

## 遺伝子編集治療製品に係る規制と安全性評価に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2023-05-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.20780/00033463">https://doi.org/10.20780/00033463</a>

遺伝子編集治療製品に係る規制と安全性評  
価に関する研究

Study on Regulation and Safety Assessment for Gene  
Editing Therapeutic Products

2023年2月

山田 直樹

Naoki YAMADA

遺伝子編集治療製品に係る規制と安全性評  
価に関する研究

Study on Regulation and Safety Assessment for Gene  
Editing Therapeutic Products

2023年2月

東京女子医科大学大学院医学研究科および早稲田大学大学院先進理工学研究科  
共同先端生命医科学専攻 分子細胞医療研究

山田 直樹

Naoki YAMADA

## 目次

### 第1章 遺伝子編集治療製品の技術と課題

#### 1.1 本研究の背景

##### 1.1.1 遺伝子編集の原理

##### 1.1.2 遺伝子治療と遺伝子編集治療の違い

##### 1.1.3 遺伝子編集酵素の細胞導入及び生体投与のモダリティと DDS

##### 1.1.4 遺伝子編集治療に係る安全性の論点

#### 1.2 本研究の目的

### 第2章 遺伝子編集治療に係る日米欧のガイドラインの分析と比較

#### 2.1 目的

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 日欧米のガイドラインの記載量の比較—異なる言語の比較方法—

##### 2.2.2 日欧米のガイドラインの記載内容の比較

#### 2.3 結果

##### 2.3.1 日欧米のガイドラインの記載量の比較方法の確立

##### 2.3.2 日欧米のガイドラインの記載量と内容の解析

##### 2.3.3 日米欧のガイドラインの記載量の解析

#### 2.4 考察

#### 2.5 結論

### 第3章 遺伝子編集治療製品の非臨床試験における安全性の評価

#### 3.1 目的

#### 3.2 方法

#### 3.3 結果

##### 3.3.1 日米欧のいずれかで臨床試験に進んだ遺伝子編集治療製品

##### 3.3.2 日米欧のいずれかで臨床試験に進んだ遺伝子編集治療製品の非臨床試験及び臨床試験に関する公開情報

##### 3.3.3 異なる製品、企業で共通して用いられた OTE 解析スキーム

### 3.3.4 OTE に関するリスクアセスメント

### 3.3.5 OTE の検出法の開発と非臨床試験への採用の歴史

## 3.4 考察

## 3.5 結論

# 第 4 章 遺伝子編集治療製品の臨床試験における安全性の評価

## 4.1 目的

## 4.2 材料と方法

## 4.3 結果

### 4.3.1 日米欧のいずれかで開始された遺伝子編集治療製品の臨床試験

### 4.3.2 遺伝子編集治療製品の臨床試験の試験プロトコル分析

### 4.3.3 長期観察(LTFU)の設定

## 4.4 考察

### 4.4.1 臨床試験のプロトコルとガイドラインとの関係

### 4.4.2 遺伝子編集治療製品に採用されたモダリティと DDS 技術と安全性評価

## 4.5 結論

# 第 5 章 日本における遺伝子編集治療製品開発の課題と開発推進のための提言

## 5.1 日本における遺伝子編集治療製品開発の課題

### 5.1.1 日本での臨床開発状況

### 5.1.2 日本での治療対象患者数と開発ニーズ

### 5.1.3 医療経済におけるニーズ

### 5.1.4 企業の立地要因と特許障壁について

### 5.1.5 PMDA, AMED, NIHS での議論

## 5.2 日本で遺伝子編集治療の開発が進まないことへの考察

## 5.3 日本での開発推進のための提言

# 第 6 章 本研究の結論・限界・今後の展望

引用文献

謝辞

研究業績

## 略語一覽

AAV	Adeno Associated Virus
ADME	Absorption Distribution Metabolize Emission
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMED	Japan Agency for Medical Research and Development 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Amp-Seq	Amplicon Sequencing
ATTR	Transthyretin Amyloidosis
CCR5	C-C chemokine Receptor type 5
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CIRCLE-seq	circularization for in vitro reporting of cleavage effects by sequencing
CISH	Cytokine-induced SH2 protein
CMC	Chemistry, Manufacturing, and Control
CMO	Contract Manufacturing Organization
CRISPR-Cas	Cultured Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein
CRO	Clinical Research Organization
CTA	Clinical Trials Administrator
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
dCas9	endonuclease deficient Cas9
DDS	Drug Delivery System
Digenome-seq	Digested genome sequencing
DIG-seq	Digoxigenin sequencing
DISCOVER-seq	discovery of in situ Cas off-targets and verification by sequencing
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSB	Double Strand Break
dsDNA	double stranded DNA
EMA	European Medicines Agency
EU	European Union
EU-Guideline (2019)	Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products
FDA	Food and Drug Administration
FIH	First in Human
Fok1	Endonucleases isolated from Flavobacterium okeanokoites
GCP	Good Clinical Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
gRNA	guide RNA
GUIDE-seq	Genome-wide, Unbiased Identification of DSBs Enabled by Sequencing
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HDR	Homology Directed Repair

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSPC	Hematopoietic stem and progenitor cell
HTGTS	High-Throughput Genome-Wide Translocation Sequencing
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IDA	Iminodiacetate
IDLV	Integrase Defective Lentiviral Vector
IDUA	Alpha-L-iduronidase Gene
IND	Investigational New Drug
INDA	Investigational New Drug Applications
Indel	insertion or deletion
JP-Guideline (2019)	遺伝子治療医薬品の品質、非臨床的および臨床的側面に 関するガイドライン
LDL	low-density lipoprotein
LNP	Lipid Nano Particle
LTFU	Long Term Follow UP
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHC1	major histocompatibility complex class1
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mRNA	messenger RNA
NGS	Next-Generation Sequencing
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NIHS	National Institute of Health Sciences (国立医薬品食品衛生研究所)
OTE	Off Target Effect
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDNA	plasmid DNA
PEG	Polyethylene Glycol
pka	Acid dissociation constant
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (医薬品医療機器総合機構)
POC	Proof of Concept
POL	Potential Off-target Loci
RNA	Ribonucleic acid
RNP	ribonucleoprotein
S/N	Signal-to-Noise ratio
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
sgRNA	single guide RNA
siRNA	Small interfering RNA
SITE-seq	selective enrichment and identification of adapter-tagged DNA ends by sequencing

TALE	Transcription Activator-Like Effector
TALEN	Transcription Activator-Like effector Nuclease
TCR	T-cell receptor
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TLR	Toll-like receptor
TTR	Transthyretin
UCC	University of California, California
US-CMC - Guideline (2020)	Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry JANUARY 2020
US-LTFU-Guidance (2020)	Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products Guidance for Industry JANUARY 2020
ZF	Zinc Finger
ZFN	Zinc-Finger Nuclease
ZFP	Zinc Finger Protein

## 第 1 章 遺伝子編集治療製品の技術と課題

### 1.1 本研究の背景

#### 1.1.1 遺伝子編集の原理

遺伝子編集には、DNA 塩基配列を認識して DNA 鎖を特定の部位で 2 本鎖切断(Double Strand Break: DSB)する DNA 切断酵素が利用される。臨床応用が進められている主な DNA 切断酵素には、タンパク質である Zinc-Finger Nuclease (ZFN)<sup>1)</sup>や Transcription Activator-Like effector Nuclease (TALEN)<sup>2)</sup>、タンパク質 - RNA 複合体である Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein (CRISPR-Cas)<sup>3)</sup>がある。本論文ではこれらを総称して遺伝子編集酵素と呼称する。

遺伝子編集酵素による遺伝子編集のスキームを図 1-1 に示した。まず、細胞に遺伝子編集酵素が導入される。遺伝子編集酵素は、タンパク質か mRNA あるいは DNA のモダリティで細胞導入が可能である(1.1.3 節で後述)。細胞に導入された遺伝子編集酵素は核内に移動した後に、染色体 DNA に配列特異的に結合して、ターゲット部位選択的に DSB を引き起こす。染色体 DNA の 2 本差切断は細胞にとって有害なため、DSB は細胞の DNA 修復経路によって速やかに再結合される。DSB の再結合の時に、DNA の相同配列を利用しない修復経路は、Non-Homologous End-Joining(非相同組み換え: NHEJ)とよばれる。NHEJ による修復過程では、DNA の再結合箇所 に一定の頻度で短い DNA 配列の挿入・欠損の修復エラー(insertion or deletion: Indel)が生じる。遺伝子編集酵素の DNA 切断は触媒機能であるため、細胞に導入された遺伝子編集酵素の寿命が尽きるまで、DSB と NHEJ が繰り返される。この過程でオンターゲット部位に生じる indel を利用した遺伝子編集治療として、リーディングフレームシフトによる疾患の原因遺伝子発現のノックアウト<sup>4)</sup>や、転写調整部位の破壊による正常遺伝子の発現調整が試みられている<sup>5)</sup>。また、相同配列を利用した DSB の修正機構(Homology Directed Repair: HDR)を用いた遺伝子編集の方法も提案されている。この場合は、遺伝子編集処理を行う細胞に、遺伝子編集酵素と同時に正常遺伝子を載せたドナーテンプレート DNA をトランスフェクションする。ドナーテンプレート DNA に、DSB 近傍の染色体 DNA との相同配列を設けることで、HDR による DSB 修復の過程で、ドナーテンプレートに載せられた正常遺伝子の配列情報が、染色体 DNA のターゲット部位に組み込まれることを利用する<sup>6)</sup>。

近年、DNA 切断能を失活させた遺伝子編集酵素に DNA 修飾酵素(デアミターゼ等)を融合させた DNA 切断を伴わない遺伝子編集酵素(Base Editor)が、安全性が高く幅広い疾

患への適用が期待され開発<sup>7)</sup>が始められている。しかしながら、その開発の歴史は浅く、現時点においてヒト臨床試験が開始されたものは2022年11月に投与が開始された1製品<sup>8)</sup>に限られる。本論文では、Base Editorについては論考せず、ヒト臨床試験が数多く進められているDNA切断能を伴う遺伝子編集治療にフォーカスした論考を行う。

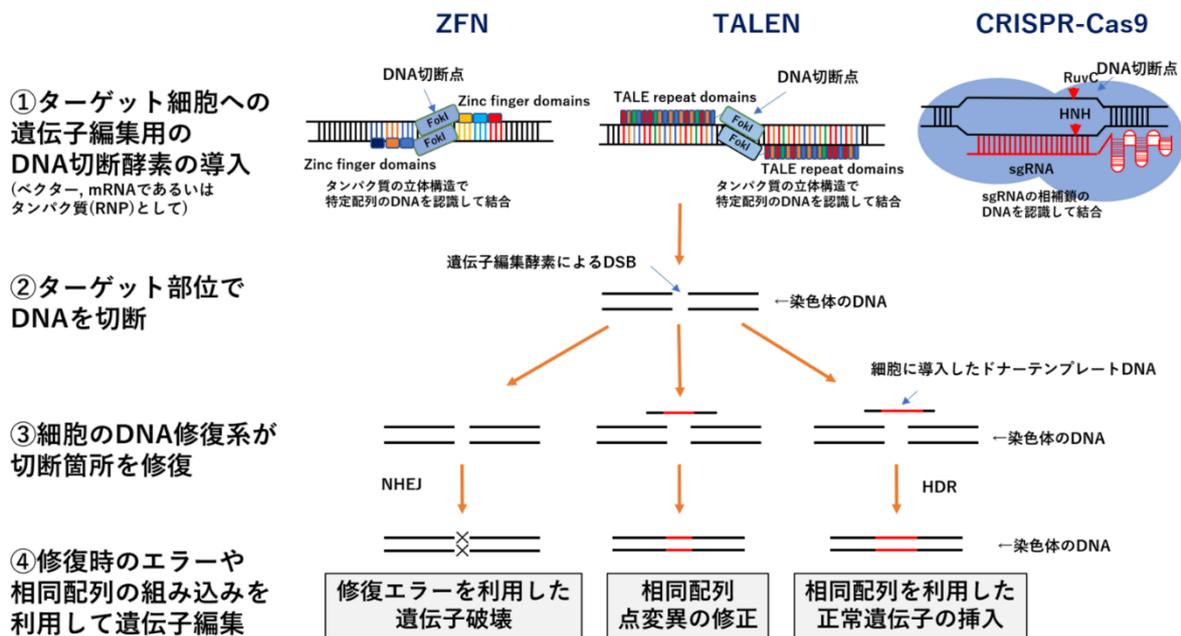


図 1-1 遺伝子編集酵素を利用した遺伝子編集技術の原理 (文献 9 を参考に著者作成)

細胞導入された遺伝子編集酵素は核内に移動した後に、染色体 DNA に配列特異的に結合して、ターゲット部位選択的に DSB を引き起こす。DSB の再結合の時に、DNA の相同配列を利用しない経路は、Non-Homologous End-Joining(非相同組み換え: NHEJ)とよばれる。NHEJ による修復過程では、DNA の再結合箇所に一定の頻度で短い DNA 配列の挿入・欠損の修復エラー(insertion or deletion: Indel)が生じる。Indel によるリーディングフレームシフトによる疾患の原因遺伝子発現のノックアウトや、転写調整部位の破壊による正常遺伝子の発現調整が試みられている。また、相同配列を利用した DSB の修正機構(Homology Directed Repair: HDR)を利用した遺伝子編集の方法も提案されている。この場合は、正常遺伝子を載せたドナーテンプレート DNA に、DSB 近傍の染色体 DNA との相同配列を設けることで、HDR による DSB 修復の過程で、ドナーテンプレートに載せられた正常遺伝子の配列情報が、染色体 DNA のターゲット部位に組み込まれることを利用する。

## 遺伝子編集におけるオフターゲット作用

遺伝子編集技術は、遺伝子編集用酵素によるゲノム DNA の DSB を利用するが、遺伝子編集酵素の配列認識精度は完全ではないため、染色体 DNA 上のターゲット部位とは異なるオフターゲットの位置での DSB とそれに伴う indel 変異がある頻度で生じる。この遺伝子編集酵素による意図しないオフターゲット部位での DNA 変異をオフターゲット作用 (Off Target Effect: OTE) と呼ぶ<sup>10)</sup>。

## 遺伝子編集に用いられる遺伝子編集酵素

遺伝子編集治療製品の開発に利用されている 3 種類の主な遺伝子編集酵素: ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 の特徴を説明する。説明には図 1-2<sup>11)</sup>を用いる。

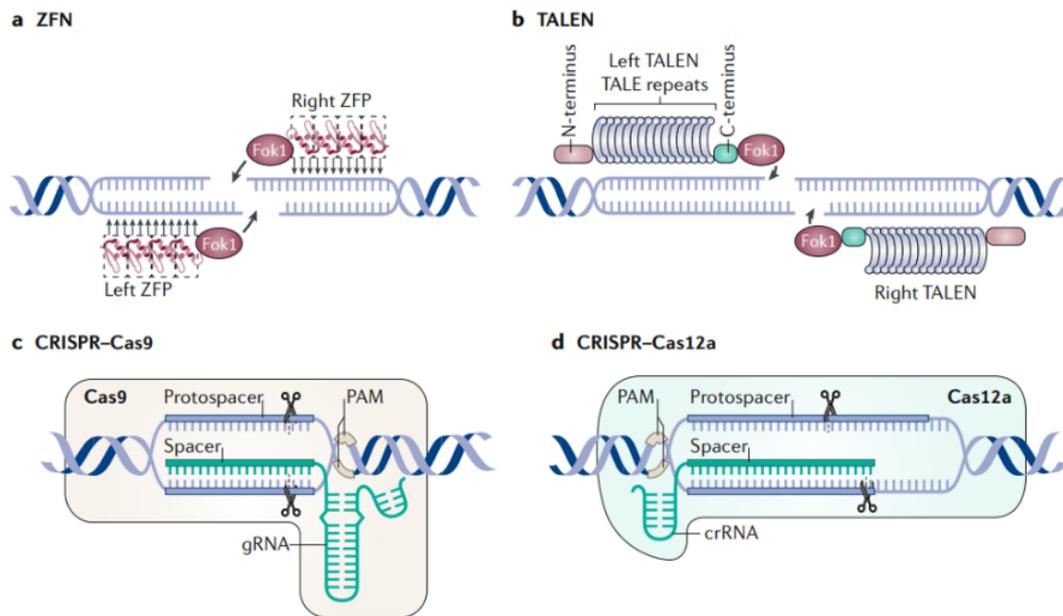
ZFN は、DNA への配列特異的結合ドメインである Zinc Finger (ZF) が連結した Zinc Finger Protein (ZFP) と DNA 配列非特異的切断ドメインである Fok1 の融合タンパク質である。ZF は、2 つの  $\beta$  シートと 1 つの  $\alpha$  ヘリックスが 1 つの亜鉛イオンを内包するユニット構造をとる。1 つの ZF ユニットが 3 つの DNA 塩基配列を認識する。ZFN には、3 つから 6 つの ZF と Fok1 からなる ZFP が利用される。ZFP は 2 量体タンパク質であり、Right ZFP と Left ZFP が DNA 鎖のターゲット配列上で 2 量体を形成することで Fok1 が機能して DSB を生じる。ZFN は 2 量体で合わせて 18bp~36bp の DNA 配列を認識する。ZFN の分子設計においては、ZFP を形成する隣り合った ZF の立体構造が干渉することで、ZF ユニットが認識する DNA 配列が変化するという、文脈依存性(コンテキスト依存性)の難しさがある。所望の DNA 配列を認識する ZFN の設計には、ノウハウと膨大な数のトライアンドエラーが必要となる<sup>12)</sup>。

TALEN は、DNA 配列を認識するポリペプチドユニットの連結体 (Transcription Activator Like Effector: TALE) と Fok1 の融合タンパク質である。TALE の基本構造は、2 つの  $\alpha$  ヘリックスからなる約 34~35 アミノ酸残基の TALE リピートである。1 つの TALE リピートが 1 つの DNA 塩基を認識する。ZFN と同様に DNA 鎖上のターゲット配列上で 2 量体を形成することで Fok1 による DSB を引き起こす(図 1-2)。Left TALEN と Right TALEN のそれぞれに 15~20 の TALE リピートが連結され、2 量体で合計 30bp~40bp の DNA 配列を認識する<sup>12)</sup>。

ZFN と TALEN はいずれも、そのタンパク質の 3 次元構造によって DNA 塩基配列を認識するため、標的を変更する際には大きな工数を必要とするタンパク質工学を用いた分子の設計が必要となる。

CRISPR-Cas9 はタンパク質であり、短い sgRNA との核酸-タンパク質複合体 (Ribonucleoprotein: RNP) を形成する。CRISPR-Cas9 は、sgRNA と標的 DNA の塩基対形成によって DNA を認識する。したがって、CRISPR-Cas9 では標的の変更の度にタンパク質の再設計をする必要はなく、sgRNA の一次配列のデザインを行えばよい。任意のデザインの sgRNA は化学的に容易に調製可能なため、CRISPR-Cas9 は ZFN や TALEN に比べて汎用性の高い遺伝子編集のツールとされる。CRISPR-Cas には、このほかに CRISPR-Cas12a や SaCas9 などが知られている<sup>12)</sup>。

ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 の特徴を表 1-1 にまとめた。



文献 11 より引用

図 1-2 遺伝子編集治療製品への応用開発が進められている主な遺伝子編集酵素

ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas12a の構造の模式図

表 1-1 遺伝子編集治療製品への応用開発が進められている主な遺伝子編集酵素の特徴

(著者作成)

	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
DNAのターゲット部位の認識	ZFタンパク質の3次元構造による認識	TALE リピートのタンパク質3次元構造による認識	Cas9-gRNA(タンパク質-RNA複合体)中のgRNAの配列(1次構造)による認識
認識配列の変更	タンパク質工学的アプローチが必要で難しい	タンパク質工学的アプローチが必要で難しい	gRNAの配列変更により容易
DNA切断酵素	Fok1	Fok1	Cas9
DNA認識	18 - 36 bp	30-40 bp	20 bp

### 1.1.2 遺伝子治療と遺伝子編集治療の違い

この節では従来の遺伝子治療と遺伝子編集治療の違いを整理する。

#### 従来の遺伝子治療

図 1-3 に従来型の遺伝子治療の概念を示した。従来の遺伝子治療は、遺伝子に異常のある患者に対して、正常遺伝子を DNA として導入する治療法である。細胞への遺伝子導入モダリティとドラッグデリバリー技術(Drug Delivery System: DDS)としては、レンチウイルスやレトロウイルスなどの DNA 挿入型のウイルスベクター、DNA 非挿入型のウイルスベクターであるアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ウイルスを用いないプラスミドベクターがある。プラスミドベクターを細胞に導入するウイルスを用いない DDS としては、裸のプラスミドベクターを電ポレーションで導入する方法<sup>13)</sup>や pH 応答性の脂質を用いた Lipid Nano Particle(LNP<sup>14)</sup>やカチオン性のリポソームのリポプレックス<sup>15)</sup>などのキャリアを用いる方法がある。DNA 挿入型のウイルスベクターは、目的の正常遺伝子を患者の細胞の染色体 DNA に組み込むが、その挿入位置はランダムである。従来型の遺伝子治療に用いられる技術体系では、染色体 DNA の挿入位置を制御した遺伝子の導入治療を確立することはできない。AAV ベクターやプラスミド DNA ベクターを用いた場合は、患者に導入された遺伝子は核内の染色体 DNA 外にプラスミド DNA として導入される<sup>16)</sup>。ランダム位置に遺伝子が挿入される染色体組込型の遺伝子治療は、染色体 DNA のターゲット部位での操作が可能な遺伝子編集治療に比較して、発がん性のリスクが高いと考えられている。

#### 遺伝子編集治療

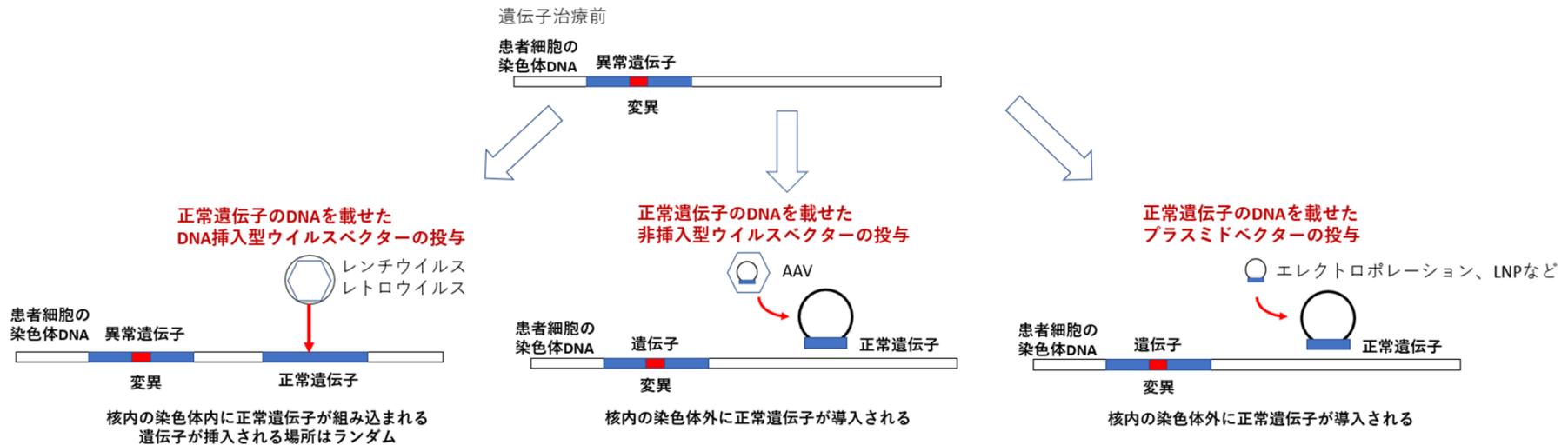
遺伝子編集治療の概念を図 1-4 に示す。遺伝子編集治療は生きた細胞の DNA の特定部位を遺伝子編集酵素で DSB することを特徴とする。遺伝子編集治療では、ターゲット部位での DSB とその後に起こる切断部の修復イベントを利用して、染色体 DNA に正常遺伝子を導入することができる<sup>9)</sup>。これによって、導入する遺伝子を特定のプロモーターの直後に挿入するなど、従来の遺伝子治療では実現ができなかった染色体 DNA 上の遺伝子導入部位の精密制御が可能である<sup>9)</sup>。また、遺伝子編集治療では、ターゲット部位での DSB と NHEJ の過程で生じる indel によって、リーディングフレームシフトによる病原性の異常タンパク質のノックダウン<sup>4)</sup>や、発現調整因子の破壊による正常遺伝子の発現亢

