あくまでも潜在的オフターゲット部位を予め実験的にスクリーニングする方法である。これらの方法を用いて、まず、オフターゲット部位の数が少なく、かつ、それらががん関連遺伝子などに位置しない標的配列を選ぶ。実際のゲノム編集処理後の細胞でのオフターゲット変異の頻度を調べるには、予想されるオフターゲット部位それぞれに対して amplicon sequencing を行う⁽³³⁾。しかし、次世代シーケンサーで生じるエラー率より低い頻度で生じる変異は見分けがつかないために、検出感度は最高で 0.1% ほどである。すなわち、前述の例と同様に、 10^8 の細胞にゲノム編集をした場合には 10^5 未満の頻度の変異は検出できないことになる。

仮に低頻度のオフターゲット変異によって細胞が死んでもおそらく問題ではなく、一番問題なのは細胞のがん化であろう。しかし、これらのオフターゲット解析で得られるのは DNA レベルの変異で、がん化など細胞の形質の変化に結びつくような変異を見分けることはできない。最近、p53 遺伝子とゲノム編集の関係が報告されており、p53 遺伝子が正常な細胞は DNA 二本鎖切断で死にやすいため、ゲノム編集に成功した細胞には p53 経路に異常がある可能性が高いことが懸念されている⁽³⁴⁾。しかし、少なくともヒト造血幹前駆細胞では、オフターゲット変異が少ない標的を選ぶことでこの問題を回避できる⁽³⁵⁾。それに加えて、DNA 二本鎖切断の修復エラーの際に数キロ塩基対以上のサイズの欠失が入ることが報告されたり⁽³⁶⁾、高頻度に染色体転座が生じる可能性も示唆されている。2019 年の米国遺伝子治療学会議 (American Society of Gene & Cell Therapy: ASGCT) 年次会合でフライブルク大学の Toni Cathomen 博士が報告した CAST-seq 法は、実際にゲノム編集処理した細胞を材料として染色体レベルの大きな異常を含む変異を直接的に高感度に検出可能な方法であるが、この方法を用いると、ゲノム編集処理をしたヒト CD34 陽性細胞において、10~20% の高頻度で大きな染色体欠失や 0.01~0.1% の細胞で転座を検出したとのことである⁽³⁷⁾。人工ヌクレアーゼのオフターゲット活性によって生じる様々な変異は、予想されているよりも高頻度で生じるのかもしれない。

しかしながら、DNA 変異の原因は人工ヌクレアーゼのオフターゲット活性によるものだけではない。それどころか、ドナー DNA (二本鎖 DNA や AAV ベクター) を用いる場合には、それらが細胞によっては 50% という高頻度 (細胞当たり 0.5 か所) でオンターゲット並びにオフターゲット部位に組み込まれることが知られている⁽³⁸⁾。さらに、細胞分裂時の DNA 複製エラーで生じる突然変異も、積み重なると無視できない。1 回の DNA 複製当たり 10^{10} 塩基に 1 塩基の頻度で複製エラーが生じるとして、約 30 回の細胞分裂を経ることで (1 個から 10^9 個への細胞増殖に相当)、各細胞に平均して 10 か所ほどのランダムな変異が入る計算になり⁽³⁹⁾、細胞当たり 0.1% 未満と考えられる人工ヌクレアーゼのオフターゲット変異の頻度よりも桁違いに

(33) ゲノム上の特定の数百塩基の領域を PCR で増幅して次世代シーケンサーで塩基配列を決定する方法で、全ゲノムシーケンスよりも感度は高い。

(34) Haapaniemi E. et al., "CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response," *Nature Medicine*, 24(7), 2018.7, pp.927-930; Ihry R.J. et al., "p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells," *Nature Medicine*, 24(7), 2018.7, pp.939-946.

(35) Schiroli G. et al., "Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response," *Cell Stem Cell*, 24(4), 2019.4, pp.551-565.e8.

(36) Kosicki M. et al., "Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements," *Nature Biotechnology*, 36(8), 2018.9, pp.765-771.

(37) 2021 年 1 月時点で未発表。

(38) Hanlon K.S. et al., "High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks," *Nature Communications*, 10(1), 2019.9, p.4439.