進<sup>17)</sup>などが実現できる。遺伝子編集治療では、ターゲット部位での DSB を利用した遺伝子編集によって、従来型の遺伝子治療の機構であった“正常遺伝子をコードした DNA の細胞導入”を精密な位置指定で実現するにとどまらず、その他にさまざまな DNA の操作を行うことが可能である<sup>18)</sup>。

遺伝子治療に共通する特徴と遺伝子編集治療に共通する特徴には違いがあり、それぞれを以下にまとめることができる。

- ・ 遺伝子治療は、正常遺伝子をコードする DNA を細胞に導入することを特徴とする。
- ・ 遺伝子編集治療は、細胞の DNA の特定部位を遺伝子編集酵素で 2 本鎖切断(DSB)することを特徴とする。

## 従来の遺伝子治療

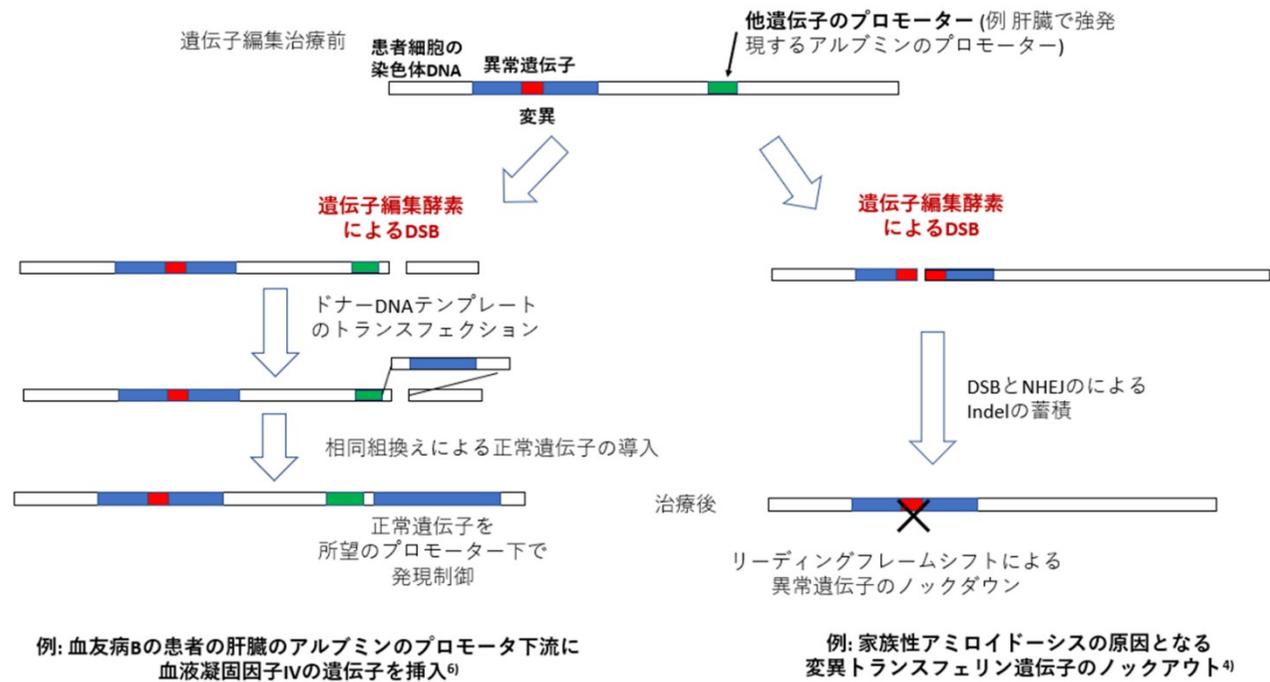


- ・ 正常遺伝子をコードするDNAを患者の細胞に導入することを共通の特徴とする
- ・ 細胞の染色体DNAに組み込む方法と染色体外にプラスミドDNAとして留置する方法がある
- ・ 異常遺伝子を操作することはできない。染色体内の挿入位置を指定することはできない

図 1-3 従来の遺伝子治療の概念図 (著者作成)

正常遺伝子をコードする DNA を患者の細胞に導入することを共通の特徴とする。細胞の染色体 DNA に組み込む方法と染色体外にプラスミド DNA として留置する方法がある。異常遺伝子を操作することはできない。染色体 DNA 上の挿入位置を指定することはできない。

# 遺伝子編集治療



- ・ 生きた細胞のDNAの特定の部位を2本鎖切断(DSB)することを共通の特徴とする
- ・ DSBの後に起こる切断修復のイベントを利用して、異常タンパク質を発現する遺伝子のノックダウンや変異の修正、発現調整因子の配列破壊による正常遺伝子の発現亢進など、従来の遺伝子治療の機能“正常遺伝子をコードしたDNAの細胞導入”以外にさまざまなDNAの操作を行うことができる

図 1-4 遺伝子編集治療の概念図 (著者作成)

治療の対象となる生きた細胞の DNA の特定の部位を 2 本鎖切断(DSB)することを共通の特徴とする。DSB の後に起こる切断修復のイベントを利用して、異常タンパク質の遺伝子のノックダウン<sup>4)</sup>や正常遺伝子の導入<sup>6)</sup>、発現調整因子の配列破壊による正常遺伝子の発現亢進<sup>17)</sup>など、従来の遺伝子治療の機能である“正常遺伝子をコードした DNA の細胞導入”以外にさまざまな DNA の操作を行うことができる。

### 1.1.3 遺伝子編集酵素の細胞導入及び生体投与のモダリティと DDS

#### 遺伝子編集酵素の細胞導入モダリティ

遺伝子編集酵素の細胞導入に用いられる主な3つのモダリティについて、その特徴を図1-5と表1-2に示した。遺伝子編集酵素は、(1)遺伝子編集酵素の遺伝子をコードしたプラスミドDNA、(2)遺伝子編集酵素のアミノ酸配列をコードしたmRNAもしくは、(3)タンパク質（すなわち遺伝子編集酵素そのもの、CRISPR-Cas9の場合はRNP）、の3つのいずれかのモダリティで細胞に導入することができる。“(1)プラスミドDNA”で導入する場合は、Drug Delivery System (DDS) 技術で細胞質に導入したプラスミドDNAが核内に移行し、このプラスミドDNAからmRNAが転写され、細胞質中に存在するリボゾームでこのmRNAから遺伝子編集酵素が翻訳されて発現する。その後、核内に移行した遺伝子編集酵素が染色体DNAのターゲット部位を切断して遺伝子編集を行う。“(2)mRNA”で導入する場合は、DDS技術で細胞質に送達されたmRNAを基に遺伝子編集酵素が細胞質中のリボゾームで合成される。発現した遺伝子編集酵素が核内に移行して、染色体DNAのターゲット部位を切断して遺伝子編集を行う。“(3)タンパク質”で遺伝子編集酵素を直接細胞に導入する場合は、細胞質に送達された遺伝子編集酵素が核内に移行して染色体DNAのターゲット部位を切断して編集する。

細胞導入の際の(1)~(3)のモダリティの選択は、遺伝子編集酵素の作用期間に非常に大きな違いをもたらす。遺伝子編集酵素を“(2)mRNA”や“(3)タンパク質”のモダリティとして細胞に導入する場合は、細胞によるmRNAやタンパク質の分解機構のために、それらの寿命は数時間から数日に限られ、遺伝子編集酵素の作用期間は一過性となる。一方、プラスミドDNAは細胞内で半永久的に安定なため、“(1)プラスミドDNA”として遺伝子編集酵素を導入した細胞では、遺伝子編集酵素が長期間(~年)にわたって継続発現する。この遺伝子編集酵素の存在時間の違いは、遺伝子編集治療のオフターゲット作用(OTE)に大きな影響を与える。通常オンターゲットの遺伝子編集に必要な時間は数時間から数日間である。必要以上の長期間の遺伝子編集酵素の染色体DNAへの暴露は、OTEとそれに伴う発がん性等のリスクを不必要に増加させる<sup>19)</sup>。OTEのリスクの観点から、実際の遺伝子編集治療製品の臨床開発でどのようなモダリティが選択されているかについては、本論文の調査の対象とし、第4章(4.4.2節)にて議論する。

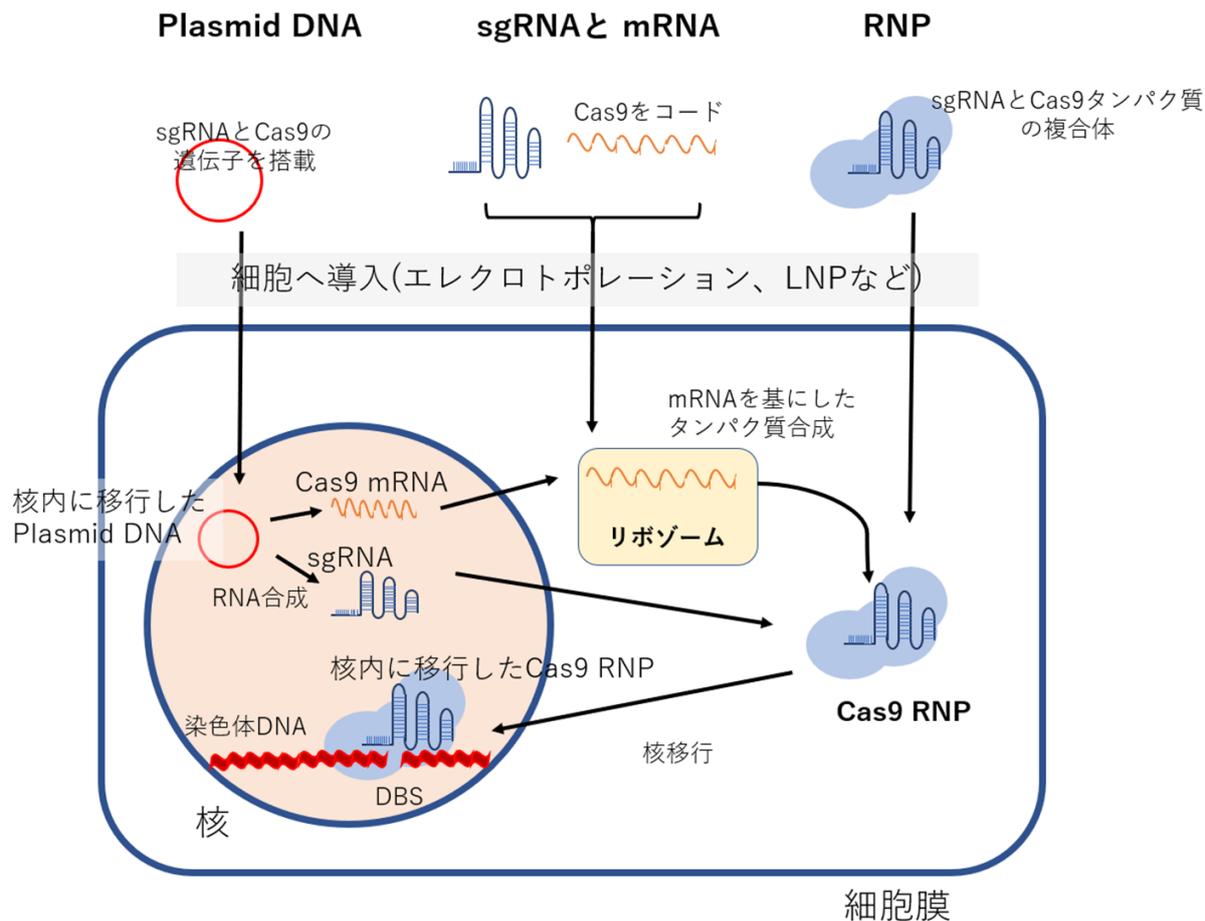


図 1-5 遺伝子編集酵素の細胞に導入する際に用いられるモダリティ

(文献 20 を参考に著者作成)

遺伝子編集酵素は、(1)遺伝子編集酵素の遺伝子をコードしたプラスミド DNA、(2)遺伝子編集酵素のアミノ酸配列をコードした mRNA、もしくは(3)タンパク質(CRISPR-Cas9 の場合は RNP)の 3 つのいずれかのモダリティで細胞に導入することができる。(1)プラスミド DNA で導入する場合は、Drug Delivery System (DDS) 技術で細胞質に導入したプラスミド DNA が核内に移行し、このプラスミド DNA から mRNA が転写され、細胞質中に存在するリボゾームでこの mRNA から遺伝子編集酵素が翻訳されて発現する。その後、発現した遺伝子編集酵素が核内に移行して、染色体 DNA のターゲット部位を切断して遺伝子編集を行う。(2)mRNA で導入する場合は、DDS 技術で細胞質に送達された mRNA を基に遺伝子編集酵素が細胞質中のリボゾームで合成される。発現した遺伝子編集酵素が核内に移行して、染色体 DNA のターゲット部位を切断して遺伝子編集を行う。(3)遺伝子編集酵素を直接細胞に導入する場合は、細胞質に送達された遺伝子編集酵素が核内

に移行して、染色体 DNA のターゲット部位を切断して編集する。この図では、CRISPR-Cas9 の場合を図示した。ZFN、TALEN も同様のスキームだがこれらの場合は sgRNA は不要となる。

表 1-2 遺伝子編集酵素の細胞に導入に用いられるモダリティ (著者作成)

	プラスミドDNA法	mRNA法	遺伝子編集酵素の直接導入法
細胞への遺伝子編集酵素の導入に用いられるモダリティ技術	遺伝子編集酵素の遺伝子をコードしたプラスミドDNA	遺伝子編集酵素のアミノ酸配列をコードしたmRNA	遺伝子編集酵素 (ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9など)
導入されたモダリティの細胞中での振る舞い	DDS技術で細胞質に導入したプラスミドDNAが核内に移行する。このプラスミドDNAからmRNAが転写され、遺伝子編集酵素がリボソームで合成される。その後、遺伝子編集酵素が核内に移行して、染色体DNAのターゲット部位を切断・編集する。	DDS技術で細胞質に送達されたmRNAを基に遺伝子編集酵素が細胞質中のリボソームで合成される。遺伝子編集酵素が核内に移行して、染色体DNAのターゲット部位を切断・編集する。	DDS技術で、細胞質に送達された遺伝子編集酵素が核内に移行。染色体DNAのターゲット部位を切断・編集する。
細胞内での遺伝子編集酵素の作用期間	<b>長期間にわたる</b> 核内に残留するプラスミドから恒常的に発現(年のオーダー)	<b>一過性</b> mRNAの寿命に依存(数時間から数日)	<b>一過性</b> 遺伝子編集酵素の寿命に依存(数時間から数日)
利用可能なDDS技術	・ エレクトロポレーション(ex vivoの場合) ・ ウイルスベクター ・ LNP など	・ エレクトロポレーション(ex vivoの場合) ・ LNP など	・ エレクトロポレーション(ex vivoの場合)
OTEのリスク	暴露時間が長いため リスクが高い	暴露時間が短いため リスクが低い	暴露時間が短いため リスクが低い

## 遺伝子編集酵素の生体投与の経路と DDS

遺伝子編集治療製品の投与経路は、*ex vivo* と *in vivo* の 2 つに大別される(図 1-6、表 1-3)。 *Ex vivo* による遺伝子編集治療では、患者本人ないしドナーから採取した血液細胞組織(造血幹細胞や T 細胞等)を体外で遺伝子処理を行った後に患者に移植する。 *In vivo* の場合は、遺伝子編集治療のコンポーネントを患者に投与して、患者の体内でターゲット細胞の遺伝子編集を行う。 *In vivo* の投与経路は、局所投与と静脈投与による全身投与に分けられる。

*Ex vivo* の場合は、遺伝子編集酵素の細胞導入用のモダリティを試験管内で対象細胞に直接接触させることができる。 DDS 上の課題は、遺伝子編集酵素の導入モダリティの細胞導入にある。 すなわち、高親水性ポリマーである mRNA 分子や DNA 分子、あるいは水溶性タンパク質である遺伝子編集酵素分子を、疎水性バリアーを持ち異物を排除する機構を持つ細胞膜を透過させて細胞内に放出することにある。 *Ex vivo* の DDS 技術としては、(1)エレクトロポレーションを用いて、対象細胞の細胞膜を電氣的に穿孔して、遺伝子編集酵素のタンパク質(Cas9 の場合は RNP)、もしくはそれをコードする mRNA あるいはプラスミド DNA を細胞への導入する方法、(2)ウイルスベクターの細胞侵入能力を利用して DNA を細胞導入する方法、(3)LNP など両親媒性のナノ粒子のノンウイルスベクターに mRNA あるいはプラスミド DNA を内包してエンドソームを介して細胞膜を通過させる方法などが、臨床応用用途に検討されている。

*In vivo* の場合には、遺伝子編集治療製品が局所投与ないし全身投与で投与される。 DDS 技術には、細胞膜透過の課題に加えて、投与部位から遺伝子編集処理の対象となる臓器、組織、細胞までの遺伝子編集酵素のモダリティの到達とその集積効率を考慮する必要がある。 ターゲット臓器以外への送達と集積は薬理効果の低減と副作用の懸念の拡大につながる。 このため、*In vivo* 投与で選択可能な DDS は *ex vivo* よりも限られる。 現状では、遺伝子編集酵素をコードするプラスミド DNA を搭載した AAV ベクターか、同酵素をコードする mRNA を内包した LNP 製剤が選択肢となる。 AAV ベクターでプラスミド DNA を送達した場合は、前節で議論した遺伝子編集酵素の長期間暴露による OTE の問題がある。 脂質ナノ粒子である LNP 製剤は、肝臓と肝実質細胞による血液中のリポタンパク質取り込み機構を介して、静脈血に投与された大半が肝臓に取り込まれる<sup>14)</sup>。 このため、LNP は現時点では肝臓以外の臓器をターゲットにすることはできない。 このような DDS 技術とそれに伴う OTE のリスクの制約から、実際の遺伝子編集治療製品の臨床

開発でどのような DDS 技術が選択されているかについては、本論文の調査の対象とし、第 4 章 4.4.2 節で議論する。

In vivo 用の遺伝子編集治療製品には、非臨床試験のデザインにおいても制約がある。遺伝子編集治療製品の安全性の評価には、遺伝子編集酵素の DDS 技術の性能発揮には体内の血管構造や血液組成、臓器組織の構造などが複雑に影響すること、さらに遺伝子編集酵素のオンターゲット/オフターゲットの編集能には、対象細胞内での染色体 DNA のヒストンクロマチン構造などが影響するために、ターゲット臓器や組織、細胞を用いた実験を行うことが望ましい。しかし、ヒトと実験動物では染色体の DNA 配列が異なるため、in vivo 動物モデルから得られるヒト用遺伝子編集治療製品の安全性に関する情報は限定的であり、特に OTE に関する情報は得られない。Ex vivo 製品では、非臨床試験においてヒト臨床試験の遺伝子編集の対象細胞:ヒト細胞(T 細胞や HSPC)を用いて、実際の臨床用途と同じ条件で臨床試験に用いるヒト用の遺伝子編集技術の評価できる。しかし、in vivo 製品の非臨床試験ではそれが実施できない。このような制約の下で、実際の非臨床開発において、ex vivo と in vivo の遺伝子編集治療製品にどのような OTE の評価が行われたかについては、第 3 章に調査結果を記載する。

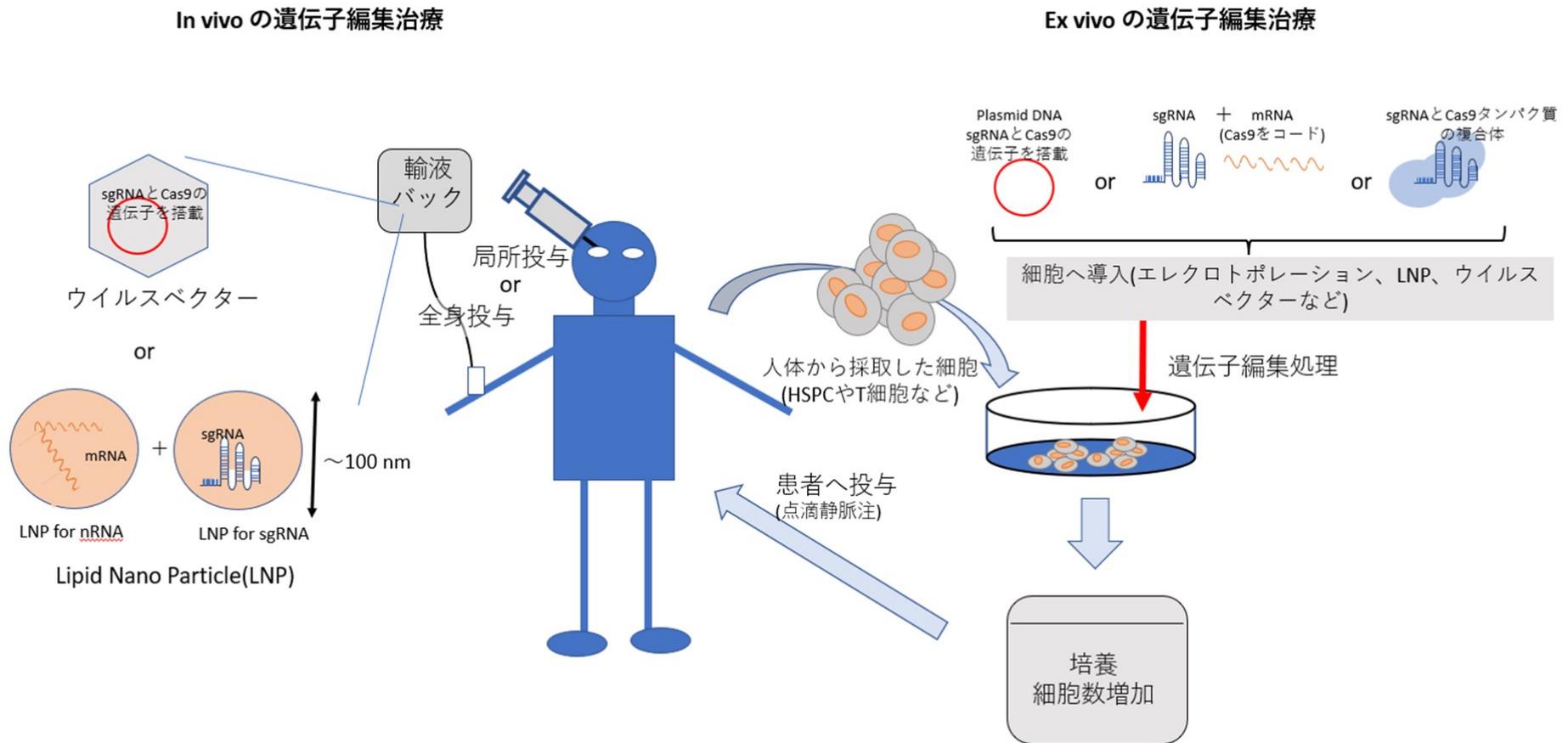


図 1-6 遺伝子編集治療製品の投与ルート (文献 21 を参考に著者が作成)

遺伝子編集治療製品の投与経路は、ex vivo と in vivo の 2 つに大別される。ex vivo による遺伝子編集治療では、遺伝子編集処理を行った血液細胞組織 (造血幹細胞や T 細胞等) を患者に移植する。DDS としては、エレクトロポレーション、ウイルスベクター、ノンウイルスベクターが利用される。in vivo による治療では、遺伝子編集治療製品が局部投与ないし全身投与で投与される。DDS としては、ウイルスベクターか LNP 等のノンウイルスベクターが利用される。この図では、CRISPR-Cas9 の場合を図示した。ZFN、TALEN も同様のスキームだが、これらの場合は sgRNA は不要となる。

表 1-3 遺伝子編集治療製品の投与ルートとリスク (著者作成)

	ex vivo	in vivo
	体外で遺伝子編集を行った細胞(造血幹細胞等)を患者に移植	患者の体内で目的組織中の目的細胞のDNAを編集
遺伝子編集技術要素の細胞へのデリバリー方法	エレクトロポレーション ウイルスベクター Lipid Nano Particle (LNP) など	ウイルスベクター Lipid Nano Particle (LNP) など
対象組織・臓器以外の遺伝子編集のリスク	リスクは少ない	ターゲット細胞以外への遺伝子編集技術要素の送達のリスクがある
前臨床試験の制約	ヒトのターゲット細胞のそのもので前臨床試験が可能	前臨床試験でヒトのターゲット細胞そのものを用いることができない。ターゲット細胞に近いin vitroモデルを利用することになる

### 1.1.4 遺伝子編集治療に係る安全性の論点

#### 遺伝子編集のオフターゲット作用(OTE)とそれに伴う発がん性のリスク

OTEは、がん抑制遺伝子の破壊や、がん遺伝子のサプレッサー領域の破壊によるがん関連遺伝子の活性化を引き起こす可能性がある。また、同一細胞内で染色体DNA上の複数の位置でオフターゲット切断が同時に起こることによって、染色体の転座を含む大規模な染色体の再構成が生じることが報告されている<sup>22)</sup>。OTEは、このように染色体DNAに対して意図しない恒久的な変異を与えるため、発がん性を含む重篤な副作用につながるリスクが指摘されており<sup>23)</sup>、これが臨床応用上の懸念となっている。

#### OTEの検出限界

OTEの発がん性のリスク評価では、開発予定の遺伝子編集製品がOTEを染色体DNAのどの部位にどのような頻度で生じるのかを非臨床試験で詳細に解析して、臨床応用時に予見されるOTEと既知のがん関連遺伝子の情報との関連が論じられるべきである。このために、OTEのプロファイルを記述するための解析法が必要とされてきた。全ゲノムシーケンスによってOTEによって生じたindelを見つけ出すのが最もバイアスが少ない方法で理想的だが、巨大なヒト染色体DNA全長のどこに生じるかわからない僅かな頻度のOTEを全ゲノムシーケンスによって検出するのはコストとリソースの面から現実的ではない<sup>24)</sup>。このため、染色体DNA全長の中からOTEの候補部位(Potential Off-target Loci: POL)を効率的に探す方法が探究されてきた。代表例を表1-4に示す。

表 1-4 OTEの候補部位(POL)検出のための代表的な実験方法 (筆者作成)

開発年	名称	対象	方法
1990年	SELEX法 <sup>25)</sup>	試験管中のDNA	ZFNにアフィニティの高いDNA断片をランダムライブラリーから試験管内選別・PCR増幅させて、ZFNに結合しやすい配列断片を分離。PCR増幅産物のNGSで配列解析を行いOTEの候補とする。
2014年	ChIP-Seq <sup>26)</sup>	生きた細胞中のDNA	切断活性を持たないdCas9/gRNA複合体に結合するDNA断片をdCas9抗体で釣り上げてPCR増幅後にNGSで同定する。見出されたCas9/gRNAが結合しやすい配列をOTEの候補とする。
2015年	GUIDE-Seq <sup>30)</sup>	生きた細胞中のDNA	両端をリン酸化したdsDNAを細胞にトランスフェクション、遺伝子編集酵素のオン・オフターゲットのDNA切断の際にNHEJ挿入されるdsDNAをマーカーとしてPCR増幅とNGS解析を行うことで切断箇所を見つける。
2015年	Digenome-seq <sup>27)</sup>	試験管中のDNA	脱タンパク質、ランダム断片化、溶液化した染色体DNAを遺伝子編集酵素でオンターゲット、オフターゲット切断を行う。このサンプルのNGSによる解析を行い、この配列情報を計算機上でアライメント。オンターゲット、オフターゲットでの特異的切断部位が、配列情報の開始ないし末端として集中して検出される。
2017年	CIRCLE-seq <sup>28)</sup>	試験管中のDNA	全ゲノム断片を環状化。これを遺伝子編集処理、切断・線状化した断片のみをPCR増幅とNGS解析を行う。見出された切断配列をOTEの候補サイトとする。
2017年	SITE-Seq <sup>29)</sup>	試験管中のDNA	ビオチン化マーカーDNAをDNA断片箇所をライゲーションさせ、ビオチンセレクションでDNA切断箇所を濃縮し、そのPCR増幅産物の配列をNGSで解析する。
2020年	DISCOVER-Seq <sup>31)</sup>	生きた細胞のDNA	遺伝子編集処理中のサンプルを固定、切断部位を含む染色体DNAを抽出、断片化。切断末端に集積するMRE11タンパク質を抗体で釣り上げることで切断部位を含む断片を濃縮、PCR増幅を掛けたのちにNGSで解析する。

POL、PCRによるサンプルの増幅と次世代ゲノムシーケンス(NGS)によるサンプルの

DNA 配列解析を組み合わせた方法が主流となっている。測定方法は次の 3 つのグループに分けることができる: (1)細胞外の試験系で、遺伝子編集酵素と結合しやすい DNA 配列を探索する方法、(2) 細胞外の試験系で、遺伝子編集酵素による DNA の切断の現象を検出する方法、(3) 細胞内での遺伝子編集酵素の DNA 切断のイベントを検出する方法。

“(1)の方法”としては、ランダム DNA 断片のライブラリーから遺伝子編集酵素との結合力が強い DNA 断片を、遺伝子酵素との結合力によるセレクションと PCR 増幅のサイクルを繰り返すことで選別する SELEX 法<sup>25)</sup>や、抗 Cas9 抗体を用いた免疫沈降によって dCas9(切断能を失活化した Cas9)と結合する DNA 断片をライブラリーから選択して PCR 増幅を行う CHIP 法<sup>26)</sup>がある。いずれも選別した DNA 断片を NGS で解析する。“(2)の方法”としては、遺伝子編集酵素によって DSB を起こした DNA の NGS のシーケンス情報を切断部でアライメントして切断箇所を特定する Digenome-seq<sup>27)</sup>(この方法は PCR を用いない)、環状化 DNA のライブラリーを遺伝子編集酵素で処理して直鎖化した DNA 断片の配列を PCR 増幅後に NGS で読み取る CIRCLE-seq<sup>28)</sup>、ビオチン化マーカ-DNA を DNA 断片箇所にライゲーションさせて Biotin セレクションで DNA 切断箇所を濃縮、さらに PCR 増幅後にその配列を NGS で解析する SITE-seq<sup>29)</sup>が挙げられる。“(3)の生きた細胞に導入された遺伝子編集酵素が起こした DSB を検出する方法”としては、遺伝子編集酵素と同時にマーカ-dsDNA を細胞に導入して DNA 切断箇所と結合させて、この dsDNA をガイドとした PCR による増幅産物の配列を NGS で解析する GUIDE-seq<sup>30)</sup>、DNA 切断部位に集合・結合する MER11 タンパク質を抗体で釣り上げることで DNA 切断断片を選択的にサンプルして PCR 増幅、その後 NGS で DNA 配列解析を行う DISCOVER-seq<sup>31)</sup>などがある。

これらの内で、Digenome-seq を除いたすべての方法は、PCR によって増幅した DNA 断片を NGS 解析した配列情報に基づいて POL の検出と定量を行う。また、実際に DSB の後の NHEJ が引き起こした OTE の解析には、POL を PCR 増幅した後に NGS 解析で Indel の有無を読み取る Amplicon-seq が用いられる。

PCR の際には、DNA ポリメラーゼによる DNA の複製時のエラーや高温処理による DNA の分解によって、増幅配列に塩基の置換や、DNA 断片の挿入や短い配列削除(indel)が生じる。このため、PCR 法を利用するすべての DNA 配列解析データには、PCR 操作による DNA 配列のエラー(一塩基置換や Indel)が一定の頻度で混入する<sup>32)</sup>。これが、DNA の変異を検出する際の擬陽性になるため、PCR と NGS を組み合わせる方法での OTE 解

析においては、変異率\*0.1%程度の DNA 変異の検出が感度限界だと考えられている<sup>24</sup>。

\*仮に 1,000 細胞の染色体からそれぞれ特定の同一区画の DNA 断片を 1,000 個の抽出した場合に、このうち変異がなく完全な配列をもつ DNA 断片が 999 個あり、変異がある配列の DNA 断片が 1 個であった場合に、変異率を 0.1%と定義する。これを検出できる検出感度を検出感度 0.1%とする。

上述した解析法の内では、Digenome-seq のみが PCR 法を用いないためその増幅エラーの制限を受けない。しかし、Digenome-seq にも NGS の検出ノイズの制約があるため POL の検出感度は~0.05%程度である<sup>27</sup>。また Digenome-seq は、細胞外で精製した DNA 溶液を遺伝子編集酵素で処理した場合に適用可能だが、実際に生きた細胞に行った遺伝子編集の解析には利用できないという限界がある<sup>27</sup>。

生きた細胞の遺伝子編集後の染色体 DNA の POL 及び OTE の検出に適応可能な方法は、いずれも PCR の増幅と NGS が利用される。このため、0.1%以下の低い変異率の POL や OTE のプロファイルを知るための実験的な手段はないとされる<sup>24</sup>。

臨床応用においては、膨大な数の細胞が遺伝子編集処理をうけることになる。Ex vivo の治療では、体重 1kg あたり~ $1 \times 10^7$  個の遺伝子編集された細胞が患者に投与される<sup>17,33~35</sup>。In vivo の治療では、例えば肝臓を遺伝子治療のターゲットとすると、肝臓に存在する~ $10^{12}$  の細胞<sup>36</sup>が遺伝子編集される。OTE の検出限界~0.1%は、1 回の治療あたり ex vivo では 10,000 個、肝臓では~ $10^8$  個の細胞数に相当する。すなわち、肝臓の遺伝子編集の治療を狙った場合は、肝臓 1 臓器あたり 1 個~ $10^8$  個細胞の範囲で生じる OTE については、現行の技術ではそのプロファイルを描けないことになる。僅か数個の細胞の染色体 DNA に生じた変異が個体に重大な影響を及ぼす可能性のある発がん性が遺伝子編集治療のリスクであることを考慮すると、この検出感度は十分ではないことは明らかである。

## 遺伝子編集治療を取り巻く安全性の課題

図 1-7 に遺伝子編集治療を取り巻く安全性の課題を整理した。遺伝子編集治療には遺伝子編集酵素の細胞導入のためのモダリティの選択と DDS 技術の選択によってさまざまな安全性のリスクが存在する。図 1-7 の右の緑の囲みには、遺伝子導入に関するリスクを整理した。遺伝子編集酵素を DNA のモダリティとしてウイルスベクターで送達する場合は、ウイルスベクターによるがん遺伝子の活性化や、ウイルスベクターの感染能の再獲得による持続感染の確立、ウイルスベクターに対する免疫反応のリスクなどがある<sup>37)</sup>。これらは、従来の遺伝子治療の課題であるため、遺伝子治療の開発分野での研究が進められている。また、図中の左に緑の囲みで示した mRNA での送達に関するリスクとしては、外来性 mRNA の細胞導入に対する拒絶反応(TLR による炎症反応)、LNP に対するインフュージョンリアクションなどが存在する<sup>38)</sup>。これらの課題は、遺伝子治療の課題や mRNA-LNP 医薬品の課題として、遺伝子編集とは離れた領域で解決への取り組みが進められている。一方で、図中央の桃色の囲みで示した遺伝子編集酵素による OTE がん遺伝子の活性化/がん抑制遺伝子の不活化、複数点のゲノム同時切断による染色体転座は、他領域の研究がカバーしない、遺伝子編集治療に固有で新しい課題である。また、OTE はシリアスな結果をもたらすリスクであるが、実験的な検出が困難な課題である。したがって、OTE による発がん性が遺伝子編集治療の安全性の議論の中心に据えられている。本論文では、遺伝子編集治療製品の安全性の担保の研究として、OTE を議論の中心に置くこととした。

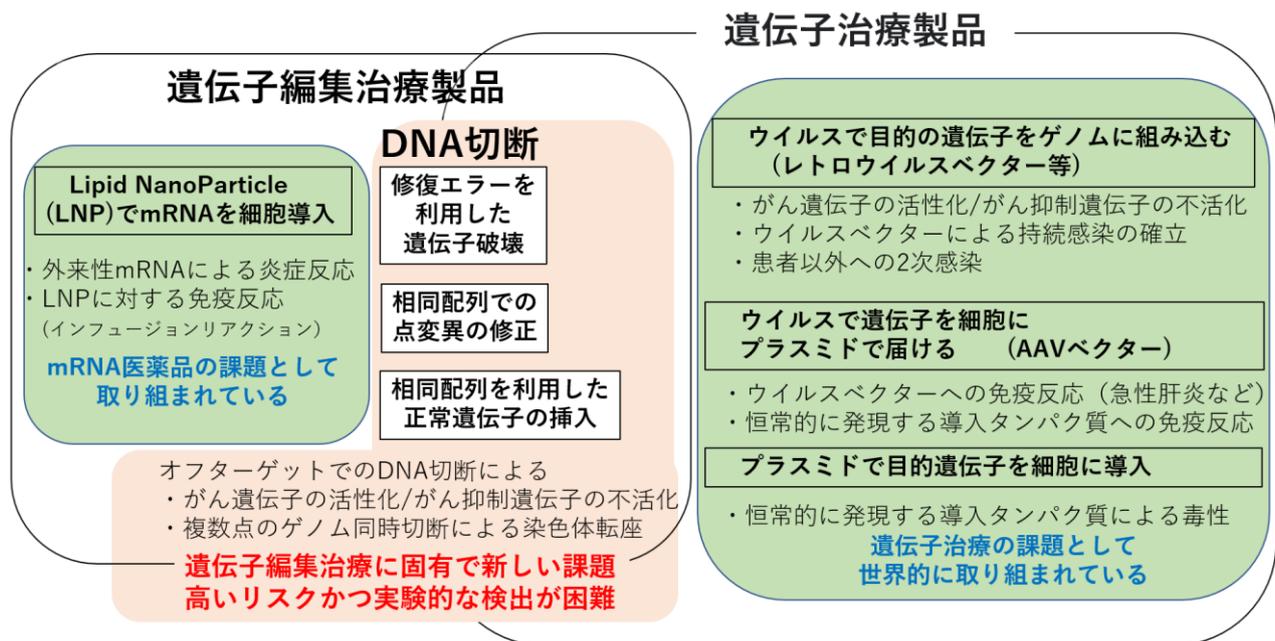


図 1-7 遺伝子編集治療を取り巻く安全性の課題 (著者作成)

遺伝子編集治療には、その遺伝子編集酵素の細胞導入のためのモダリティの選択と DDS 技術の選択によってさまざまな安全性のリスクが存在する。遺伝子編集酵素を DNA のモダリティとしてウイルスベクターで送達する場合は、ウイルスベクターによるがん遺伝子の活性化や、ウイルスベクターの感染能の再獲得による持続感染の確立、ウイルスベクターに対する免疫反応のリスクなどがある(右: 緑の囲み)。mRNA での送達に関するリスクとしては、外来性 mRNA の細胞導入に対する拒絶反応(TLR による炎症反応)、LNP に対するインフュージョンリアクションなどが存在する(左: 緑の囲み)。遺伝子編集酵素による OTE がん遺伝子の活性化/がん抑制遺伝子の不活化、複数点のゲノム同時切断による染色体転座は、遺伝子編集治療に固有で新しい課題である(中央: 桃色の囲み)。

## 1.2 本研究の目的

遺伝子編集技術は、生きた細胞中の DNA を切断して改変するという、今までの医薬品とはまったく異なる作用機序を有するため、臨床開発におけるガイドラインの整備や非臨床試験、臨床試験での安全性評価等についての課題が存在する。特に遺伝子編集治療製品に固有で新しい課題である OTE は重篤な副作用のリスクにつながる可能性があるが、十分な検証手段がないという課題がある。遺伝子編集の技術は、遺伝病、がん、感染症など様々の領域でこれまで治療法がなかった疾患に新しい治療法を確立できる大きな可能性と価値を有しているため、数多くの企業や研究機関がその臨床応用を目指した研究を進めている。しかし、OTE のリスク評価のための非臨床試験や臨床試験での安全性評価の標準化された基準が公開されていないため、臨床試験へのトランスレーショナルリサーチに大きなチャレンジがある。特に、日本では遺伝子編集治療の臨床開発のスタートが欧米に比べて非常に遅れている。本論文では日米欧における遺伝子編集治療に係る規制の現状を調査・分析し、遺伝子編集治療製品の非臨床試験および臨床試験における安全性評価のあり方を考察して、日本における遺伝子編集治療製品開発の円滑化を目指した提言を目的とした。

## 第2章 遺伝子編集治療に係る日米欧のガイドラインの分析と比較

### 2.1 目的

第1章で、遺伝子編集治療製品には、OTEによる発がん性等の有害事象のリスクがあるが、その実験的な評価には技術的な限界があることを述べた。アンメットメディカルニーズの高い難病の克服を目指して、遺伝子編集治療製品の開発に取り組む企業やアカデミアは、非臨床試験では払拭することが原理的にできない発がん性のリスクを内在した遺伝子編集製品の臨床試験を実施することになる。当然、一企業やアカデミアの単独の判断と責任でこれを開始することはできず、非臨床試験及び臨床試験での実施項目についての適切なガイドラインを必要とする。本章では、日米欧の規制当局が自国・域内でのこのようなリスクのある遺伝子編集治療製品の開発を支援するために、どのようなガイドラインを制定しているのかを明らかにすることを目的とした。

本章では、各規制当局が発行したガイドラインの分析を行うと同時に、規制当局間のガイドラインの比較を行うことで、今後の3章以降で明らかにしていく各国での非臨床試験と臨床試験の状況を理解する基礎とする。各国のガイドラインの記載内容の棚卸を行って内容の質的な比較を行った。質的な解析では比較検討の焦点の当て方によっては恣意性が生じてしまう。客観性を補完するために、記載事項の量的な解析を補完的に実施することを試みた。各項目に関する記述量の大小は、各ガイドラインが提供する情報の価値や有用性には直ちには関係しないが、すくなくとも提供する情報量には関係する。ここに本章で示す、ガイドラインの量的な解析の先例はなく、本論文のオリジナルな手法である。

## 2.2 方法

### 2.2.1 日米欧のガイドラインの記載量の比較 –異なる言語の比較方法–

日本語と英語のそれぞれの言語で書かれたガイドラインの記載量の分析と数量比較を可能にするため、医薬品ガイドラインの記述量に関する日本文と英文の換算係数を求めた。

換算係数の算出には、同一内容が英語と日本語のそれぞれで書かれた文書を材料として用いる必要があり、材料として、International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)が発行したガイドラインを用いた。ICH は医薬品開発のスキームの国際調和を目的とするため、ICH のガイドラインには、英語版と参加国各国が発行する自国語版の両方の公式文書が存在する。本節では、公式化が完了した ICH ガイドラインの内、日本国の Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)のウェブサイト<sup>39)</sup>に日本語版が公開された 76 件を材料とした。

記載分量の算出にあたり、表記法として分かち書きをする言語である英語はその分量として単語数をカウントした。分かち書きをしない言語である日本語は文字数をカウントした。英文版の単語数と日本語版の文字数のカウントは本文のみを対象とした。目次、注釈、表と図及びその説明、用語の定義はカウントに含めなかった。単語数及び文字数のカウントには、Microsoft word2010 を用いた。

続いて、各文書の英語版の単語数と日本語版の文字数の比：換算係数(=日本語版の文字数÷英語版の単語数)を求めた。さらに Microsoft Excel2010 を用いて、文書間の平均と標準偏差を求めた。計算は、全文書、品質に関する ICH-Q シリーズ、非臨床試験に関する ICH-S シリーズ、および臨床試験に関する ICH-E シリーズのそれぞれの文書群について行った。

### 2.2.2 日欧米のガイドラインの記載内容の比較

日本並びに欧州と米国とも、2022 年 12 月時点で遺伝子編集治療製品にフォーカスした安全性に関するガイドラインを制定していない。このため、より広義の概念である“遺伝子治療製品”のガイドラインを分析対象とした。表 2-1 に、2018 年以降に日本並びに欧州と米国で制定ないし改定の行われた遺伝子治療製品の品質と安全性に関するガイドラインを示した。

表 2-1 2018 年以降に制改定された遺伝子治療用製品の品質と安全性に関する日米欧のガイドライン (著者作成)

国/地域	日本	米国	EU
ガイドライン名	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)	①Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry (2020) ②Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products Guidance for Industry (2020)	Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (2018)
対象技術	2. 適用対象 3. 定義 (1) 「遺伝子治療用製品等」とは, 再生医療等製品のうち遺伝子治療用製品及び遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品をいう.  薬機法 別表第二 (第一条の二関係) 遺伝子治療用製品 一. プラスミドベクター製品 二. ウイルスベクター製品 三. 遺伝子発現治療製品 (前二号に掲げる物を除く.)	Human gene therapy product: FDA generally considers human gene therapy products to include (中略) engineered site-specific nucleases used for <b>human genome editing</b> , 10 and ex vivo genetically modified human cells.	Historically many gene therapy approaches have been based on expression of a transgene encoding a functional protein (i.e. the transgene product). (中略) and <b>gene editing approaches</b> such as CRISPR-Cas, Zinc finger nucleases (ZFNs) or TALENs.
対象範囲	品質/前臨床試験/臨床試験	①品質 ②前臨床試験/臨床試験	品質/前臨床試験/臨床試験

表 2-1 に示した 4 つのガイドラインを分析の対象とした。まず、対象のガイドラインの本文をパラグラフ(段落)単位に分解した。その後、各パラグラフの記載内容を検討して、“品質: Quality”、“非臨床開発: Nonclinical development”、“臨床開発: Clinical Development”と“その他: Other; Background, Scope, Formality, and other”の 4 つのカテゴリに分類した。それぞれのカテゴリに分類したパラグラフの記述量を Microsoft Word 2010 を用いてカウントして積算した。日本のガイドラインの文字数は、英語の単語相当値に換算値 2.7(結果 2.3.1 節参照)を用いて換算した。算出した記述量を図 2-3 に示した。米国のガイドラインについては、US-CMC-Guideline(2020)と US-LTFU-Guideline(2020)の 2 つのガイドラインの積算値で示した。

さらに“品質: Quality”、“非臨床開発: Nonclinical development”、“臨床開発: Clinical Development”の 3 つに分類されたパラグラフを下位項目に再分類した。“品質: Quality”については、製品のデザインに関する要求や記述に関する“Product design”、製造プロセスの記述とコントロールに関する“Manufacturing process control”、細胞、ウイルス、プラスミドやその他原材料に関する“Raw material control”、製品の特性解析と規格及び試験法、安定性試験に関する“Quality evaluation”、そして“General principal and other”に分類した(図 2-4)。“非臨床開発: Nonclinical development”については、“General principal”、“Pharmacological”、“ADME”、“Safety”に分類した(図 2-5)。“臨床開発: Clinical Development”については、“Informed consent”、“Pharmacological”、“ADME”、“safety”、“General principal”と“Others”に分類した(図 2-6)。

それぞれのガイドラインに記載された主な事項について、“品質: Quality”に関する事項は表 2-3 に、“非臨床開発: Nonclinical development”に関する事項は表 2-4 に、“臨床開発: Clinical development”に関する事項は表 2-5 にそれぞれにまとめた。