(39) $30 \text{ 分裂} \times 6 \times 10^9 \text{ (ヒトゲノム塩基数)} / 10^{10} \text{ (変異の頻度)} = 18$

高くなる。したがって、iPS細胞を用いる再生医療などは、誘導やゲノム編集の過程で *in vivo* のゲノム編集よりも桁違いに変異リスクが高いことになり、*ex vivo* のゲノム編集の場合にも細胞培養は最低限にする必要がある。

ASGCTでのゲノム編集に関するシンポジウムなどでの様々な研究者からの報告でも、ゲノム編集の結果、実際にかん関連遺伝子などに変異が入った例は、これまでに見つかっていないとされる。これらのことから、最近では、慎重にデザインされた人工ヌクレアーゼであれば、オフターゲット変異による発がんリスクは非常に低いと考えられるようになってきた。ハーバード大学のある研究者の話では、例えば CRISPR-Cas9 の場合、特定の DNA 標的部近辺に 5~10 の活性の高い gRNA 候補を決めた上で、上記の網羅的方法でそれぞれのオフターゲット部位を調べて安全なものを 1 つ選ぶそうであり、リスク低減にはそれなりの労力を要する。

ex vivo ゲノム編集治療の安全性は、ES細胞や iPS細胞を治療目的で使用する場合の安全性評価と同様に考えられるかもしれない。2013年に独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の細胞組織加工製品専門部会が「iPS細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論」という報告書を出したが、幹細胞の安全性の基準となるのは、ゲノム不安定性とがん関連遺伝子の変異とされており、参考になると考えられる⁽⁴⁰⁾。一方、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) は、*ex vivo* のヒト造血幹前駆細胞のゲノム編集における安全性を示すデータとして、① GUIDE-seq、Digenome-seq、CIRCLE-seq 等のバイアスのない網羅的な解析法を 2 種類用いた DNA レベルのオフターゲット変異の詳細な解析、②核型解析 (染色体の分裂中に生じる染色体異常の分析) と軟寒天培地による細胞レベルでの形質転換アッセイ (培養による悪性形質に転換した細胞の検出)、③患者に移植すると同数のゲノム編集処理した細胞を NSG マウス 100 匹以上に分けて移植して 5 か月間の観察、を求めている⁽⁴¹⁾。前述したように、オフターゲット変異の問題は細胞のがん化であり、生物学意義の不明なオフターゲット候補部位を amplicon sequencing で解析するよりも、動物への移植の方が現実的で感度の高いアッセイ (分析評価) となる。一方、*in vivo* のゲノム編集については、造血幹前駆細胞の場合のように、ゲノム編集した細胞をヒト臨床応用に用いるのと同じ数だけ動物に移植するアッセイはほぼ不可能である。したがって、ヒトとモデル動物とでゲノム配列が異なりオフターゲット配列も異なることを覚悟の上で、FDA は霊長類での実験データを求めている。さらに前述したように、これまでの *in vivo* のゲノム編集の多くはウイルスベクターなどで持続的に人工ヌクレアーゼを発現しており、オフターゲット変異の蓄積の問題がある。*in vivo* ゲノム編集の安全性評価の開発は、今後の大きな課題である。

5 免疫応答

オフターゲット変異の問題は、注意深く標的配列を選ぶことでほぼ解決するが、一番の課題は免疫応答の問題であろう。前述したように、遺伝子治療の研究で最も重要なテーマの 1 つは宿主の免疫応答であった。人工ヌクレアーゼが人工的なタンパク質で、特に細菌由来のものを扱う場合には、免疫原性の問題は避けて通れない。実際に正常人で抗 Cas9 抗体や抗 Cas9T 細

(40) 細胞組織加工製品専門部会「iPS細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論のまとめ」2013.8.20. 医薬品医療機器総合機構ウェブサイト <<https://www.pmda.go.jp/files/000155505.pdf>>

(41) DiGiusto, D.L. et al., "Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells," *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 3, 2016.11, p.16067.

胞の保有率を調べた研究では、対象集団によっては半数以上の正常人が Cas9 に対する液性並びに細胞性免疫を既に保有している⁽⁴²⁾。一方、最近のマウスを用いた筋肉の *in vivo* ゲノム編集の結果によると、新生児マウスではそれは回避されたものの成獣では免疫応答が惹起された⁽⁴³⁾。遺伝子治療研究の歴史を顧みると、近交系マウス（20 世代以上近親交配を繰り返した遺伝的に個体差のないマウス）をモデルとして使用して治療を成功しても雑種である大型動物やヒトが対象になると、スケールアップの問題や免疫系の複雑さの問題が顕著になり、期待するような治療結果が得られないことが多かった。ゲノム編集の臨床応用に向けても、これらのハードルは覚悟しておく必要があり、より免疫原性の低いヌクレアーゼの開発や、それらを遺伝子としてではなくタンパク産物として効率良く導入する方法の開発が望まれる⁽⁴⁴⁾。いずれにしても、免疫応答を完全に防ぐのは困難であり、他の治療法と比較して、強い免疫抑制剤を使ってまでゲノム編集治療を選ぶベネフィットがあるか、よく考慮しなければならない。