## 2.3 結果

### 2.3.1 日欧米のガイドラインの記載量の比較方法の確立

上述の全 76 件のガイドラインについて、英語版の単語数と日本語版の文字数をカウントして、その比(日本語版の文字数÷英語版の単語数)を図 2-1 に示した。続いて、英語版の単語数と日本語版の文字数を図 2-2 にプロットした。プロットは最小二乗法を用いた直線近似で近似することができた。近似式は、 $y=2.70x+103$  となった。決定係数は  $R^2=0.993$  であり、直線性は良好であった。分析の対象としたガイドラインの記述量は、最小である ICH Q1C の 192 ワードから、最大である ICH Q3D の 20,448 ワードまでの大きな開きがあったが、単語数によらずに直線近似が可能であった(図 2-2)。したがって、日本語文字数( $y$ ) $\propto 2.7 \times$  英語単語数( $x$ )と換算することができる。この結果を踏まえ、英語版の単語数と日本語版の文字数の換算係数を 2.7 とした。

英文単語数と日本語文字数の比について、解析対象とした全文書の平均と標準偏差を表 2-2 に示した。全 76 文書の平均は 2.7、標準偏差は 0.2 であった。さらに、解析対象文書を分野毎のサブグループに分けて解析を行った。サブグループは、品質におけるガイドライン(ICH-Q シリーズ)、非臨床試験に関するガイドライン(ICH-S シリーズ)、臨床試験に関するガイドライン(ICH-E シリーズ)とした。換算係数の平均±標準偏差は、ICH - Q シリーズが  $2.7 \pm 0.2$ 、ICH - S シリーズが  $2.6 \pm 0.1$ 、ICH - E シリーズが  $2.7 \pm 0.2$  であった。換算係数に、品質、非臨床試験、臨床試験のサブグループ間に差異はなく、ほぼ同一の値であった。



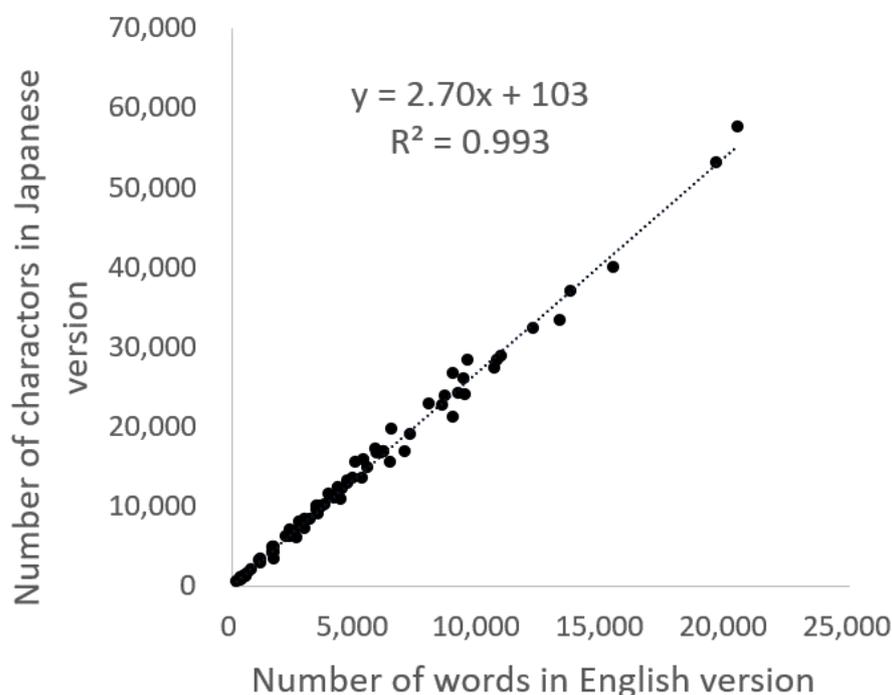


図 2-2 ICH のガイドラインの英語版の単語数と日本語版の文字数のプロット (著者作成)

参加国で調和がなされている ICH のガイドラインについて英文版及び日本語版(日本国政府が発行)の本文(目次, 略語表, 注釈, 図, 表, および図表の説明をのぞく)の英文の単語数及び日本語の文字数をマイクロソフト Word2010 でカウント、英文単語数と日本語の文字数をプロットした。直線性は良好で、英文単語数と日本語の文字数の比率は 2.7 で一定であった。

表 2-2 ICH のガイドラインの英語版の単語数と日本語版の文字数の比率

ICHガイドライン			品質に関する Qシリーズ			非臨床試験に関する Sシリーズ			臨床試験に関する Qシリーズ		
Number of guidelines	Ave	STD									
76	2.7	0.2	39	2.7	0.2	14	2.6	0.1	23	2.7	0.2

### 2.3.2 日欧米のガイドラインの記載量と内容の解析

#### 分析対象とした日米欧のガイドラインにおける遺伝子編集治療の定義

米国は、Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry

JANUARY 2020<sup>40)</sup>(以降これを **US-CMC-Guideline(2020)**と呼ぶ)と Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products Guidance for Industry JANUARY 2020<sup>41)</sup>(以降これを **US-LTFU-Guideline(2020)**と呼ぶ)の2つのガイドラインを発行した。いずれも遺伝子治療(Gene Therapy)を表題としたガイドラインであるが、遺伝子編集治療製品を遺伝子治療製品のカテゴリーに含め、ガイドラインの対象とすると明記している。US-CMC-Guideline(2020)は、遺伝子治療製品の製品品質(CMC)にフォーカスしたガイドラインである。US - LTFU - Guideline(2020)は、臨床試験において治療の介入から長期間の時間が経過したあとに生じる可能性のある遅延性の有害事象についてのリスク評価の方法を規定するガイドラインである。想定する遅延性の有害事象のリスクには、遺伝子編集酵素による OTE を原因とする発がん性を含む。欧州医薬品局(EMA)による Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products<sup>42)</sup>(以降これを **EU-guideline(2018)**と呼ぶ)も、定義にて、遺伝子編集技術による治療を遺伝子治療の枠組みの一つに含めガイドラインの対象とした。

日本には、「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について」(施行通知・指針本文)(薬生機審発 0709 第 2 号 2019 年 7 月 9 日)<sup>43)</sup>(以降これを **JP-Guideline(2019)**と呼ぶ)という遺伝子治療を対象とした製品の品質と安全性に関するガイドラインがある。上述の米国および欧州の遺伝子治療のガイドラインとは異なり、その定義及び本文に“遺伝子編集”ないし“ゲノム編集”に関する語句は使用されていない。しかし、遺伝子編集治療においても遺伝子編集治療用の遺伝子編集酵素が遺伝子(DNA モダリティ)として導入される場合は、このガイドラインが参照されること、日本においては遺伝子編集治療製品を対象とした安全性に関する他のガイドラインがないことから、JP-Guideline(2019)を本章の分析対象とした。

### 2.3.3 日欧米のガイドラインの記載量の解析

#### 各ガイドラインの「品質(CMC)」、「非臨床開発」、「臨床開発」に関する記載分量

分析対象のガイドラインについて、“品質: Quality”、“非臨床開発: Nonclinical development”、“臨床開発: Clinical development”、“Others” 其他、についての記述量を図 2-3 に示した。JP-Guideline(2019)に関しては、換算係数 2.7 を用いて日本文の文字数を英単語数に換算した。米国については、品質に特化したガイドライン US-CMC - Guideline(2020)と臨床及び非臨床に関するガイドライン US - LTFU - Guideline(2020)の両方で品質と安全性をカバーするため、両方を積算した。米国のガイドラインは2つの合計で 26,873 ワードだった。このうち、品質に関する記載は 15,433 ワード、臨床試験に関する記載は 6,677 ワードだった。非臨床試験に関する記載は 941 ワードと少なかった。欧州のガイドライン(EU-Guideline(2018))は、1 つのガイドラインで品質、非臨床試験、臨床試験の3つの領域をカバーしていた。その分量は 17,951 ワードであり、品質に 7,558 ワード、非臨床に 5,525 ワード、臨床試験に関する事項に 2,817 ワードであった。日本のガイドライン(JP-Guideline(2019))は英文に換算すると 11,847 ワードであった。同ガイドラインは、品質、非臨床、臨床のセクションを備えた。品質に関しては 8,140 ワード、非臨床に関しては 2,209 ワードの記載があった。一方、臨床に関する記載量は 425 ワードと非常に少なかった。

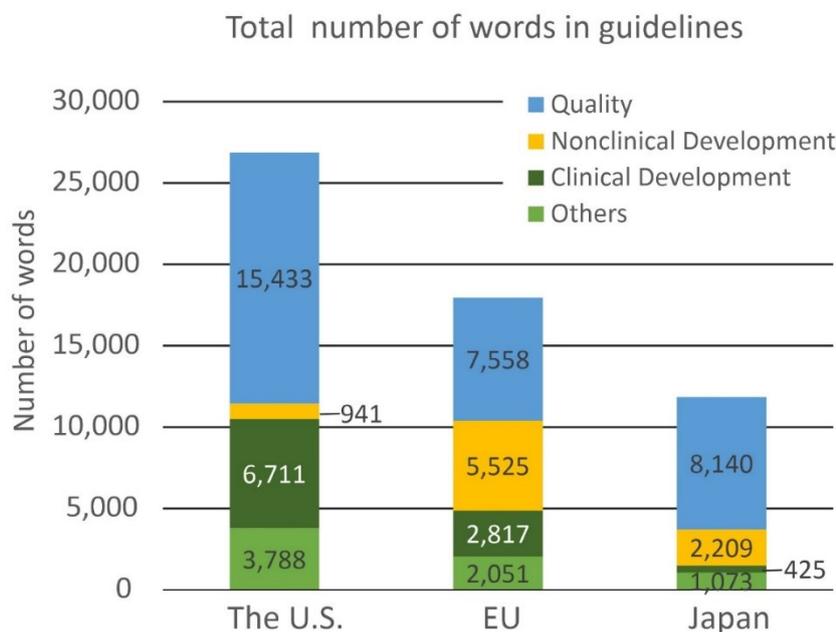


図 2-3 遺伝子編集治療の 3 局のガイドラインの品質、非臨床、臨床開発に関する記述量

(著者作成)

米国のガイドラインである US-CMC-Guideline(2020)と US-LTFU-Guideline(2020)、欧州のガイドラインである EU-Guideline(2018)及び、日本のガイドラインである JP-Guideline(2019)について、全パラグラフを「品質」「非臨床開発」「臨床開発」「その他」に分類した。語数は Microsoft Word 2010 でカウントした。日本語の文章は、換算値 2.7 で英語単語数相当に換算した。

### 品質(CMC)に関する記述

“品質: Quality “については、規格及び試験法を含む品質確認に関する ” Quality evaluation”、製造プロセスとそのコントロールに関する “Manufacturing process control”、原材料やセルバンクに関する記載を “Raw material control”、遺伝子編集製品の設計に関する記述の項目を “Product design” に分類した。また、原則に関する記載事項を “General principle”、その他を “Background, Scope, Formality and other” に分類した。それぞれのガイドラインの記載量を図 2-4 に示した。米国については、US-LTFU-Guideline (2020)には Quality の記載はないため、US-CMC-Guideline(2020)のみの積算となった。日本、米国、欧州のいずれのガイドラインも、Quality の詳細の項目のそれぞれに相応の記載分量を割いており、3 局のガイドラインを比較して極端に少ない記述量の項目はなかった。

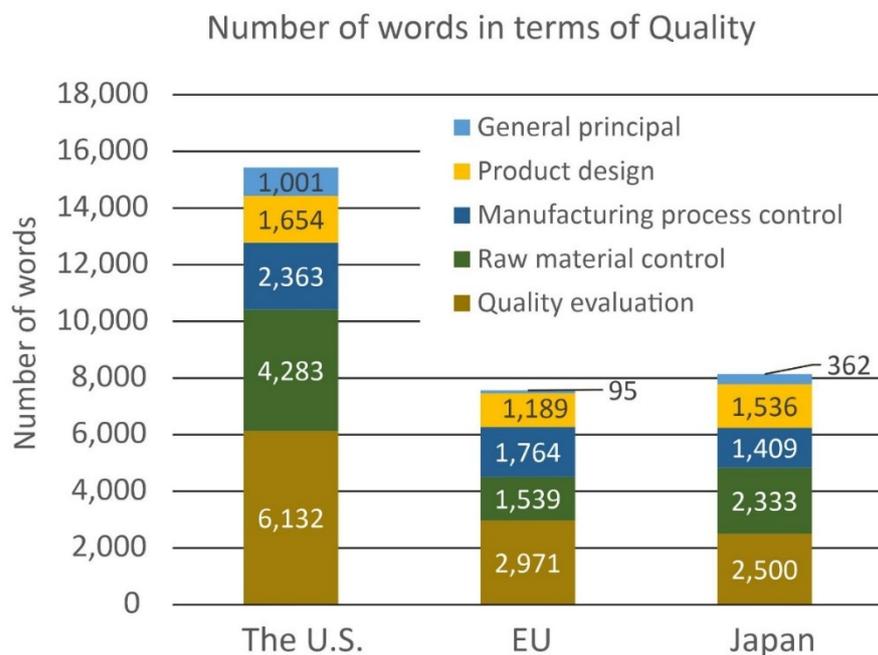


図 2-4 品質(CMC)に関する記述量の詳細 (著者作成)

分析対象のガイドラインをパラグラフ毎に、一般原理、製品設計、製造及びコントロール、原材料管理、品質評価のサブカテゴリーに分類した上で、単語数をカウントした。単語数は Microsoft Word 2010 でカウントした。日本語ガイドラインは、文字数を係数 2.7 で英語の単語数に換算した。

“Product design”、“Manufacturing process control”、“Raw material control”、“Quality evaluation”に関する記載事項を表 2-3 にまとめた。“Product design”に関しては、いずれのガイドラインも、遺伝子編集製品の遺伝子及びベクターに関する設計を詳細に記載することを求めた。すなわち、いずれのガイドラインも Functions and structures of GT、target genes and other components、Vector structure, source, properties and design、Proposed clinical use の記載を要求した。米国のガイドラインでは、製品における Critical Quality attribute の記載を要求することが特徴だった。日本のガイドラインは、発現生成物に関する情報の記載を要求した。

“Manufacturing process control”については、米国、日本、欧州のいずれも製造プロセスに関する詳細な記載とプロセスパラメーターの設定とコントロール法についての記述を求めた。また、中間体の設定とコントロール、製造プロセスを通じての遺伝子の安定性に関する確認を求めた。不純物のコントロールに関する要求、微生物汚染に関しても求めた。

いずれのガイドラインも、開発段階に応じたプロセスバリデーションが行われることを推奨した。

“Raw material control”については、いずれのガイドラインも、細胞、ウイルス、プラスミド等の原材料に関してバンクシステムによる体系的な管理を要求した。その他の原材料すべてについて、管理法の設定と記述を要求した。ウシ・ブタ由来の原材料、ヒト由来の原材料についても、それぞれに関する生物由来原材料の基準に従うことを要求した。欧州のガイドラインは、βラクタム系の抗生物質や毒物をプロセスで使用することを明示的に禁止した点が、日本と米国のガイドラインの要求とは異なった。そのほかの、Raw material controlに関する各国のガイドラインの要求の間には大きな乖離はなかった。

“Characteristic analysis”に関しては、日本、米国、欧州のいずれのガイドラインも、遺伝子治療製品を特徴づける Structure、physicochemical properties、biological properties についてのキャラクタリゼーションを要求した。この要求には、同製品のシーケンスや遺伝的な安定性も含まれた。米国と欧州のガイドラインは、Purity and properties of impurities を要求しており、この点が日本のガイドラインとは異なった。

“Specifications”としては、各国共通して、Identification、biological activity、potency、cell viability、content、purity(impurities from process and raw material、non-infectious particles、supercoiled form of plasmid)、infectious agents、and other general tests などが要求された。

以上の品質に関する要求と助言については、記載分量のバランス及び記載内容について、各国のガイドラインに大きな違いは認められなかった。

表 2-3 遺伝子編集治療の3局のガイドラインの品質(CMC)に関する記載内容のサマリー (著者作成)

	The .U.S.	EU	Japan
<b>Product design</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functions and structures of GT, target genes, and other components</li> <li>• Vector structure, origin, properties and design.</li> <li>• Mode of action and proposed clinical use</li> <li>• <u>Critical Quality Attribute (CQA)</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functions and structures of GT, target genes, and other components</li> <li>• Vector structure, origin, properties and design.</li> <li>• Mode of action and proposed clinical use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functions and structures of GT, target genes, and other components</li> <li>• Vector structure, origin, properties and design.</li> <li>• Mode of action and proposed clinical use</li> <li>• <u>Structure and characteristics of gene expression product</u></li> </ul>
<b>Manufacturing process control</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Description of manufacturing process with diagrams</li> <li>• Process parameters setting and control</li> <li>• Intermediate control</li> <li>• Impurity control</li> <li>• Genomic Stability through productions</li> <li>• Phase appropriate process development</li> <li>• microbiological control</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Description of manufacturing process with diagrams</li> <li>• Process parameters setting and control</li> <li>• Intermediate control</li> <li>• Impurity control</li> <li>• Genomic Stability through productions</li> <li>• Phase appropriate process development</li> <li>• microbiological control</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Description of manufacturing process with diagrams</li> <li>• Process parameters setting and control</li> <li>• Intermediate control</li> <li>• Impurity control</li> <li>• Genomic Stability through productions</li> <li>• Phase appropriate process development</li> <li>• microbiological control</li> </ul>
<b>Raw material control</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provide quality control for all raw materials</li> <li>• Establish cell and virus bank system</li> <li>• Quality control procedure and test method</li> <li>• Microbial and virus burden control</li> <li>• Biological materials safety (porcine, bovine)</li> <li>• Control of human-derived raw materials</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provide quality control for all raw materials</li> <li>• Establish Cell and virus bank system</li> <li>• Quality control procedure and test method</li> <li>• Microbial and virus burden control</li> <li>• Biological materials safety (porcine, bovine)</li> <li>• Control of human-derived raw materials</li> <li>• <u>Prohibition of use of <math>\beta</math>-lactam, streptomycin, and toxic reagents</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provide quality control for all raw materials</li> <li>• Establish cell and virus bank system</li> <li>• Quality control procedure and test method</li> <li>• Microbial and virus burden control</li> <li>• Biological materials safety (porcine, bovine)</li> <li>• Control of human-derived raw materials</li> </ul>
<b>Quality evaluation</b>	<p><b>Characteristic analysis:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Structure, physicochemical properties, biological properties</li> <li>• Purity and properties of impurities</li> <li>• Sequence</li> <li>• Genetic stability</li> </ul> <p><b>Specifications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identity, biological activity, potency, content, purity(impurities from process and raw material, non-infectious particles), infectious agents, and other general tests</li> </ul> <p><b>Stability</b></p>	<p><b>Characteristic analysis:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Structure, physicochemical properties, biological properties</li> <li>• Purity and properties of impurities</li> <li>• Sequence</li> <li>• Genetic stability</li> </ul> <p><b>Specifications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identity, biological activity, potency, content, purity(impurities from process and raw material, non-infectious particles), infectious agents, and other general tests</li> </ul> <p><b>Stability</b></p>	<p><b>Characteristic analysis:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Structure, physicochemical properties, biological properties</li> <li>• Purity and properties of impurities</li> <li>• Sequence</li> <li>• Genetic stability</li> </ul> <p><b>Specifications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identity, biological activity, potency, content, purity(impurities from process and raw material, non-infectious particles), infectious agents, and other general tests</li> </ul> <p><b>Stability</b></p>

GT: Gene therapy Product

## 非臨床開発に関する記載

非臨床試験に関する事項については、“General Principal”、“Pharmacological”、“ADME”、“Safety”に分類した。米国のガイドラインの非臨床試験に関する記載は限られており ADME に関する項目だけであった。欧州のガイドラインには、3つの領域について記載があった。Pharmacological に 1,355 ワード、ADME に 1,428 ワードに対して、Safety に 2,242 ワードを振り分けた。日本のガイドラインは、非臨床に関する 2,209 ワードの記載の内、1,507 ワードを Safety に関する記載に当てた(図 2-5)。

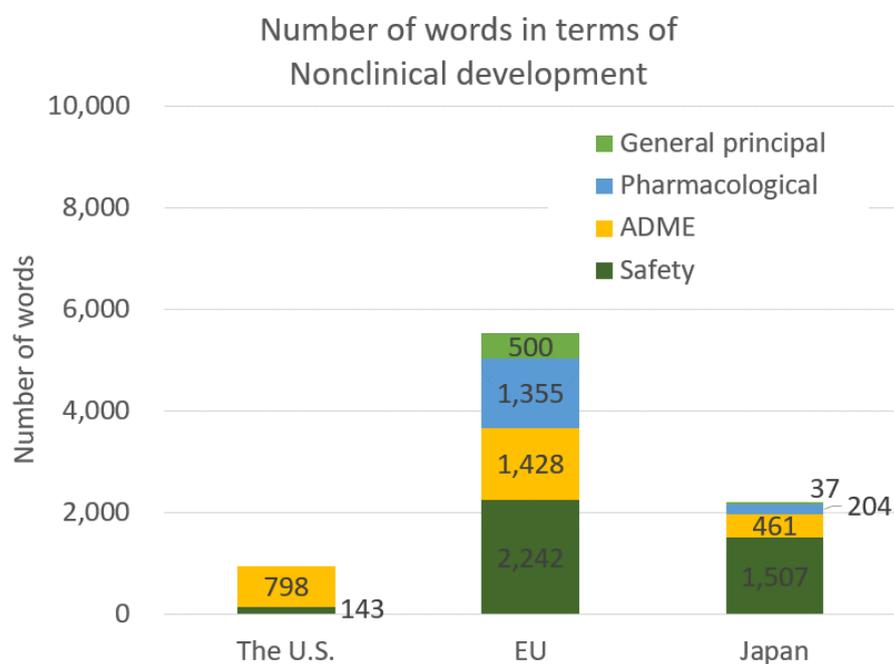


図 2-5 非臨床開発に関する記載量の詳細 (著者作成)

分析対象のガイドラインをパラグラフ毎に、一般原理、薬理、ADME、安全性のサブカテゴリーに分類、単語数をカウントした。単語数は Microsoft Word 2010 でカウントした。日本語ガイドラインは、文字数を係数 2.7 で英語の単語数に換算した。

続いて、非臨床試験についての日本、米国、欧州のガイドラインの主な記載事項を表 2-4 にまとめた。図 2-5 に記載した通り、米国のガイドラインの非臨床試験に関する記載は少ない。米国のガイドラインは、遺伝子治療製品の生体での分布と持続性を調べ、そのデータに基づくリスクベースのアプローチによって臨床試験での長期観察の計画を建て安全性の確認を行うことを求めた。欧州、日本のガイドラインも、同様に遺伝子治療製品の

分布、持続性のデータを取得することを求めた。欧州のガイドラインはさらに、第三者への伝播のリスクの懸念をアセスメントすることを目的に、排出の試験をすることを求めた。

欧州と日本のガイドラインは、臨床で期待される作用機序を明らかにすること、臨床での投与レジメンを決定することを目的に **Pharmacological study** の実施を求めた。

欧州と日本のガイドラインは、安全性の試験に関し一般毒性試験に加えて、染色体への組み込みを調べる遺伝毒性、がん原性試験、免疫毒性試験、生殖毒性を注意すべき項目として挙げ、非臨床試験で検討することを求めた。がん原性試験については、日本・欧州いずれのガイドラインにおいても、通常の薬剤に求められるがん原性試験は不要とした。代わりに、欧州のガイドラインでは **ICH S6** の **carcinogenicity session** に従った試験の設定をもとめ、日本のガイドラインは科学的な方法でのがん原性の試験の設定を求めた。免疫毒性に関しては、遺伝子治療製品のベクターや発現産物に関する免疫毒性についての検証を要求した。非臨床試験については、日本と欧州のガイドラインに類似点が多かった。

非臨床の安全性試験に関する記載は米国のガイドラインにはなかった。

表 2-4 遺伝子編集治療の3局のガイドラインの非臨床開発に関する記載のサマリー (著者作成)

	The U.S.	EU	Japan
<b>Pharmacological study</b>	N/A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clarification for mechanism of action</li> <li>• Provide rationale for clinically planned dosing regimen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clarification for mechanism of action</li> <li>• Provide rationale for clinically planned dosing regimen</li> </ul>
<b>ADME</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribution, persistence, and clearance in target / non-target tissues</li> <li>• Combination with safety study</li> <li>• Sensitive and quantitative detection of product sequence with PCR assay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribution, persistence, and clearance in target / non-target tissues</li> <li>• Combination with safety study</li> <li>• Sensitive and quantitative detection of product sequence with PCR assay</li> <li>• Transmission to germ cells</li> <li>• <u>Excretion study for verification of potential exposure to others</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribution, persistence, and clearance in target / non-target tissues</li> <li>• Sensitive and quantitative detection of product sequence with PCR assay</li> <li>• Transmission to germ cells</li> </ul>
<b>Safety study</b>	N/A	<p><b>General toxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Required</li> </ul> <p><b>Genotoxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration into chromosomes</li> </ul> <p><b>Carcinogenicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No standard carcinogenicity study required</li> <li>• <u>Evaluation according to ICH S6 carcinogenicity section</u></li> </ul> <p><b>Immune toxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune response to vectors and expression products</li> <li>• Reproductive toxicity</li> <li>• Required depend on the character of GT and target patients group</li> </ul> <p><b>Others:</b> <u>local resistance, drug-drug interaction test</u></p>	<p><b>General toxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Required</li> </ul> <p><b>Genotoxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration into chromosomes</li> </ul> <p><b>Carcinogenicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No standard carcinogenicity test required</li> <li>• <u>Evaluate carcinogenicity by approach based on scientific importance</u></li> <li>• tumorigenesis study for transgenic cell product</li> </ul> <p><b>Immune toxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune response to vectors and expression products</li> </ul> <p><b>Reproductive toxicity</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Required depend on the character of GT and target patients group</li> </ul> <p><b>Others:</b> <u>Replication competent viruses</u></p>

## 臨床開発に関する記述

臨床試験に関する記載については、“General principal”、“Informed consent”、“Pharmacological”、“ADME”、“safety”、“others”に分類して記載を調べた(図 2-6)。米国に関しては、2 つガイドラインの内、US-LTFU-Guideline(2020)が臨床試験についてのガイドを提供した。同ガイドラインは、4,838 ワードを“Safety”に関する記載に振り分けた。また、“Informed consent”に関する記述に 668 ワードを振り分けた。EU-Guideline(2018)は、“Pharmacological”、“ADME”、“Safety”のそれぞれの項目に対して相応の単語数を振り分けて臨床試験の推進を助けるガイドを与えた。日本のガイドライン(JP-Guideline(2019))の臨床安全性に対する記述は 223 ワードと少なかった(図 2-6)。

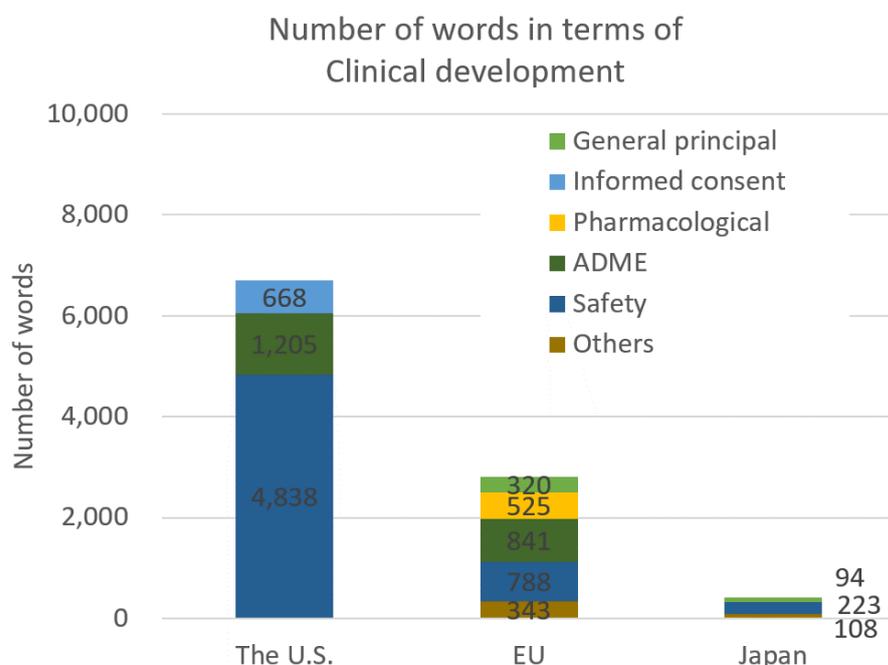


図 2-6 臨床開発に関する記載量の詳細 (著者作成)

分析対象のガイドラインをパラグラフ毎に一般原理、インフォームドコンセント、薬理、ADME、安全性、その他のサブカテゴリーに分類、単語数をカウントした。単語数は Microsoft Word 2010 でカウントした。日本語ガイドラインは、文字数を係数 2.7 で英語の単語数に換算した。

日本、米国、欧州のガイドラインの臨床試験に関する記載項目についての比較を表 2-5 で行った。米国のガイドラインにおいては、臨床試験段階に進んだ製品の安全性の留意点として、感染症、免疫毒性に加えて、発がん性のリスクについて記載されていた。同ガイ

ドラインでは、インフォームドコンセントで、被験者に発がん性のイベントが発生した場合は、生検ないし死亡時の剖検でのサンプルを、製品と発がんイベントとの因果関係の調査のために供与することを求めた。欧州のガイドラインは、感染症、免疫毒性、過剰発現、発がん性、意図しない組織への製品の移行を安全性で留意すべきこととして挙げた。また、臨床試験での発がん性のリスクを想定し、因果関係を調べる準備をすることを求めた。日本のガイドラインでは、安全性で留意すべき項目として、遺伝子治療製品由来の感染の確立、免疫毒性の2点があげられた。日本のガイドラインは、遺伝子治療製品による臨床試験での発がん性のリスク管理に関する助言を与えなかった。図 2-6 で示した通り、日本のガイドラインの臨床試験に関する記載量は限られており、記載内容も限定的であった。

FDAとEMAのガイドラインは現実に即して、遺伝子編集治療製品を含む遺伝子治療製品に、臨床試験段階においても発がん性のリスクが残存せざる得ない場合を想定していた。残存リスクのヒト臨床試験での管理方法とリスク確認の方法について、明示的なガイドラインを与えた。日本においては、遺伝子編集治療を想定したガイドラインは存在しない。近隣のガイドラインである遺伝子治療のガイドラインにおいても、臨床試験でのリスク評価が必要な発がん性リスクが製品に残留することを前提としたガイドを示していない。

表 2-5 遺伝子編集治療の 3 局のガイドラインの臨床開発に関する記載のサマリー (著者作成)

	The U.S.	EU	Japan
<b>Pharmacological</b>	N/A	<ul style="list-style-type: none"> <li>To demonstrate efficacy in the target population to support the proposed posology and duration of the effect.</li> <li>Long-term observation of safety and efficacy</li> </ul>	N/A
<b>ADME</b>	<p><b>Biodistribution of GT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Check the persistence of vector sequences at least once a year until undetectable.</li> <li>Excessive invasive biopsy not required and surrogate endpoint recommended.</li> </ul>	<p><b>Biodistribution of GT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Shedding study to address excretion of GT to provide environmental risk</li> <li>Persistence, clearance, and mobilization</li> <li>Correlation between the levels and duration of expression and efficacy and safety</li> <li>Excessive invasive biopsy not required. surrogate endpoint recommended.</li> </ul>	<p><b>Biodistribution of GT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>To clarify the investigational plan for the biodistribution of the product</li> </ul>
<b>Safety</b>	<p><b>Informed consent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>For autopsy and sample analysis to determine the <u>causal relationship of related adverse events such as tumorigenesis</u></li> </ul> <p><b>Monitoring:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Independent protocol for Long-term follow-up (LTFU) for detecting late adverse events</li> <li>Protocol and Terms based on the risk assessment and work of potential delayed risk</li> </ul> <p><b>Safety consideration</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Infection</b></li> <li>- latent/persistent infection of infectious viruses</li> <li><b>Immunotoxicity</b></li> <li>- Due to GT and expression products</li> <li><b>Carcinogenicity</b></li> <li>- Within expectation, recommend preparing investigational procedure</li> </ul>	<p><b>Informed consent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>For retention samples storage</li> </ul> <p><b>Monitoring</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>long-term monitoring to detect delayed events (i.e. tumor genesis)</li> </ul> <p><b>Safety consideration</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>infection</b></li> <li>- <u>Replication of competent viruses</u></li> <li><b>Immunotoxicity</b></li> <li>- Due to GT and expression products</li> <li><b>Over expression</b></li> <li><b>Carcinogenicity</b></li> <li>- Within expectation, recommend preparing investigational procedure</li> <li><b>Unintended transition of tissue</b></li> </ul>	<p><b>Informed consent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Required</li> </ul> <p><b>Monitoring</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>appropriate follow-up period based on the type of vector, the characteristics of the disease</li> </ul> <p><b>Safety consideration</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>infection</b></li> <li>- <u>Replication of competent viruses</u></li> <li><b>Immunotoxicity</b></li> <li>- Due to GT and expression products</li> <li><b>Carcinogenicity</b></li> <li>- <u>N/A</u></li> </ul>

## 2.4 考察

本章では、ガイドラインの定量的な比較分析に用いるための、英語と日本語の記述量の換算係数を求めた。ICH の品質や有効性、安全性の幅広い分野に渡る全 76 件のガイドラインの分析を行った。その結果、そのガイドラインの対象分野や文章量の大小にかかわらず、英語版の単語数と日本語版の文字数の比は一定であった(図 2-2)。分析の対象となった 76 件の文書を、品質(CMC 開発)、非臨床試験、臨床試験のサブグループに分けて、平均と標準偏差を求めたところ、グループ間に有意な差異はなかった(表 2-2)。これらの結果は、医療のレギュラトリーの英語と日本語のガイドラインの分量を議論する際に、その記述の長短、文書の技術分野(品質、非臨床、臨床)に関係なく、換算係数 2.7 を用いることが妥当であることを示した。

JP-Guideline(2019)は、米国および欧州の遺伝子治療のガイドラインとは異なり、その定義及び本文に“遺伝子編集”ないし“ゲノム編集”に関する語句は使用されていない。JP-Guideline(2019)が、遺伝子編集治療を対象としているのかを確かめるために、同ガイドラインにおける遺伝子治療の定義を検討した。

JP-Guideline(2019)は遺伝子治療製品を、“「遺伝子治療用製品等」とは、再生医療等製品のうち遺伝子治療用製品及び遺伝子導入細胞からなるヒト細胞加工製品をいう。”と定義している。さらに、本ガイドラインの上位法である、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(薬機法)<sup>44)</sup>には、遺伝子治療用製品は別表第二において、“一. プラスミドベクター製品、二. ウイルスベクター製品、三. 遺伝子発現治療製品(前二号に掲げる物をのぞく)”とある。この定義に従うと、遺伝子編集治療の本質的機能である DNA の選択的切断(第 1 章 1.1.2 節)は、本ガイドラインの遺伝子治療の定義には含まれない。このため、遺伝子編集治療製品は、本ガイドラインの対象にならない。

遺伝子編集酵素の細胞導入の方法は、第 1 章 1.1.3 節で整理したように、プラスミドベクターやウイルスベクターとして、DNA に載せた遺伝子として細胞に導入する方法と、DNA を用いずに遺伝子編集酵素をコードした mRNA や遺伝子酵素そのものとして細胞に導入する方法がある。実際の治療において遺伝子編集酵素を、プラスミドベクターやウイルスベクター、ないし他の形式の DNA ベクターでターゲット細胞や組織に導入した場合は、薬機法の別表第二の一.、二.、ないし三.、に該当するため、これは遺伝子治療と定義される。このため、この場合は JP-Guideline(2019)の対象にあたる。一方、遺伝子編集酵

素を mRNA もしくは遺伝子編集酵素そのもの (CRISPR-Cas9 の場合は、RNP) の形でターゲット細胞や組織にトランスフェクションする場合は、別表第二の、一.、二.、三. の定義に当てはまらない。したがって、このタイプの遺伝子編集治療は JP-Guideline(2019) の対象に当てはまらない。しかし、後者の場合でも、遺伝子編集の目的が正常遺伝子の挿入である場合は、遺伝子治療に該当する。つまり、日本においては、遺伝子編集酵素の細胞導入のモダリティの選択、および遺伝子編集の目的によって、遺伝子治療の定義に該当するかどうかが決まる(図 2-7)。一部の遺伝子編集治療製品は、遺伝子編集酵素が DNA で細胞に導入される(第 4 章表 4-2~表 4-3)。したがって、それらの遺伝子編集治療製品の開発が日本で行われる場合は、JP-Guideline(2019) がその推進をガイドすることになる。

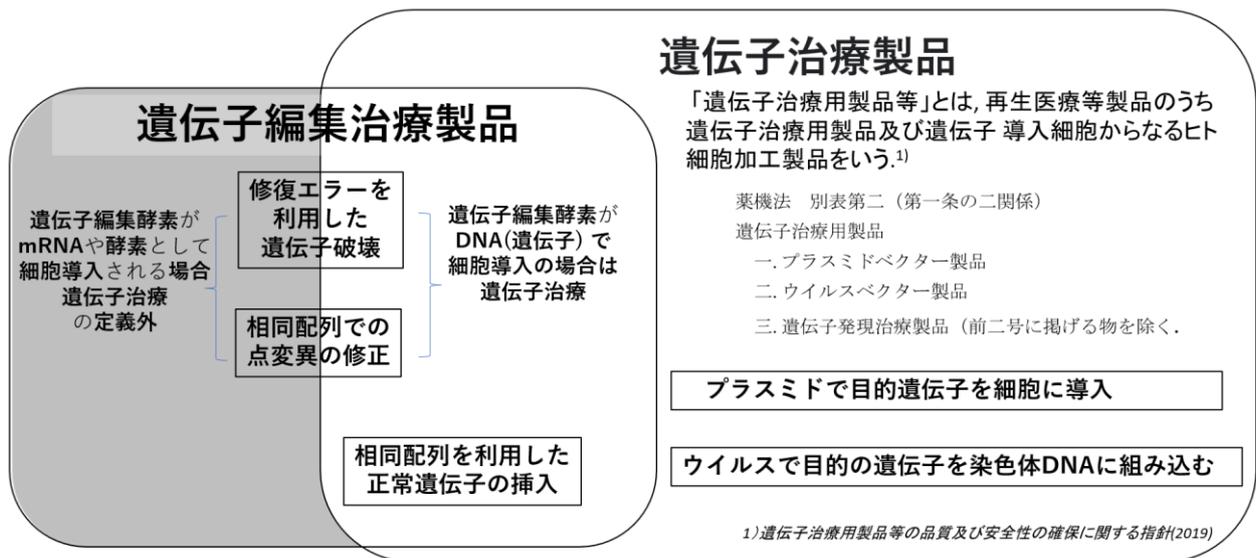


図 2-7 日本の規制における「遺伝子治療製品」と「遺伝子編集治療製品」の定義

(著者作成)

DNA を切断や編集する遺伝子編集の操作自体は、遺伝子治療の定義に該当しない。遺伝子編集酵素の細胞導入のモダリティとして DNA(遺伝子)を利用する場合は、その導入操作が遺伝子治療に該当する。遺伝子編集酵素を mRNA やタンパク質のモダリティで導入する場合は、遺伝子編集酵素の導入操作が遺伝子治療に該当しない。後者の場合でも、遺伝子編集の目的が正常遺伝子を挿入の場合は、遺伝子治療に該当する。日本においては、遺伝子編集酵素の細胞導入のモダリティの選択、および遺伝子編集の目的によって、遺伝子治療の定義に該当するかどうかが決まる。

3 局のガイドラインの比較の結果について、遺伝子編集治療製品の品質設計及び品質評価(CMC)に関する各アイテムの記載量やガイドの内容に関しては 3 局のガイドラインに大きな差異はなかった。違いは、米国のガイドラインでは、製品における Critical Quality attribute の記載を要求、欧州のガイドラインは、βラクタム系の抗生物質や毒物をプロセスで使用することを明示的に禁止した点などがなどの各論であった。例えば、米国のガイドラインが要求した Critical Quality attribute の記載は、日米欧の 3 局が採用している ICH ガイドライン ICH-Q9 品質リスクマネジメント<sup>45)</sup>で要求される。また、βラクタム系の抗生物質は痕跡量の残留が一部の患者に致死性のアレルギー反応を起こすため注射剤へのコンタミは禁忌であり厳重に防ぐべきものというのが、注射剤の業界では知られている<sup>46)</sup>。これらの各論の記載の有無は、これらガイドライン以外で補完されうるため、3 局が CMC に関してガイドする内容に関する本質的な差異ではないと解釈できる。

遺伝子治療製品は、遺伝子編集酵素、タンパク質、DNA、ウイルスベクター、mRNA、遺伝子改変細胞というさまざまな形を取るが、工業的にはいずれも生物薬品(バイオテクノロジー応用品/生物起源由来製品)である。生物医薬品の歴史は古く、CMCに関する評価技術と規制は成熟して国際調和が図られてきた。例えば、ICHQ5A(ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価)、Q5B(組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析)、Q5C(生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) の安定性試験)、Q5D(生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析)、Q5E(生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価)などのガイドラインがICHによって制定された。また、今回の分析対象としたガイドラインは、品質(CMC)のセクションで上記ガイドラインを引用した。遺伝子編集治療製品の生物医薬品としての品質については、国際調和が図られたガイドラインでカバーできる部分が多い。このため、品質(CMC)に関するセクションは各ガイドライン間での類似性が高かったと考えられる。

非臨床試験に関する事項については、米国のガイドラインの記載は限られておりADMEに関する項目だけであったADMEに関する記載も、遺伝子治療製品の生体での分布と持続性を調べ、そのデータに基づくリスクベースのアプローチによって臨床試験での長期観察の計画を建て安全性の確認を行うことを求めるものであり、臨床試験の考え方の整理のために使われた。これは、FDAが遺伝子編集を含む遺伝子治療には非臨床試験では技術的に評価できない安全性の課題が残存することを認めて、これを臨床試験で確認すべきという考え方を反映しているものだと考えられる。

欧州と日本はいずれも非臨床試験にガイドラインでは、安全性に関する記載に最も大きな記載分量を使用した。いずれも、安全性の試験に関し一般毒性試験に加えて、染色体への組み込みを調べる遺伝毒性、がん原性試験、免疫毒性試験、生殖毒性を注意すべき項目として挙げた。欧州と日本も米国と同様に、遺伝子治療製品に染色体毒性や発がん性があることをガイドラインで指摘しているが、いずれの当局も発がん性リスクの非臨床試験方法について具体的なガイドを提示することはできていないという共通点があった。遺伝子治療製品のヒトの発がん性の予測に関して、動物を用いた発がん性の非臨床試験から得られる情報には限界があり、遺伝子治療に関して非臨床安全性の国際調和にいたったガイ

ドラインはない<sup>47)</sup>。今回、分析対象とした3局のガイドラインの非臨床の記述は、この状況が反映されたものであると考えられる。この点が、物理化学的な評価技術が成熟して関連する国際調和のとれたガイドライン(ICHQ5シリーズ)が成立した品質(CMC)とは異なる。

米国・欧州と日本のガイドラインには、ヒト臨床試験での発がん性の評価に関する部分に大きな考え方の違いがあった。米国と欧州は、ヒト臨床試験で遺伝子編集治療製品の発がん性のリスク評価を行うことを認めてその考え方と方法をガイドした。日本のガイドラインはそれらに触れられていなかった(表 2-6)。

表 2-6 各局のガイドラインが提供した臨床試験での発がん性リスク評価のガイド

(著者作成)

日本	米国	EU
記載なし	<ul style="list-style-type: none"> <li>・発がん性の可能性を明記したインフォームドコンセントの取得</li> <li>・最長15年間の長期観察による発がんイベントの検出</li> <li>・腫瘍形成と遺伝子編集製品の因果関係を判断するための手順の構築（生検または剖検サンプルの取得を含む）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・長期観察による発がんイベントの検出</li> <li>・腫瘍形成と遺伝子編集製品の因果関係を判断するための手順の構築</li> </ul>

欧米のガイドラインは、動物試験では評価が困難であってもヒトで試験を行えば、ヒトでのリスクを評価することが可能であることを前提として、治療法の開発によってベネフィットが期待できる患者(被験者)に副作用のリスクを負わせた。リスクを被験者に負わせる前提として、①被験者への十分なインフォームドコンセント、②既存の治療法に比較してリスク・ベネフィットが上回ることを期待されること、③長期的観察(LTFU)による確実な有害事象の検出、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないこと、をガイドラインの文中に記載している。これによって、(1)被験者が自己の意思と責任で試験に参加することができる。(2)既存の治療法で治療メリットのある被験者を企業がより危険性の高い試験に誘導することを防ぐ。(3)遅延性の有害事象の見逃しによる副作用ケアの機会損失を防ぐ。(4)限られた数の被験者から有害事象の情報を最大限に入手することで、有害事象が生じた場合のリスクの拡大(試験の拡大や販売)を防ぐ。(5)遺伝子解析のために規制当局の担当者や企業が被験者にとって侵襲性の高い生検を行うことを防ぐ。ということが期待できる。この枠組みは、自国における治療法のない遺伝病等に苦しむ被験者に治験参加の機会を与えるとともに、有害事象の発生時には被験者個人の保護（有害事象の確実な

発見と治療)を行い、さらにその情報を横展開することで、可能な限り少ない被害者数にするという被験者の集団を保護する枠組みになっていると考えられる。

欧米では規制当局(国家)が、このようなリスク管理の考え方と方法の枠組みを提示しているため、企業はこれに従って発がん性のリスクを否定できない遺伝子編集治療製品の臨床試験を計画することができる。

日本のガイドラインは、その臨床安全性に関する記載は、223 英文ワード相当と分量が少なく、上記のようなリスク管理の考え方を与えなかった。日本で治験を進めることを目指す企業は、欧米の規制当局が提示したような被験者保護の考え方を1企業として提案して、発がん性が否定できない製品のリスクをヒト臨床試験で確認することについてPMDAの理解を得るか、もしくは、科学の進歩によって発がん性を高い確度で予測できる非臨床発がん性評価試験が完成するのを待つ必要がある。ここには高いハードルが存在すると考えられる。

明確なガイドラインや判断基準が規制当局から提示されていることは、開発企業にとって開発中のプロダクトの当局からの開発許可や中止命令についての予見性を高めて不可測性の減少につながる。現在では医薬品開発のグローバル化が進んだため、企業は自社製品の初期開発を実施する国や地域を地理的な制約なく決定できるようになった。このため、企業は開発の遅延や開発費用の高騰につながる可能性のある臨床試験のレギュラトリーの不透明性の高い国や地域での臨床開発を避け、リスクが低く抑えられる国や地域での開発を優先する。このため、臨床試験でのリスク管理の考え方が日本国内では整理されていないことは、企業が日本での遺伝子編集治療の開発を控える原因になりうると考えられる。

## 2.5 本章の結論

遺伝子編集治療に関する日本、米国、欧州のガイドランを比較した。品質に関する要求と助言は日本、米国、欧州のガイドラインで類似した。臨床試験のガイダンスについて、発がん性のリスクに関する考え方に違いがあった。すなわち、米国と欧州のガイドラインは、臨床試験に進む遺伝子治療製品に非臨床試験では完全には検証できない発がん性のリスクが残存することを認めていた。さらに、米国と欧州のガイドラインは、発がん性の残存リスクについて臨床試験で検証することをガイドラインで示した。リスクを被験者に負わせる前提として、①被験者への十分なインフォームドコンセント、②既存の治療法に比較してリスク・ベネフィットが上回ることを期待されること、③長期的観察(LTFU)による確実な有害事象の検出、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないこと、を規定した。一方、日本のガイドラインは、臨床試験での発がん性のリスク管理に関する記載やガイドを提供しなかった。