6 リスクベネフィットから考える対象疾患

ゲノム編集を治療応用する際のリスクベネフィットの考え方は、標的疾患により大きく異なる。特に、がん治療への応用のリスクベネフィットに関しては、疾患の性質からしても後述するオフターゲット変異のリスクは問題とならない。一方、遺伝病の治療となると、小児が対象となる場合が多く、長期的な治療効果と安全性を考慮しなければならない。ゲノム編集・遺伝子治療だけでなく、どのような治療でも何らかのリスクは存在する。したがってゲノム編集を、遺伝子（付加）治療を含めた既存の治療法と比較して、リスクベネフィットを考慮する必要がある。もちろん、ゲノム編集でのみ治療可能な疾患のベネフィットは大きいと考えることが出来、優性遺伝病がそれに相当する。また、制御された遺伝子発現が必要とされる、CD40 リガンド欠損症や Fas リガンド欠損症（いずれも先天的に免疫系に障害が生じ感染への抵抗が低下）等の免疫疾患も、ゲノム編集によるベネフィットが大きく有力な対象疾患である。リスクを考えた場合には、*in vivo* の遺伝病治療よりも *ex vivo* の血液系のがんや感染症の方が、遙かに応用へのハードルが低い。また、現時点での遺伝子修復効率はそれほど高くないため、正常細胞（遺伝子修復細胞）が変異細胞の中で増殖優位性があることが知られている、血液系では SCID-X1、肝臓では遺伝性高チロシン血症 I 型（アミノ酸の 1 つチロシンを代謝する酵素の異常により血中チロシンが増加し肝不全等を招く。）や低い遺伝子発現でも治療レベルが期待される血友病なども対象として考えられている。しかし、これらの疾患の多くは既に通常の遺伝子付加治療でも有効な結果が得られている。ゲノム編集ありきではなく、ゲノム編集の方が従来の遺伝子治療よりも安全で効果が高いことを示すような研究が、今後は重要となるであろう。

次表は、ここまでに取り上げた疾患の代表例について、遺伝子治療とゲノム編集治療とを比較したものである。

(42) Charlesworth C.T. et al., "Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans," *Nature Medicine*, 25(2), 2019.2, pp.249-254.

(43) Nelson C.E. et al., "Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy," *Nature Medicine*, 25(3), 2019.3, pp.427-432.

(44) Wilson E.A. and Anderson K.S., "Weakly immunogenic CRISPR therapies," *Nature Biomedical Engineering*, 3(10), 2019.10, pp.761-762.

表 遺伝病における「遺伝子治療」と「ゲノム編集治療」

疾患名	病状	遺伝子治療		ゲノム編集治療	
		手法	臨床応用の段階	技術応用法	治療状況
β サラセミア / 鎌状赤血球症	赤血球で β グロビンに異常があるために貧血などを発症	レンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞で β グロビンを発現	欧州で遺伝子治療薬として承認 (Zynteglo)	Bcl11A 遺伝子のノックアウトにより胎児グロビンを発現し、 β グロビン欠損を補う	臨床研究の結果は良好
X 連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1)	サイトカイン受容体の共通 γ 鎖 (γc)がないために重症複合免疫不全を発症	レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞で γc を発現	治療効果があったが、一部の患者が白血病発症。レンチウイルスベクターに切り替えて良好な結果	正確な遺伝子修復によって、治療ベクターによる挿入変異を防ぐ	前臨床試験の結果は良好
血友病	血液凝固因子が作られないために止血異常	AAV ベクターを用いて肝臓で血液凝固因子を発現	臨床研究の結果は良好	アルブミン遺伝子座に血液凝固因子の遺伝子を安全に挿入	治療効果なく臨床試験中止
レーバー先天性黒内障	網膜視細胞が機能しないことにより重度の視力障害、失明	AAV ベクターを用いて網膜細胞で治療遺伝子を発現	欧米で遺伝子治療薬として承認 (Luxturna)	優性遺伝形式の黒内障に対して遺伝子ノックアウト	近日中に臨床試験がスタート
B 細胞性急性リンパ性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫	B 細胞性の血液がん	がん抗原 CD19 を攻撃するキメラ抗原受容体をレンチウイルスベクターで患者 T 細胞に導入して移植	日欧米で遺伝子治療薬として承認 (Kymriah, Yescarta)	拒絶反応関連遺伝子を壊すことで、患者ごとではなく 1 つの細胞株で多くの患者を治療可能	臨床試験の結果は良好

(出典) 筆者作成。

おわりに

以上述べたように、ゲノム編集のヒトへの応用研究は日進月歩である。ゲノム編集がますます臨床の領域で応用されることは間違いない。本稿で紹介したようにまだ課題は多いが、その分、新たな技術開発のチャンスがあるとも言える。日本からも、本稿で述べた課題を乗り越える基盤技術が開発されることが期待される。

(みたに こうのすけ)