この臨床安全性評価のガイドの有無は、OTEによる発がん性のリスクを内在する遺伝子編集製品の臨床開発をどの国と地域で進めるかの決める開発企業の判断に影響を与える可能性がある。

## 第3章 遺伝子編集治療製品の非臨床試験における安全性の評価

### 3.1 目的

遺伝子編集によって生きた細胞の染色体 DNA に生じた OTE のゲノム上の位置や頻度を評価する技術は、いずれも PCR 法による DNA 配列の増幅と次世代ゲノムシーケンス (NGS)技術によって得られた DNA 配列情報を用いている。PCR の際に発生する DNA 複製エラーと NGS の検出限界(S/N 比)の制限から、発生頻度 0.1%以下の OTE の染色体 DNA 上の位置と頻度を知ることはできない(第1章 1.1.4 節)。

遺伝子編集製品の実際の臨床応用では、膨大な数の細胞が遺伝子編集を受けるため理論的には低頻度の OTE が数多く存在する可能性があるが、非臨床試験でそのプロファイルを描いてリスクの検討と評価を行うことができない。わずかな数の細胞のゲノムの変異が個体に大きな影響を与える発がんの事象の可能性を考えると、この検出感度は不十分である。これが遺伝子編集治療の臨床試験開始にあたってのハードルになる。

OTE に関してどのような非臨床評価を行うべきかを具体的に示す指示やリスク評価のクライテリアは、PMDA、FDA、EMA、ICH(International Council for the Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use)のいずれからも、提示されていない。

さらに、アカデミアの研究においても、非臨床試験から臨床試験へのトランスレーショナルフェーズにおいて、検出可能および検出不可能な OTE の評価方法およびリスク評価について、科学的なコンセンサスを与える研究発表はこれまでにない。

本研究では、米国における Investigational New Drug Application (IND)や欧州における Clinical Trial Application(CTA)のクリアランスを取得して臨床試験に進んだすべての遺伝子編集治療製品の公開情報を調査することで、トランスレーショナルフェーズにおける OTE のリスク評価のプロセスを明らかにすることを目的とした。

### 3.2 方法

‘CRISPR’、‘TALEN’、‘ZFN’をキーワードとして、米国の Clinical trial gov<sup>48)</sup>、欧州の Clinical trial registry<sup>49)</sup>及び日本の臨床研究情報ポータルサイト<sup>50)</sup>にて、ヒットした製品及び技術開発主体(企業もしくはアカデミア)をリストアップした。検索されたスポンサー企業の Website のパイプラインのリストには、上記の検索ではヒットしなかった製品が一部存在したため、これらをリストに加えた。リストからは、被験者のリクルート前に試

験から撤退した製品及び登録をしているがまだリクルートが開始されていないものは除外した(2022/7/17 時点)。その結果、臨床試験に入った合計 31 の遺伝子編集治療製品が見つかった(表 3-1)。

表 3-1 日米欧のいずれかで臨床試験に入った遺伝子編集治療製品の数 (著者作成)

	TALEN	CRISPR-Cas	ZFN	小計
米国	6	13	9	28
欧州	1	9	0	10
日本	1	0	0	1
合計(重複を除く)	6	16	9	31

次に、リストアップした“遺伝子編集治療製品名”、および“遺伝子編集製品の技術開発主体(企業及びアカデミア)”をキーワードとして、Google Scholar、PubMed にて、OTE に関する非臨床試験の文献を検索した。加えて、リストアップされた技術開発企業の Web サイトに掲載された文献(2010 年以降)、学会発表のプレゼン(2018 年以降)、ポスター(2018 年以降)、企業の技術紹介(2018 年以降)のプレゼンを取集した。これらの調査は 2021 年 6 月から 2022 年 7 月にかけて段階的に実施した。本章は 2022/7/17 に最終的に確認した情報に基づいて作成した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 日米欧のいずれかで臨床試験に進んだ遺伝子編集治療製品

TALEN の技術を用いた遺伝子編集製品を表 3-2 に示した。UCART-19<sup>34)</sup>、ALLO-501A<sup>51)</sup>、ALLO-715<sup>52)</sup>、UCART-123<sup>53)</sup>、UCART-CS1<sup>54)</sup>、UCART-22<sup>55)</sup> の 6 つの製品が臨床試験に入った。いずれも、遺伝子編集技術を利用した他家 CAR-T 製品である。これらは TALEN の技術を利用して CAR-T 細胞のゲノム上の TCR 遺伝子をノックダウンすることで、他家化移植可能な CAR-T の製造を目指した。これら臨床試験に入った遺伝子編集製品の TALEN の技術の供給元は Cellectis Inc.であった<sup>56)</sup>。

表 3-2 臨床試験に進んだ TALEN を利用した遺伝子編集治療製品 (著者作成)

Product Name	Product Content	dosage form	target disease	Sponsor	developer	country of implementation
UCART19	CD19 Target allogenic CAR-T	ex vivo	Relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia	Allogene Therapeutics Servier Laboratories	Collectis S.A.	U.S., France, U.K., Spain, Japan
ALLO-501	CD19 Target allogenic CAR-T	ex vivo	Relapsed/Refractory non-Hodgkin lymphoma	Allogene Therapeutics Servier Laboratories	Collectis S.A.	U.S.
ALLO-715	BCMA Target allogenic CAR-T	ex vivo	Relapsed/refractory refractory multiple myeloma	Allogene Therapeutics	Collectis S.A.	U.S.
UCART123	CD123 Target allogenic CAR-T	ex vivo	Acute myeloid leukemia	Collectis S.A.	Collectis S.A.	U.S.
UCARTCS1	CS1 Target allogenic CART	ex vivo	refractory multiple myeloma	Collectis S.A.	Collectis S.A.	U.S.
UCART22	CD22 target allogenic CAR-T	ex vivo	B-cell acute lymphoblastic leukemia	Collectis S.A.	Collectis S.A.	U.S.

CRISPR-Cas の技術を利用した臨床開発段階にある製品を表 3-3 に掲載した。ex vivo で HSPC のゲノム上の BCL11A のエンハンサー領域を破壊することで、 $\beta$ サラセミアと鎌形赤血球症の治療を狙った製品として CTX001<sup>17)</sup>、EDIT-301<sup>57)</sup>、OTQ923<sup>58)</sup>が臨床試験に進められた。同治療領域では、 $\beta$ グロビンの遺伝子を修正する GPH101<sup>59)</sup>も臨床試験に入った。CRISPR-Cas による遺伝子ノックダウン技術を応用して他家 CAR-T の供給を目指して臨床試験に入った製品は CTX-110<sup>60)</sup>、CTX-120<sup>61)</sup>、CTX-130<sup>62)</sup>、NTLA-5001<sup>63)</sup>、CB-010<sup>64)</sup>である。このほかに、HSPC の CD33 のノックダウンを狙う VOR33<sup>65)</sup>が臨床に入った。また、CISH (Cytokine-induced SH2 protein) をノックダウンした T 細胞である Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL) について、がん領域での臨床試験が開始された。in vivo の遺伝子編集技術開発の領域では、レバー先天性黒内症 10 型の治療を狙った EDIT-101<sup>66)</sup>、肝細胞のトランスサイレチン(TTR)遺伝子をノックダウンして家族性アミロイドーシスの治療を試みる NTLA-2001<sup>4)</sup>、KLKB1 の遺伝子をノックダウンして遺伝性血管性浮腫の治療を狙う NTLA-2002<sup>67)</sup>が臨床試験に入った。その他に、HIV 特異的な DNA 配列を認識して切断し、HIV 感染症の治療を狙う EBIT-101 が感染性領域で臨床試験に入った<sup>68)</sup>。

上記、16 個の製品の技術開発は、CRISPR Therapeutics, Inc. Editas medicine Inc.、Intellia Therapeutics Inc.、Intima Bioscience, Inc.、Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust、Caribou Biosciences, Inc.、Graphite Bio, Inc.、Excision BioTherapeutics、Vor Biopharma の 9 社によって進められた。

表 3-3 臨床試験に進んだ CRISPR-Cas を利用した遺伝子編集治療製品 (著者作成)

Product Name	Product Content	dosage form	target disease	Sponsor	developer	country of implementation
CTX001	HSPC disrupted the enhancer region of BCL11A	ex vivo	beta thalassemia, sickle cell disease	Vertex Pharmaceuticals, Inc. /CRISPR Therapeutics, Inc	CRISPR Therapeutics, Inc.	U.S., Canada, Germany, Italy, U.K.
CTX110	CD19-targeted allogenic CAR-T, KD for TCR and MHC1	ex vivo	B-cell malignancy	CRISPR Therapeutics, Inc.	CRISPR Therapeutics, Inc.	U.S., Australia, Canada, Germany, Spain
CTX120	BCMA target allogenic CAR-T, KD for TCR and MHC1	ex vivo	multiple myeloma	CRISPR Therapeutics, Inc.	CRISPR Therapeutics, Inc.	U.S., Australia, Canada, Spain
CTX130	CD70-targeted allogenic CAR-T, KD for TCR and MHC1	ex vivo	solid tumors and hematologic malignancies	CRISPR Therapeutics, Inc.	CRISPR Therapeutics, Inc.	U.S., Australia, Canada, Netherlands
EDIT-101	Remove the mutated portion of the CEP290 gene in retinal cells	in vivo topical ocular administration	Leber's congenital melanoma type 10	Editas Medicine, Inc.	Editas Medicine, Inc.	U.S.
EDIT-301	HSPC edited gamma globin gene promoter	ex vivo	beta thalassemia, sickle cell disease	Editas Medicine, Inc.	Editas Medicine, Inc.	U.S., Canada
OTQ923	HSPC which disrupted the enhancer at the region of BCL11A	ex vivo	sickle cell disease	Novartis Pharmaceuticals	Intellia Therapeutics, Inc.	U.S., Italy
NTLA-5001	Autologous TCR-T targeting Tumor1 (WT1)	ex vivo	acute myeloid leukemia	Intellia Therapeutics, Inc.	Intellia Therapeutics, Inc.	U.S., U.K.
NTLA-2001	KD of the transthyretin gene in hepatocytes	in vivo systemic administration	hereditary ATTR amyloidosis	Intellia Therapeutics, Inc.	Intellia Therapeutics, Inc.	New Zealand, U.K., Sweden
NTLA-2002	KD of KLKB1 gene in hepatocytes	in vivo systemic administration	hereditary angioedema	Intellia Therapeutics, Inc.	Intellia Therapeutics, Inc.	New Zealand, U.K., Netherland
Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL)	CISH (Cytokine-induced SH2 protein) knock down T-cell	ex vivo	Gastrointestinal cancer	Intima Bioscience, Inc.	Intima Bioscience, Inc.	U.S.
PBLT52CAR19	CD19 targeted allogenic CAR-T, KD for TCR	ex vivo	B-cell Acute Lymphoblastic Leukaemia	Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust	Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust	U.K.
CB-010	CD19 targeted allogenic CAR-T, KD for TRAC and PD-1 gene	ex vivo	B Cell Lymphoma	Caribou Biosciences, Inc.	Caribou Biosciences, Inc.	U.S.
GPH101	HSPC with correction of B globulin gene	ex vivo	Sickle cell disease	Graphite Bio, Inc.	Graphite Bio, Inc.	U.S.
EBT-101	HIV specific CRIDPR-Cas9	in vivo	HIV infection	Excision BioTherapeutics	Excision BioTherapeutics	U.S.
VOR33	CD33 knock down HSPC	ex vivo	acute myeloid leukemia	VOR Biopharma Inc.	VOR Biopharma Inc.	U.S., Canada

ZFN のキーワードで検索された製品を表 3-4 にまとめた。SB-728-T<sup>33)</sup>と SB-728mR-T<sup>25), 69)</sup>は、患者由来の T 細胞を *ex vivo* で遺伝子編集して HIV が T 細胞への侵入に必要とする受容体 CCR5 の一部を除去し、T 細胞に HIV 感染防止能を持たせることを意図した。SB-728mR-HSPC<sup>70)</sup>は遺伝子編集の対象を患者由来 T 細胞から患者由来 HSPC に変更したものであった。ST-400<sup>35)</sup>、BIVV003<sup>35)</sup>は、HSPC の遺伝子を編集して、βサラセミアと鎌形赤血球病の治療を試みる製品である。いずれもアルキル化剤のブスルファンで前処置を行い、患者の異常造血幹細胞を除去した後に遺伝子編集処理済みの細胞を投与することで、患者体内の異常造血幹細胞と遺伝子編集細胞を入れ替える。また、*in vivo* の臨床試験として、肝実質細胞中のアルブミンの遺伝子座を ZFN で切断、正常遺伝子を挿入して遺伝病の治療を目指す SB-318<sup>71)</sup>、SB-913<sup>72)</sup>、SB-FIX<sup>73)</sup>が進められた。アルブミンは肝臓から過剰に発現しているため、一部の遺伝子が遺伝子編集によって損なわれても健康上の問題は小さいとして遺伝子編集のターゲットとして選定された<sup>74)</sup>。これらに用いられた ZFN の技術は Sangamo Therapeutics, Inc.によって供給された。

表 3-4 臨床試験に進んだ ZFN を利用した遺伝子編集治療製品 (著者作成)

Product Name	Product Content	dosage form	target disease	Sponsor	developer	country of implementation
SB-728-T	Mutagenesis of CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 in CD4-positive T cells	ex vivo	HIV infection	UPEN Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
SB-728mR-T	SB-728-T gene transfer method changed from AAV to electroporation of mRNA	ex vivo	HIV infection	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
CD4 CAR+CCR5 SB-728mR T-cells	Mutagenesis of CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 in T cells + CD4-targeted CAR	ex vivo	HIV infection	UPEN	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
SB-728mR-HSPC	CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 mutation-transformed HSPCs	ex vivo	HIV infection	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
ST-400	HSPCs in which the enhancer region of BCL11A was disrupted	ex vivo	beta thalassemia	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
BIVV003	HSPCs in which the enhancer region of BCL11A was disrupted	ex vivo	sickle cell disease	Sanofi S.A.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
SB-318	IDUA gene insertion into the albumin locus of hepatocytes	in vivo systemic administration	MPSI	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
SB-913	IDS gene insertion into the albumin locus of hepatocytes	in vivo systemic administration	MPSII	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.
SB-FIX	Factor IX gene insertion into the albumin locus of hepatocytes	in vivo systemic administration	Hemophilia B	Sangamo Therapeutics, Inc.	Sangamo Therapeutics, Inc.	U.S.

CRISPR-Cas、TALEN、ZFN を用いた製品の臨床試験の数を図 3-1(a)に示した。調査時点での TALEN の適応範囲はがん領域に限られた。ZFN と CRISPR-Cas の技術は、ex vivo での血液系細胞の遺伝子編集治療に加えて、全身投与で肝臓をターゲットとした遺伝病の治療の治験に提供された。図 3-1(b)に、それぞれの製品の臨床開発の most advanced phase をモダリティ毎に示した。多くが Phase1 ないし Phase1/2 にとどまり、Phase3 に進んだ製品は調査時点では CTX001 に限られた。上市された製品はなかった。

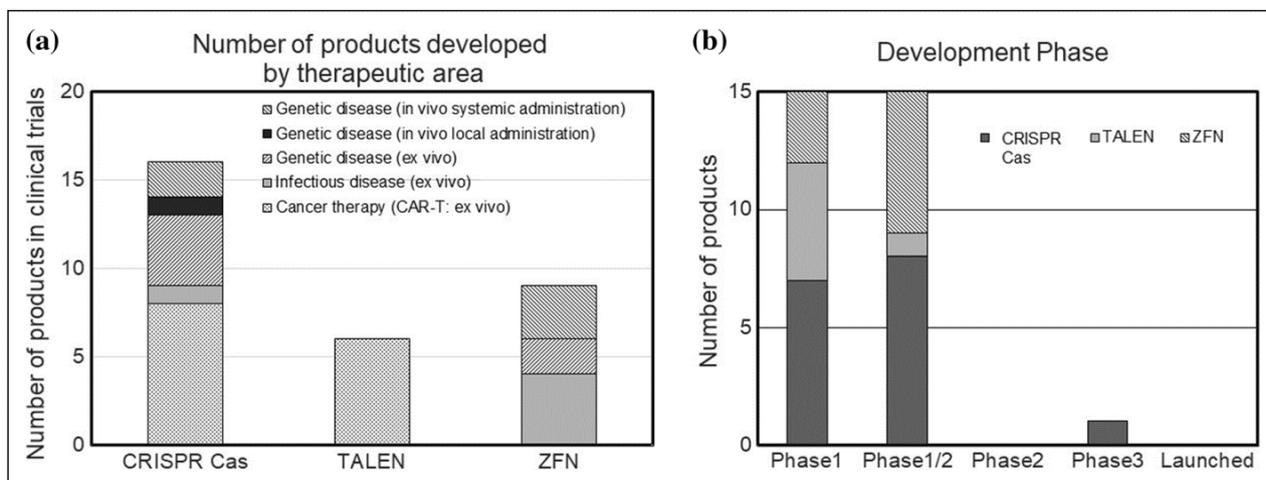


図 3-1 日米欧のいずれかで臨床試験に入った遺伝子編集製品の数とそのフェーズ

(著者作成)

米国、欧州の遺伝子組換え製品の開発状況を Clinical trial.com、Clinical trial registry、臨床研究情報ポータルサイトで“CRISPR-CAS”、“TALEN”、“ZFN”をキーワードに検索した。臨床試験は、がん、感染症、遺伝病で開始されている。ほとんどがフェーズ 1 またはフェーズ 2 であり、フェーズ 3 まで進んだ遺伝子編集製品は 1 つだけである。商業化されたものはない。

### 3.3.2 日米欧で臨床試験に進んだ遺伝子編集治療製品の非臨床試験及び臨床試験に関する公開情報

表 3-2 から表 3-4 に整理した臨床試験において実際に患者リクルートが開始された遺伝子編集治療製品の製品名(UCART-19、ALLO-501A、ALLO-715、UCART123、UCART-CS1、UCART22、CTX001、CTX-110、CTX-120、CTX-130、EDIT-101、EDIT-301、OTQ923、NTLA-5001、NTLA-2001、NTLA-2002、PBLTT52CAR1、CB-010、GPH101、EBIT-101、VOR33、SB-728-T、

SB728mR-T、SB-728mR-HSPC、ST-400、BIVV003、SB-318、SB-913 及び SB-FIX)、及び技術開発主体 (Collectis Inc.、CRISPR Therapeutics, Inc.、Editas medicine Inc.、Intellia Therapeutics Inc.、Sangamo Therapeutics, Inc.、Intima Bioscience, Inc.、Caribou Biosciences, Inc.、Graphite Bio, Inc.、Excision BioTherapeutics、Vor Biopharma)を検索キーワードに OTE に関する非臨床試験の情報を検索した。検索ワードにアカデミアである University of Pennsylvania と Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust を用いると検索結果に非常に多くのノイズが含まれたため検索キーワードからこれらを除いた。この結果、OTE の非臨床評価に関する報告が SB-728-T/SB-728mR-T<sup>25)</sup>、SB-728mR-HSPC<sup>70)</sup>、UCART-19<sup>34)</sup>、CTX-001<sup>17)</sup>、EDIT-101<sup>66)</sup>、EDIT-301<sup>57)</sup>、NTLA-2001<sup>4)</sup>、GPH101<sup>59)</sup>について見つかった。表 3-5 にこれをまとめた。

表 3-5 臨床試験に進んだ遺伝子編集製品に関して公開された OTE に関する非臨床試験の情報 (著者作成)

Product	Target tissue And Route of Administration	Gene editing enzyme	Modality/DDS	Discovery Phase			Verification Phase	Summary
				In vitro(non cell)	In vitro(cell)	Computer Prediction		
<b>SB-728-T /SB-728mR-T</b>	T-cell ex vivo	ZFN	pDNA/AAV9 mRNA/electroporation	SELEX	N/A	N/A	Primary human CD4+ T cells Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>Selection of top 15 sequences with high affinity to ZFN by SELEX method</li> <li>Amp-seq analysis of ZFN-treated human primary cultured CD4+ T cells targeting the above sequence</li> <li>OTEs were identified in CCR2 and an intron of ABLIM2.</li> </ul>
<b>SB-728mR-HSPC</b>	HSPC ex vivo	ZFN	mRNA/electroporation	SELEX	Human HSPC, IDLV method	In silico modeling	Human HSPC Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>Listing of POLs using the IDLV method and computer prediction</li> <li>Amp-seq analysis of ZFN-treated human HSPCs targeted with the above sequences, confirmed off-target genome editing in four locations.</li> </ul>
<b>UCART19</b>	CAR-T ex vivo	TALEN	mRNA/electroporation	N/A	N/A	In silico modeling	UCART19 Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>Amp-seq analysis performed on 15 POLs predicted by computational method.</li> <li>No significant difference between before and after TALEN treatment</li> </ul>
<b>CTX-001</b>	HSPC ex vivo	CRISPR-Cas9	RNP/electroporation	N/A	Human HSPC GUIDE-Seq	In silico modeling	Human HSPC Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>Computational method found 171 and 52 OTE candidates by GUIDE-Seq.</li> <li>Amp-seq analysis of Cas9-treated human HSPC targeted the POLs, and no OTE was detected. The threshold for analysis was 0.2%.</li> </ul>
<b>EDIT-101</b>	Retina in vivo(subretinal administration)	SaCas9	pDNA/AAV5	Digenome-Seq	Three human cell lines (U2OS, ARPE19, and SH-SY5Y cells), patient-derived fibroblasts, and primary human T cells GUIDE-Seq	CAS- OFFinder	Human retinal explants, ARPE-19, U-2 OS, Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>No POL detected by Digenome-seq and GUIDE-Seq; 144 POLs predicted by CAS-OFF-Finder method</li> <li>Amp-seq analysis of Crisper-Cas12-treated in vitro human retinal tissue, ARPE-19, U-2 OS, targeting POLs. No off-target editing was detected.</li> </ul>
<b>EDIT-301</b>	HSPC ex vivo	AsCas12a	RNP/electroporation	Digenome-Seq	GUIDE-Seq	In silico modeling	Human HSPC	<ul style="list-style-type: none"> <li>No off-target editing observed in Cas12a treated HSPC</li> </ul>
<b>NTLA-2001</b>	Hepatocyte in vivo (intravenous administration)	CRISPR-Cas9	mRNA/LNP	SITE-Seq	HEK293 GUIDE-Seq	CAS- OFFinder	Primary human hepatocytes Amp-seq	<ul style="list-style-type: none"> <li>A total of 658 POLs were found by SITE-Seq, GUIDE-Seq, and CAS- OFFinder.</li> <li>Amp-seq analysis of CRISPR-CAS9 treatments of primary in vitro human hepatocytes targeting the POLs confirmed off-target editing in 7 locations.</li> </ul>
<b>GPH101</b>	HSPC ex vivo	CRISPR-Cas9	RNP/electroporation	CIRCLE-Seq	GUIDE-seq	COSMID	Human HSPC Amp-seq LMP-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>A total of 67 POLs were found by CIRCLE-Seq, GUIDE-Seq and COSMD.</li> <li>Amp-seq analysis of gene editing processing product of human HSPC</li> <li>One OTE was confirmed in the extragenic region on chromosome 9</li> <li>As a result of HTGTS by LMP-PCR, chromosomal translocation was confirmed between above mentioned OTE and on target.</li> </ul>

SB-728-T と SB-728mR-T の臨床試験は、それぞれ 2009 年(NCT00842634)と 2014 年(NCT02225665)に臨床試験が開始された。Sangamo 社はこの臨床試験で使用された ZFN に対して、SELEX 法を用いてオフターゲット作用の候補配列: Potential Off-target Loci(POL)を探索した<sup>25)</sup>。試験管中の実験で、DNA の切断機能を持たない ZFN と結合定数の高い DNA 配列のセットを探索、ヒト染色体 DNA 配列の中で治療用にデザインした ZFN に結合して切断されやすい配列(POL)のリストを作成した。次に、ヒト T 細胞を治療用の ZFN で処理、その DNA を抽出し、前段階で探索した POL について Amplicon Sequencing(Amp-Seq)を行った。この結果、治療ターゲットであるヒト T 細胞を治療用の ZFN で処理した場合、2 つのサイトで OTE が検出されることを Verification した<sup>25)</sup>。

2015 年に臨床試験(NCT02500849)が開始された SB-728mR-HSPC では、IDLV 法にて、POL を実験的に特定した。これに計算機による予測を加えて POL のリストを作成した。次に、治療用に設計した ZFN を用いて遺伝子編集処理を行った HSPC から DNA を抽出し、POL について Amp-Seq で配列解析を行った。これにより、治療用の ZFN で、ヒト HSPC のゲノム上の 4 箇所に 1.7%~20.2%の割合の細胞で OTE が生じたことを Verification した<sup>70)</sup>。

UCART19 は、成人での試験(NCT02746952)及び小児での試験(NCT02808442)が進められた遺伝子編集技術によって製造された他家 CAR-T 製品である。OTE の探索試験では、実験用のモデルではなく製品である UCART19 そのものを解析した。この際、実験的な方法は用いられず、計算機で予測した 15 か所の OTE の候補箇所を POL とした。その後、UCART19 に関して POL をターゲットとして Amp-Seq 解析を行い、TALEN での遺伝子編集処理前後で OTE のプロファイルに大きな違いがないことを報告した<sup>34)</sup>

CTX001 のプロジェクトでは、GUIDE-seq で POL を 52 箇所見出した。これに加えて計算機によって 171 箇所の POL を加えた。ヒト HSPC を治療用にデザインした sgRNA と CRISPR-Cas9 で遺伝子編集を施したのちに、DNA を抽出、POL に関して Amp-Seq を行った。検出の閾値を 0.2%として解析を行い、閾値を超える OTE は検出されなかったことを報告した<sup>17)</sup>。

EDIT-101 は、S. aureus Cas9 (SaCas9)の遺伝子と sgRNA を搭載した AAV5 を網膜下投与して、視細胞の遺伝子編集を行う製品である<sup>66)</sup>。CRISPR-Cas の技術を用い

た初めての *in vivo* の臨床試験として、2019年に治験が開始された(NCT03872479)。非臨床試験では、Cellフリーの *in vitro* の系でヒト DNA を SaCas9 と治療用に設計した sgRNA で遺伝子編集処理を行い、Digenome-Seq を用いて DNA の切断箇所を検出することで POL を集めた。さらに、U-2 OS、ARPE-19、SH-SY5Y、fibroblasts のセルラインに対して、SaCas9 と治療用にデザインされた sgRNA を用いた遺伝子編集処理を行い、GUIDE-seq を用いてオンターゲットの遺伝子編集と OTE を検出した。これらの実験的に探索した POL に、CAS-OFFinder 法<sup>75)</sup>による計算機による予測箇所を加えて、POL のリストを作成した。次に、臨床での使用条件に近い条件での評価のために、ヒト検体から採取した網膜の培養膜が *in vitro* のモデルとして使用された。SaCas9 の遺伝子と治療用にデザインされた sgRNA 配列をコードする pDNA を、AAV5 による DDS で網膜培養膜にトランスフェクションすることで遺伝子編集処理を行った。このサンプルから DNA を抽出、POL に関して Amp-Seq での配列解析を行うことで、実際のヒト臨床使用条件に近いヒト網膜組織での OTE を評価した。その結果、Amp-Seq の検出感度以上の OTE は認められなかったことを報告した<sup>66)</sup>。

NTLA-2001 は世界で最初にヒトに投与された全身投与型の CRISPR-Cas の製品として臨床試験(NCT04601051)が開始された。NTLA-2001 の OTE の解析では、無細胞系でのヒト DNA の CRISPR-Cas9 処理物を SITE-Seq を用いて解析して POL を取得した。また並行して、細胞系での GUIDE-Seq を用いて評価で POL のリストに追加した。ここに、計算機科学的な手法(CAS-OFFinder)で予測した POL を加え、合わせて 658 個の POL を特定した。その後、ヒトの初代培養の肝臓細胞に対して CRISPR-Cas9 と治療用に設計した sgRNA による遺伝子編集処理を施し、POL をターゲットとした Amp-Seq 解析を行った。結果、ヒト初代培養肝細胞に治療用に設計された CRISPR-Cas9-Guide-RNA 複合体を処理した場合に、ゲノム上の 7 か所に OTE が生じることを Verification した<sup>4)</sup>。

GPH101 は、鎌形赤血球症の原因であるβグロビンの変異を修正する遺伝子編集製品として 2021 年に臨床試験(NCT04819841)が開始された。非臨床での OTE の解析では、細胞を用いない方法として CIRCLE-Seq、細胞を用いる方法で GUIDE-Seq が利用された。これに計算機(COSMID<sup>76)</sup>)による予測結果を加えて、67 個の POL を見出した。ヒト HSPC を治療用にデザインした遺伝子編集酵素で遺伝子編集処理を行い、処理産物について POL をターゲットにした Amp-Seq 解析を行った。この結果、

臨床での治療ターゲット組織であるヒト HSPC を、治療にデザインした遺伝子編集酵素で遺伝子編集処理を行うと、9 番染色体上の遺伝子外領域に 1 つの OTE が生じることを verification した<sup>59)</sup>。

### 3.3.3 異なる製品、企業で共通して用いられた OTE 解析スキーム

図 3-2 に、ここまでに述べた異なる製品で共通して用いられた OTE 解析スキームをまとめた。

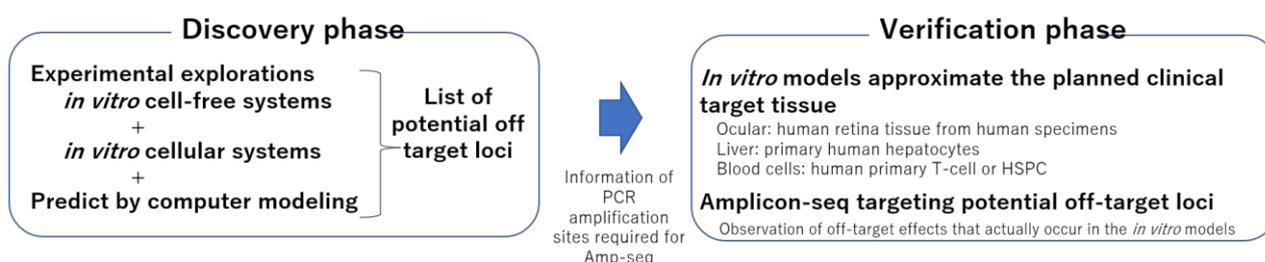


図 3-2 異なる製品で共通して用いられた OTE 解析スキーム (著者作成)

OTE の評価スキームには共通の考え方が採用されていた。OTE の評価は 2 段階で行われ、1 段階目を Discovery Phase、2 段階目を Verification Phase と呼ぶ。Discovery Phase では、OTE の POL の網羅的なリストアップを目的とした探索が行われ、無細胞の試験、細胞試験の試験、計算機での予測からそれぞれ得られた POL を合算した OTE の候補サイトのリストが作成される。Verification Phase では、臨床使用条件に近い *in vitro* のモデルが OTE の検証試験に用いられ、遺伝子編集酵素で処理、POL について Amp-Seq によって配列解析を行った。これによって、臨床試験に用いる遺伝子編集酵素で、実臨床でのターゲット組織に近いモデル組織を処理した際に生じる OTE を Verification した。Verification phase における Amp-Seq では、Discovery Phase で求めた POL について PCR による増幅と NGS による配列解析が行われた。

SB-728-T/SB-728mR-T、SB-728mR-HSPC、CTX-001、EDIT-101、EDIT-301、NTLA-2001、GPH101 は異なる遺伝子編集酵素 (TALNE、ZFN と CRISPR-Cas) を用いて、それぞれ別のターゲット疾患 (HIV 感染症、 $\beta$ サラセミア、網膜症、鎌形赤血球症、家族性アミロイドーシス)、異なるターゲット臓器 (T 細胞、HSPC、網膜、肝臓) に対して、別々の会社 (Sangamo Therapeutics, Inc.、CRISPR Therapeutics, Inc.、

Editas medicine Inc.、Intellia Therapeutics Inc.、Graphite Bio, Inc.)が取り組むプロダクトであったが、OTEの評価スキームには共通の考え方が採用されていた(図 3-2)。OTEの評価は2段階で行われ、1段階目を Discovery Phase、2段階目を Verification Phase と呼ぶことにする。Discovery Phase では、OTEのPOLの網羅的なリストアップを目的とした探索が行われる。ここでは、無細胞の試験、細胞試験の試験、計算機での予測からそれぞれ得られたPOLを合算したOTEの候補サイトのリストが作成された。Verification Phase では、臨床使用条件に近い in vitro のモデルがOTEの検証試験に用いられた。このフェーズでは、網膜下投与を行う EDIT-101 のプロジェクトではヒト検体から得られた網膜が用いられた。肝臓をターゲットとした NTLA-2001 では初代培養のヒト肝細胞が用いられた。ex vivo での血液細胞をターゲットとした SB-728-T/SB-728-mR-T、CTX001、GPH101 の非臨床試験では臨床のターゲットそのものであるヒト T 細胞とヒト HSPC がそれぞれ利用された。これらの検体を臨床試験で用いる遺伝子編集酵素で処理、POLについて Amp-Seq によって配列解析を行った。これによって、臨床試験に用いる遺伝子編集酵素で、実臨床でのターゲット組織に近いモデル組織を処理した際に生じるOTEを Verification した。Verification phase における Amp-Seq では、Discovery Phase で求めたPOLについてPCRによる増幅とNGSによる配列解析が行われた。

治療対象ががん患者である UCART19 については、POLの探索は簡便化され、実験的な探索は行われず、計算機による方法のみが実施された<sup>34)</sup>ため、図 3-2 のスキームからは外れた。

染色体の転座に関する評価の報告は、GPH101 に関して HTGTS 解析についてのみであった。GPH101 では、2つのOTE間での染色体の転座が起こったことを報告した。

### 3.3.4 OTE に関するリスクアセスメント

今回の調査では、4つの遺伝子編集治療製品の臨床試験のプロトコルが見つかった。SB-728T/SB-728mR-T に関しては、プロトコル SB-728-1101 Amendment9 Jan 30, 2014<sup>77)</sup>及び、SB-728mR-1401 Amendment 2 Oct 10, 2014<sup>78)</sup>、CTX001 に関しては、プロトコル CTX001-111 Version 5 Feb 04, 2020<sup>79)</sup>、NTLA-2001 に関しては、プロトコル ITL-2001-CL-001 Amendment 1 2 Sep, 2020<sup>80)</sup>がそれにあたる。これらのプロトコルに記載された OTE についてのリスクアセスメントを表 3-6 にまとめた。

表 3-6 臨床試験のプロトコルに記載された遺伝子編集治療製品の OTE に関するリスクアセスメント (著者作成)

Product Name	Protocol name of the clinical trial	Off-target risk considerations during clinical trials (From the description of the clinical trial study protocol)
<b>SB-728-T/SB-728mR-T</b>	SB-728-1101 Amendment9 Jan 30, 2014 SB-728mR-1401 Amendment 2 Oct 10, 2014	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OTEs were detected in an exon of the CCR2 gene and an intron of the ABLIM-2 gene.</li> <li>• No T cell transformation was observed in transformation tests on agar medium and toxicity tests in various animals.</li> <li>• There is currently no indication that SB728 treatment may cause T-cell tumors.</li> </ul>
<b>CTX001</b>	CTX001-111 Version 5 4 Feb, 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No off-target editing was detected in nonclinical studies. No chromosomal translocations or other abnormalities were detected in karyotyping.</li> <li>• Combined studies of biodistribution and toxicity/tumorigenic potential were performed; no evidence was found of an increased incidence of abnormalities in animals receiving CTX001.</li> </ul>
<b>NTLA-2001</b>	ITL-2001-CL-001 Amendment 1 2 Sep, 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eight off-target sites were found in in vitro human relevant cells treated at 27-fold the therapeutic concentration.</li> <li>• These off-target sites were located nitrogenic or in intronic regions of the genome.</li> <li>• The risk of genotoxicity is low considering together with low magnitude of off-target editing, the biodistribution and the single-dose treatment regimen.</li> </ul>

いずれのプロトコルも、OTE 評価における Verification Phase で確認された 0~数個の OTE に関してのみにリスクアセスメントが行われた。このリスクアセスメントには、パブリックドメインに存在するゲノムの情報(がん遺伝子等)と Verification された OTE の染色体上の位置と頻度の情報が用いられた。いずれのプロトコルでも、Verification された OTE の位置が、既知の発がん性のメカニズムは関連する遺伝子とは関係がないことを主張する議論が展開された。この OTE の議論に加えて、腫瘍形成能を評価する非臨床試験の結果を合わせて、開発を進める遺伝子編集製品の発がん性のリスクは低いと結論付けた。いずれのプロトコルにおいても、Verification Phase では検出されなかった、未知であるが多数の存在の可能性のある検出限界以下の頻度の OTE については、臨床試験を開始の障害とはみなされていなかった。

### 3.3.5 OTE の検出法の開発と非臨床試験への採用の歴史

遺伝子編集治療製品の非臨床試験に使用された OTE の評価法とその開発年を図 3-3 にまとめた。2009 年に臨床試験が開発された SB-728-T では、POL の特定に 1990 年に開発された SELEX 法が用いられた<sup>33)</sup>。2016 年に治験が開始された SB-728mR-HSPC では、2011 年に報告された IDLV capture 法<sup>81)</sup>が細胞を用いた in vitro 試験法に採用された<sup>70)</sup>。この後に細胞を用いない手法としては、2015 年に Digenome-seq<sup>27)</sup>、2017 年に SITE-Seq<sup>29)</sup>、CIRCLE-Seq<sup>28)</sup>、2018 年に DIG-seq<sup>82)</sup>が開発された。これらの方法の中から、2019 年に臨床試験が開始された EDIT-101 では Digenome-Seq、2020 年に開始された NTLA-2001 では SITE-Seq、2021 年に開始された GPH101 では CIRCLE-Seq が非臨床の試験法として採用された<sup>66),4),59)</sup>。細胞を用いる方法としてはこの間、ChIP-Seq<sup>26)</sup>、GUIDE-Seq<sup>30)</sup>、HTGTS<sup>83)</sup>が開発され、EDIT-101 と NTLA-2001、GPH101 では GUIDE-Seq が採用された<sup>66),4),59)</sup>。がん治療を対象とする UCART19 の非臨床試験の報告には、実験的な方法での Potential OTE loci の探索は含まれなかった<sup>34)</sup>。

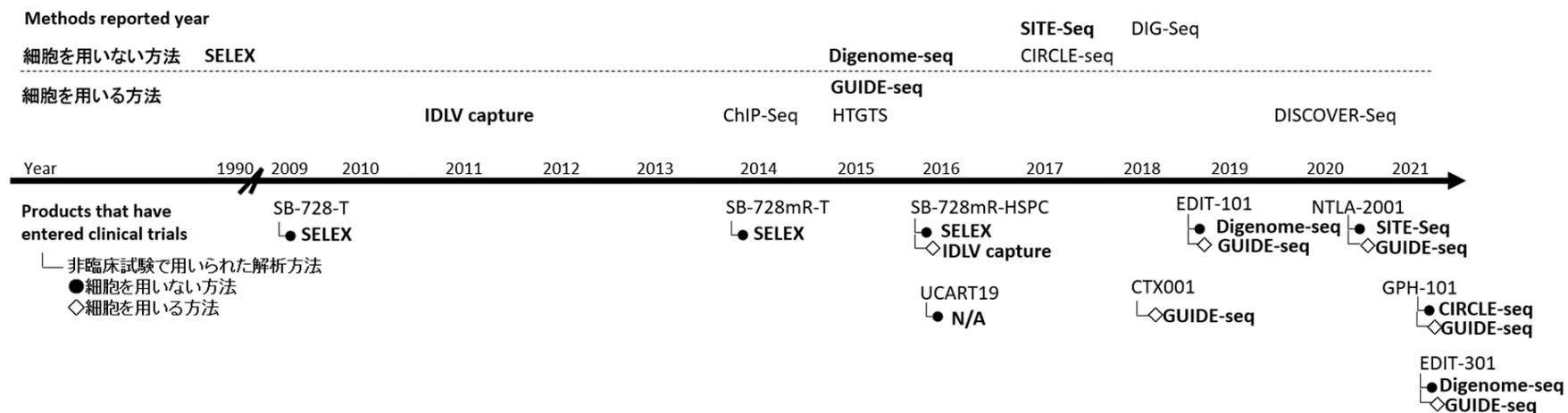


図 3-3 OTE 解析法の開発時期と臨床試験に入った製品への採用時期の時系列 (著者作成)

遺伝子編集治療製品の非臨床試験に使用された OTE の評価法とその開発年をまとめた。●は細胞を用いない方法で、◇が細胞を用いる方法である。細胞を用いない方法は、SELEX、Digenome-seq、SITE-seq、CIRCLE-seq がそれぞれ採用され一貫性がない。細胞を用いる方法は 2015 年に開発された GUIDE-seq が近年(2018 年以降)のすべての製品で採用された。

### 3.4 考察

遺伝子編集治療製品の臨床試験のフェーズは浅く、多くは Phase1 か 2 の早期の臨床試験段階にあった。Phase3 に進んだ製品は CTX-001 の 1 製品だった。販売承認を取得した遺伝子編集製品はないため、審査報告書から OTE に関する審査当局の考え方の情報を入手することができない。このため、OTE のリスクアセスメントに関する非臨床試験、臨床試験に関する利用可能な公知情報は限定的である。今回の調査によって、これまでにヒト臨床試験に進んだ遺伝子編集治療のパイプラインは 31 製品、その技術開発会社は、計 11 社・団体に限られることがわかった。したがって、これらの限られた製品に関する報告と、その技術開発主体が公表した情報を検討すれば、遺伝子編集治療の OTE に関する非臨床試験に関する公知情報をほぼカバーできる。本章ではそれを実施した。

非臨床試験の文献では、その文献が必ずしも特定の臨床試験の製品に関するデータに関する報告であることを明確に述べるわけではない。本研究では、次に述べる文献上の記述の関係から、非臨床試験の文献とそれぞれの治験との関係を確定させた。Sangamo 社のグループが報告した T 細胞の CCR5 のノックダウンによる ZFN の非臨床試験について記載した *Nat Biotechnol* 2008<sup>25)</sup>は、同一グループの筆者が報告した *Nature Biotech* 2010<sup>69)</sup>に引用され CD4+T 細胞の遺伝子編集による HIV の治療目的で臨床試験が進められた ZFN の製品であることが述べられた。このことから、この文献<sup>25)</sup>は SB-728-T と SB-728mR-T の非臨床試験の文献だと判断した。SB-728mR-HSPC については、*Methods & Clinical Development* 2016<sup>69)</sup>において該当の NTC02500849 の非臨床試験であることが明示された。UCART19 の非臨床試験の報告(*Sci Transl Med.* 2017 Jan 25;9(374)<sup>34)</sup>は、臨床試験(NCT02746952、NCT02808442)を進めている UCART19 の非臨床試験であることを明示した。EDIT-101 に関しては、文献<sup>69)</sup>によって同製品の非臨床試験であることが明示された。CTX001 と NTLA-2001 に関しては、それぞれの Phase1 の臨床試験の報告<sup>17), 4)</sup>において試験中の遺伝子治療製品の非臨床試験のオフターゲットの解析として報告された。βグロビンの遺伝子編集製品の非臨床試験の文献である *Sci Transl Med.* 2021<sup>59)</sup>は、GPH101(NCT04819841)の非臨床試験であるということは明示していないが、発行時期と技術内容と報告者の所属から、同製品の非臨床試験だと判断した。

B-728-T/SB-728mR-T、SB-728mR-HSPC、CTX-001、EDIT-101、EDIT-301、NTLA-2001、GPH101 はそれぞれ別のターゲット疾患(HIV 感染症、 $\beta$ サラセミア、網膜症、鎌形赤血球症、家族性アミロイドーシス)、異なるターゲット臓器(T 細胞、HSPC、網膜、肝臓)に対して、別々の会社(Sangamo Therapeutics, Inc.、CRISPR Therapeutics, Inc.、Editas medicine Inc.、Intellia Therapeutics Inc.、Graphite Bio, Inc.)だが、共通して、図 3-2 に示した考え方でオフターゲットの解析が行われていた。すなわち、Discovery Phase では In vitro の実験及び計算機の探索によって、遺伝子編集治療に用いる遺伝子編集酵素によって生じる可能性のある POL を広範にリスト化した。ここでは、無細胞系で脱タンパク質を行った DNA に対して遺伝子編集酵素の処理を行う、または遺伝子編集操作中の DSB の検出感度を高めるために dsDNA を添加するなどの高感度の検出技術を用いた。実臨床では検出用の試薬などは投与されないため、これは実臨床での遺伝子編集酵素の使用実態からはかけ離れた実験系である。検出感度は高いが実臨床系では生じない擬陽性のオフターゲットが多数検出される<sup>24)</sup>。このため、このステップで検出された OTE サイトは、POL とされる。

このステップで用いられた Digenome-seq 以外の実験的な手法はすべて PCR を用いるため、検出感度は 0.1% である<sup>32),24)</sup>、及び第 1 章 1.1.4)。このため、Discovery Phase においては 0.1% 以下の頻度で発生した POL は偽陰性として見落とされることになる (Digenome-seq の場合は 0.05% 以下の頻度のものは原理的に見落とす)。次の Verification Phase では、臨床でのターゲット組織に近いヒト組織モデルに対して、臨床での使用実態に近い条件(検出用の dsDNA を使用しない等)で、治療用に設計された遺伝子編集酵素による OTE を評価する。このステップでは、遺伝子編集処理を行った対象細胞に対して Amp-Seq を行うことで、OTE の染色体 DNA 上の位置と頻度を定量的に見積った。ヒトゲノム全長に対して NGS を試みるとリード数が不足するため、低頻度で生じるオフターゲットを検出することはできない。そのため、Discovery Phase で検出した POL のゲノム上の位置情報が利用される。オフターゲットの候補となったサイトのみを PCR で増幅して分析する Amp-Seq を用いて、POL のみの配列を解析することで、限られたシーケンスリード数での解析を可能にしている<sup>24)</sup>。このように Discovery Phase と Verification Phase を段階で組み合わせた OTE の解析が行われた。

幅広い製品の非臨床試験で実施されたこのスキームには、Discovery Phase で偽陰性として見落とされる POL に紐づけられる OTE を検出することができない、また、

Verification Phase で用いる Amp-Seq の PCR による複製エラーと NGS の感度限界から ~0.1%以下の頻度の OTE は Verification Phase では偽陰性となって検出できないという限界がある。したがって、この評価のスキームを用いても実際には検出ができていない OTE は数多く存在する可能性がある。

数ある POL の探索法から Discovery Phase でどの方法を選択すべきかについて議論が残る。この点について、Bao らは、総説<sup>24)</sup>で POL の探索法についての比較検討を行った。細胞を用いない系では、Digenome-seq、CIRCLE-seq、SITE-seq 及び DIG-seq を比較。細胞を用いる系としては HTGTS、GUDE-seq、DISCOVER-seq 及び BLISS 法を比較した。これらの手法は遺伝子編集酵素の DSB のイベントが発生した部位を、何らかの方法で選択的にサンプリングもしくは増幅することで、該当配列を DSB が生じていない部分に対して濃縮する。Bao らは、検出効率の比較の指数として、各手法のオンターゲットの遺伝子編集の DSB の部位の濃縮倍率を使用した。細胞を使用する系では、GUIDE-seq の濃縮倍率が他の方法よりも 1 から 2 桁高く、偽陽性率も低いため POL の探索の最適な方法として推奨された。つまり、2015 年に開発された GUIDE-seq が細胞を用いる POL の探索法の State of the Art の技術である。同総説<sup>24)</sup>ではさらに細胞を用いない 4 つの方式では大きな差異はなかったと報告された。細胞を用いない POL の探索法については、State of the Art の方法が 1 つには定まっていないことになる。図 3-3 には、各製品のプロジェクトで採用された非臨床試験法を記載した。細胞を用いない解析方法は、SELEX、Digenome-seq、SITE-seq、CIRCLE-seq がそれぞれ採用され一貫性がない。細胞を用いる系としては、近年のプロジェクト(2018 年以降に臨床試験が開始)ではすべてに GUIDE-seq が採用された。つまり、各プロジェクトでは、その非臨床試験を実施したタイミングに実用化されていた検出力の最も高い OTE の検出手段(State of the Art)を、非臨床試験で採用していたと理解できる。

表 3-5 に、遺伝子編集酵素の種類、遺伝子編集治療製品のターゲット組織・細胞、遺伝子編集酵素の導入のためのモダリティ及び DDS 技術を記載した。これらのパラメーターと OTE の評価についての関係を考察する。従来 of 遺伝子治療の経験により、染色体 DNA の変異は分化細胞よりも未分化細胞でより大きながん化のリスクをもたらすことが分かっている<sup>41)</sup>。この観点では、肝実質細胞をターゲットとした NTLA-2001 や分化 T

細胞をターゲットとした SB-728mR-T よりも、HSPC をターゲットとした製品 (SB-728mR-HSPC、CTX-001、EDIT-301、GPH101) に、より高い OTE による発がん性のリスクが想定される。また、第 1 章で述べたように、遺伝子酵素の細胞導入のモダリティとして、長期間の細胞内滞留が想定される pDNA を用いた場合は、一過性である mRNA や RNP を用いた場合よりも遺伝子編集酵素への染色体 DNA の暴露時間が長いいため、OTE 及びその発がん性のリスクが増大する(第 1 章 1.1.3 節)。この観点では、pDNA を内包した AAV で遺伝子編集酵素が細胞導入される SB-728-T と EDIT-101 のリスクが相対的に高いと想定される。このような観点で見直してみても、いずれの製品も図 3-2 で示した製品共通の 2 段階の OTE 評価を、図 3-3 で示した開発時点で State of the Art の OTE の検出手段を使って行うという、本章で示した枠組みから外れる物はなかった。

表 3-5 に示した遺伝子編集治療製品の OTE の検出状況には、遺伝子編集酵素の種類の違いによる差異よりも大きな差が同一遺伝子編集酵素を使用した異種製品間に存在した。CRISPR-Cas9 は DNA20 塩基を sgRNA で認識し、ZFN は 36 塩基の DNA 配列を ZFP で認識する、TALEN は DNA40 塩基を認識する(第 1 章 1.1.1 節)。これが DNA 配列認識の特異性の差になり、OTE の発生率に関しては、CRISPR-Cas9 が不利で、ZFN や TALEN が有利であるという考え方がある<sup>84)</sup>。しかし実際には、染色体 DNA 上に類似配列が少ないターゲット配列の選定(sgRNA の設計)や、利用するモダリティの種類、ターゲット細胞種(染色体のクロマチン構造がオン・オフターゲットへの遺伝子編集酵素の接触に影響)など様々な要因によって、OTE の発生率は影響を受ける。得られた結果(表 3-5)には、遺伝子編集酵素の種類間に OTE 発生 の 明確な 序列はなく、本結果からは遺伝子編集酵素の種類における OTE の発生頻度に関する優劣は議論できなかった。

遺伝子編集酵素のリスクとしては、染色体の転座が指摘されている<sup>22)</sup>が、実際の非臨床試験での評価の報告は数が少なく、GPH101 に関する HTGTS 解析についてのみであった(表 3-5)。遺伝子編集による染色体の転座は、遺伝子編集酵素による DSB が 1 つの細胞の中で同時に 2 か所以上発生した場合に、切断前とは異なった誤った場所で交差して DSB が結合されることによって起こる。オンターゲット位置とオフターゲット位置の結合や、異なる 2 つのオフターゲット位置の結合がおりうる<sup>22)</sup>。GPH101 では、2 つの OTE 間での染色体の転座が起こったことを報告した<sup>59)</sup>。DSB の発生位置を確定すればそ

の遺伝子編集酵素が起こしうる転座のパターンを想定することができる。このため、染色体転座のリスク評価としては、HTGTS等による染色体転座の測定実験は必須にされていないのかもしれない。

ここまでに見てきた遺伝子編集治療製品の非臨床試において、*ex vivo* の製品については、ヒト細胞の遺伝子編集製品を免疫不全マウスに移植する動物試験での造腫瘍試験が報告された<sup>59),77),79)</sup>。一方で、*in vivo* 遺伝子編集治療製品の動物試験による発がん性試験についての報告は見つからなかった。遺伝子編集治療の発がん性の懸念は OTE によるが、ヒトと実験動物では染色体の DNA 配列が異なるため、OTE のプロフィールはヒトと動物では異なる。このため、ヒト用に設計された *in vivo* 用遺伝子編集製品の発がん性を *in vivo* 動物試験の結果を基に外挿してヒトでの発がん性の予測をすることは不可能である。動物実験の基準についての理念、Replacement(代替)、Reduction(削減)、Refinement(改善)の 3R の観点からも、これを実施しないことは妥当である。

今回の調査では、SB-728-T/SB-728mR-T、CTX001、NLTA-2001 の 4 つの製品について、臨床試験のプロトコルが見つかった(表 3-6)。いずれのプロトコルにおいても、リスクアセスメントの項において、Verification Phase で確認された 0~数個の OTE について、その部位と発生頻度とともに、パブリックドメインに蓄積された発がん性に関する遺伝子の科学的な知見から、遺伝毒性や発がん性に関するリスクを考察していた。

Discovery Phase で発見されたが、Verification Phase では検出されなかった多数の POL については、関連する遺伝子の個別のリスクアセスメントの対象外であった。また、技術的に検出できない 0.1%以下の OTE の存在については、そのリスクをヒト臨床試験の開始にあたっての障害とはしていなかった。

臨床試験のプロトコルは、治験スポンサーが作成して、臨床試験サイトの試験指導医師が利用する。プロトコルには治験を実施する医療従事者に伝えるべき、想定される有害事象に関するリスク管理と評価方法が記載される。臨床試験のプロトコルは IND や CTA の資料の一部として FDA や EMA に提出され、その内容は FDA や EMA のレビューを受ける。したがって、今回分析したプロトコルに記載されたリスクアセスメントの考え方は、これら規制当局の考え方と矛盾がないと想定される。

遺伝子治療(遺伝子編集治療も含む)の臨床安全性担保のためのガイドラインとして米国

で発行された US-LTFU-Guideline(2020)では、遺伝子治療製品の臨床安全性の留意点として、感染症と免疫毒性に加えて、発がん性のリスクを指摘している。同ガイドラインでは、インフォームドコンセントで被験者に生検ないし死亡時の剖検でのサンプル提供を求め、発がん等の有害事象の発生時に製品と有害事象の因果関係の調査の事前準備を計画することをもとめた。EMA のガイドライン EU-Guideline(2018)は感染症、免疫毒性、過剰発現、発がん性、意図しない組織への製品の移行を、安全性で留意すべきこととして挙げた。この EMA のガイドラインも、臨床試験での発がん性のリスクを想定し、因果関係を調べる準備を事前に計画することを求めた。これら 2 つのガイドラインは、十分な被験者のインフォームドコンセントを得た上で、非臨床試験で有害事象の発生の可能性を十分に否定できない遺伝子編集製品については、臨床試験での有害事象の評価を認めている。懸念される発がんのイベントは被験物質での介入後、長期間経過後に生じる可能性がある。また、時間をおいて起こる発がん性等の遅延性の有害事象の確認のために、両ガイドラインは長期間の観察期間を設定することを求めている<sup>41,42)</sup>。

今回検討した遺伝子編集製品については、UCART19(NCT02735083)、CTX001(NCT04208529)、EBIT-101(NCT05143307)、VOR33(NCT05309733)がそれぞれ 15 年間、SB-728-T/SB-728mR-T(NCT04201782)が 12 年間、ST-400/BIVV003(NCT05145062)が 10 年間、SB-318/SB-913/SB-FIX(NCT04628871)では 10 年間の遅延性有害事象の確認のための観察臨床試験が登録されていた(Clinical trial gov)。

ここまでの議論を統合すると図 3-4 のスキームを描くことができる。非臨床試験では、臨床でのターゲット組織に可能な限り近い、利用可能な *in vitro* の組織モデルが用いられる。このモデルに対してヒト臨床試験に用いる遺伝子治療製品で遺伝子編集処理を行い、ヒト臨床試験で想定される OTE の箇所と頻度を求める。この試験で得られた限られた数の OTE(0 から数個)について、関連する遺伝子の情報からヒト臨床でのリスクアセスメントを行う。この際、Discovery Phase で得られた POL や検出できない低頻度の OTE についてはリスクアセスメントの対象としない。非臨床試験では評価できない OTE の残存リスクについては、ガイドライン<sup>41,42)</sup>に従って、臨床試験で評価を行う。これは、本論文で示したすべての遺伝子編集製品(がん治療用の製品である UCART-19 を除く)の OTE の評価における共通したストラテジーであった。

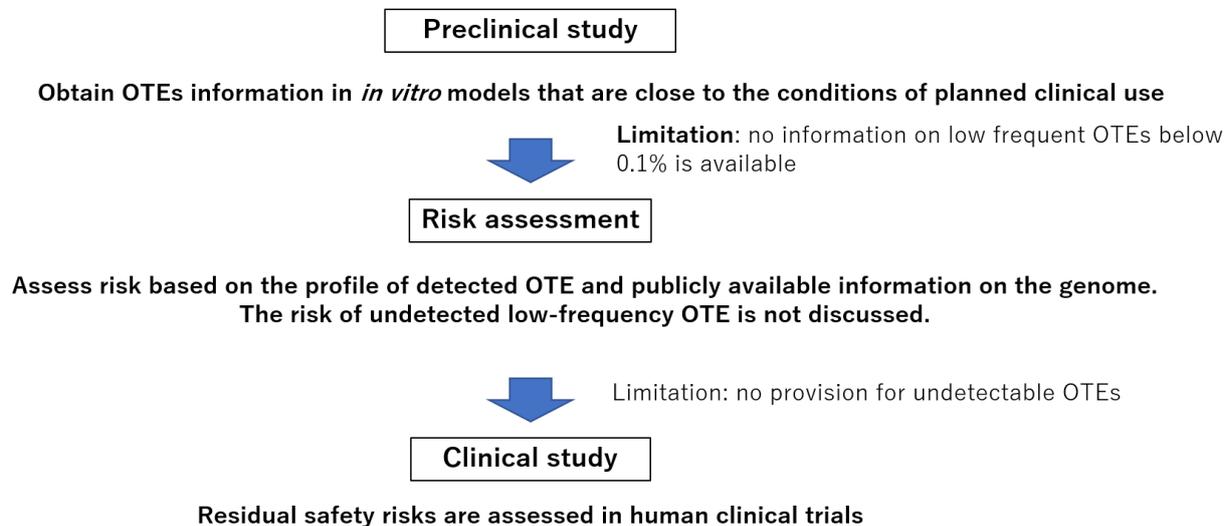


図 3-4 非臨床開発から臨床開発への移行の際の OTE のリスク評価のスキーム

(著者作成)

非臨床試験では、臨床でのターゲット組織に可能な限り近い、利用可能な *in vitro* の組織モデルが用いられる。このモデルに対してヒト臨床試験に用いる遺伝子治療製品で遺伝子編集処理を行い、ヒト臨床試験で想定される OTE の箇所と頻度を求める。この試験で得られた限られた数の OTE(0 から数個)について、関連する遺伝子の情報からヒト臨床でのリスクアセスメントを行う。この際、より検出感度の高い実験系で得られた POL や検出できない低頻度の OTE についてはリスクアセスメントの対象としない。非臨床試験では評価できない OTE の残存リスクについては、ガイドライン<sup>40-41)</sup>に従って、臨床試験で評価を行う。これは、本論文で示したすべての遺伝子編集製品(がん治療用の製品である UCART-19 を除く)の OTE の評価における共通したストラテジーであった。

### 3.5 本章の結論

臨床開発に進んだ製品の非臨床試験では、その時点で利用可能な **State of the Art** の解析手法とヒト臨床試験の実態に近いモデルを用いて OTE のプロファイルが取得され、関連する遺伝子の情報からリスクアセスメントが行われた。現行技術で検証ができない低頻度の OTE のリスク検証は非臨床試験のフェーズでは保留されて、臨床試験でのリスク評価に進められていた。これは、FDA や EMA の遺伝子編集治療製品のガイドラインが示した、非臨床試験で検証できないリスクについて臨床試験で確認することを認めるガイドに沿っている。

## 第4章 遺伝子編集治療製品の臨床試験における安全性の評価

### 4.1 目的

第2章のガイドラインの分析、第3章の非臨床試験の実例解析によって、遺伝子編集治療製品の開発が進む欧米では、OTEの非臨床でのリスク評価は現時点での最先端の方法を用いて実施し、それでも残存するリスクはLong Term Follow-Up(LTFU)を前提とした臨床試験でリスクを評価するという方針であると明らかにした。第4章では、遺伝子編集治療製品の臨床試験の実態を調べ、第2章で調べた欧米の遺伝子治療のガイドラインが遺伝子編集治療製品の臨床試験をどのように効果的にコントロールしているかを調べる。

### 4.2 材料と方法

第3章の調査でリストアップした遺伝子編集治療製品に関して、米国のClinical trial gov<sup>48)</sup>、欧州のClinical trial registry<sup>49)</sup>、日本の臨床試験ポータルサイト<sup>50)</sup>を検索し、関連する臨床試験の情報を表4-1～表4-3にまとめた。公知情報から見つかった4つの遺伝子編集治療製品の臨床試験の試験プロトコル(表4-4)について詳細なレビューを行い、表4-5にまとめた。また、米国におけるLTFUの実施状況を表4-6、および図4-1にまとめた。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 日米欧で開始された遺伝子編集治療製品の臨床試験

TALENの技術を用いた遺伝子編集製品を表4-1に示した。UCART-19<sup>34)</sup>、ALLO-501A<sup>51)</sup>、ALLO-715<sup>52)</sup>、UCART-123<sup>53)</sup>、UCART-CS1<sup>54)</sup>、UCART-22<sup>55)</sup>の6つの製品があった。いずれも血液がんを対象とした他家CAR-T製品である。これらは生産性向上のために、CAR-Tの原材料として患者由来のT細胞ではなく、健常人ドナー由来のT細胞を用いることを特徴とする。ドナー由来のT細胞はレシピエントの抗原提示細胞から主要組織適合性複合体(Major Histocompatibility Complex: MHC)による抗原提示を受けることで、強い移植片宿主病を引き起こす<sup>85)</sup>。これを防止する目的で、これらの他家CAR-T製品では、MHCからT細胞が抗原提示を受けるレセプターであるT-Cell receptor(TCR)を構成する2つの遺伝子TRACとTRBCをCAR-T細胞からTALENによる遺伝子編集技術でノックダウンしている。遺伝子編集CAR-T細胞は、ex vivoで調製された。その際の遺伝子編集酵素(TALEN)は、mRNAとしてエレクトロポレーションの技術を用いてT細

胞に *ex vivo* で導入された。いずれの製品についても Phase1 ないし Phase1/2 の試験段階において、安全性確認と移植細胞数を決定する Dose finding の試験が組み込まれていた。

CRISPR-Cas の技術を利用した遺伝子編集治療製品の臨床試験を表 4-2 にまとめた。Ex vivo の HSPC をターゲットとした複数の遺伝子編集治療製品の臨床試験が行われている。BCL11A のエンハンサーの破壊による胎児性βグロビンの発現を狙った製品として、βサラセミアと鎌形赤血球症の治療製品である CTX001<sup>17)</sup>、EDIT-301<sup>57)</sup>、OTQ923<sup>58)</sup>が臨床試験に進められた。鎌形赤血球症とβサラセミアはいずれも、ヘモグロビンを構成する成人性βグロビンの変異が原因で生じる疾患である。成人では発現が抑制されている胎児性βグロビン(変異を持たない)の発現量を増加させることで治療が期待されるため、これらの製品では、胎児性胎児性βグロビンの発現抑制因子である BCL11A の発現量を遺伝子編集によって抑制すること狙う<sup>5)</sup>。鎌形赤血球症の領域では、βグロビンの変異遺伝子を修正する GPH101<sup>59)</sup>も臨床試験に入った。

CRISPR-Cas9 よって、TCR(TRAC 遺伝子)をノックダウンした他家 CAR-T 製品: CTX-110<sup>60)</sup>、CTX-120<sup>61)</sup>、CTX-130<sup>62)</sup>、CB-010<sup>64)</sup>も臨床試験に入った。CTX-110、CTX-120、CTX-120 は TCR(TRAC 遺伝子)に加えて MHC1 を CRISPR-Cas9 でノックアウトしている。MHC1 のノックアウトは、移植された CAR-T 細胞がレシピエントの T 細胞に MHC1 を介して認識されて除去されることを防ぐことを目的とした遺伝子編集である。CB-010<sup>64)</sup>は、TCR(TRAC 遺伝子)に加えて、PD-1 遺伝子をノックアウトした。PD-1 の除去は、腫瘍免疫環境下での制御系免疫細胞からの PD-1 を介した免疫抑制による CAR-T の薬効減弱を防ぐことを狙ったものである。NTLA-5001<sup>63)</sup> は、腫瘍抗原標的 T 細胞受容体を導入した遺伝子編集 T 細胞である。この製品では、CRISPR-Cas9 の DSB によって、TCR を構成する遺伝子の内 2 つ TRAC と TRBC 遺伝子をノックアウトして、そのうち TRAC 遺伝子座に腫瘍抗原標的 T 細胞受容体の遺伝子を導入した。

CRISPR-Cas による In vivo の遺伝子編集技術開発の領域では、レバー先天性黒内障 10 型の治療を狙った EDIT-101<sup>66)</sup>が網膜下投与の局所投与製剤として開発が進められている。DDS 技術としては、アデノ随伴ウイルスベクターの一種である AAV5 が用いられた。AAV5 に SaCas9 の遺伝子と sgRNA をコードする DNA を搭載した。AAV5 は、EDIT-101 の遺伝子編集のターゲット細胞である光受容細胞に指向性をもつ AAV の血清型であるために選定された<sup>66)</sup>。肝細胞のトランスサイレチン遺伝子をノックダウンして

家族性アミロイドーシスの治療を狙う NTLA-2001<sup>4)</sup>、KLKB1 の遺伝子をノックダウンして遺伝性血管性浮腫の治療を狙う NTLA-2002<sup>67)</sup>が臨床試験を進めている。DDS としては、CRISPR-Cas9 をコードする mRNA と sgRNA を共内包した LNP\*が用いられている。

\*LNP は、ionizable lipid、リン脂質、ポリエチレングリコールで修飾された PEG 脂質とコレステロールで構成される脂質ナノ粒子で核酸(mRNA と sgRNA)を内包する DDS 技術<sup>86)</sup>である。LNP によって核酸分子を核酸分解酵素から守るとともに、肝実質細胞への送達を助ける。LNP は注射製剤として製剤化され、患者に静脈投与される。投与後に肝臓に集積して肝臓中の肝実質細胞に送達されるメカニズムは文献<sup>4)、86)</sup>等に次のように解説されている。血管はアルブミン等のタンパク質 (3nm)を内部に保持することで、コロイド浸透圧による内部浸透圧を維持している。このため、一般臓器の血管壁は 3nm 以上のサイズの物質を血管内部から外部へ受動的には透さない。LNP は 100nm 程度の大きさをもつため、静脈投与後に血管内の循環血液に留まる。例外は、血管壁に 100nm 以上の大きな穴(フェネストラ)が多数開いている毛細血管(類洞)も肝臓である。肝臓では、類洞のフェネストラを通して、血管内から実質側であるディッセ腔に LNP が逸出する<sup>4)</sup>。静脈投与された LNP の表面には血液中に存在する apolipoprotein E (ApoE)が結合(オプソニン化)する。肝臓の肝実質細胞はその表面に Low-Density lipoprotein(LDL)レセプターを発現している。肝実質細胞は、LDL レセプターによって ApoE 修飾された LNP を認識して細胞内に能動的に取り込む<sup>4)、86)</sup>。ApoE-LDL レセプターの系は、本来は人体がもつ LDL 粒子を肝臓に取り込むメカニズムであるが、肝臓をターゲットとした LNP 製剤である NTLA-2001 はこのメカニズムを利用して CRISPR-Cas9 をコードする mRNA と sgRNA を共内包した LNP をターゲットである肝実質細胞に送達する<sup>4)</sup>。LDL レセプターの認識後の LNP の肝臓実質細胞への取り込みは、エンドサイトーシスを経由する。この際、エンドソームに取り込まれた LNP がエンドソーム膜を壊して細胞質側に mRNA と sgRNA を放出するのに、LNP の構成要素の一つである ionizable lipid がエッセンシャルな役割を担う<sup>86)</sup>。一般的に ionizable lipid の分子構造には、中性域に pKa を持つ官能基(3級アミン)が存在する。このため、ionizable lipid は pH が中性である血漿中では電荷をもたないが、酸性環境(~pH4)であるエンドソーム内では正電荷を帯びる。エンドソーム内で正電荷を帯びた LNP は、負電荷を帯びたエンドソーム膜と膜融合を起こしてエンドソーム膜を破壊して内包する核酸を細胞質側に放出する<sup>86)</sup>。以上のメカニズムは、核酸を内包した LNP に一般的に

利用されている技術であり、NTLA-2001 に特殊なものではない<sup>87),88),89)</sup>。

ZFN の技術を用いた遺伝子編集治療製品に関する臨床試験を表 4-3 にまとめた。HIV 感染症治療薬の SB-728 シリーズによる *ex vivo* の治療、ST-400<sup>35)</sup>、BIVV003<sup>35)</sup>によるβサラセミア、鎌形赤血球症の治療、ZFN による DSB 切断によって肝臓のアルブミンの遺伝子座への正常遺伝子の挿入を目指した SB-318<sup>71)</sup>、SB-913<sup>72)</sup>、SB-FIX<sup>73)</sup>の臨床試験が進められた。

表 4-1 TALEN の技術を利用した遺伝子編集治療製品の臨床試験 (著者作成)

プロダクト名	プロダクトの内容	投与形態	試験内容	開発者	臨床試験		エンロー ルメント	First posted date	Actual start date	実施国	観察期間
UCART19 (ALLO-501)	CD19をターゲットとした他家CAR-T。高CD19CARに加えて、リツキシマブ(抗CD20抗体)を細胞表面に発現。TALENでTCR $\alpha$ $\beta$ とCD52をノックダウン	ex vivo	再発・難治性CD19陽性B細胞性急性リンパ性白血病、DOSE finding	Collectis社	NCT02746952	P1	25	2016/4/21	2016/8/1	米、仏、英、日	12か月
			上記、小児対象の対象の試験	Collectis社	NCT02808442	P1	13	2016/6/21	2016/6/3	米、仏、西、英	12か月
			例数増による有効性・安全性確認	Collectis社	NCT03939026	P1	74	2019/5/6	2019/5/1	米	不明
ALLO-501A	UCART19からリツキシマブをのぞいたもの	ex vivo	Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma (LBCL)の試験	Collectis社	NCT04416984	P1/2	60	2020/6/4	2020/5/21	米	不明
ALLO-715	BCMAをターゲットとした他家CAR-T。TCR $\alpha$ $\beta$ とCD52をノックダウン	ex vivo	難治性多発性骨髄腫を対象としたPhase1	Collectis社	NCT04093596	P1	132	2019/9/18	2019/9/23	米	36か月
UCART123	CD123をターゲットとして他家CAR-T。TALENでTCR $\alpha$ $\beta$ をノックダウン	ex vivo	再発AMLを対象としたPhase1	Collectis社	NCT03190278	P1	65	2017/6/16	2017/6/19	米	24か月
			Adverse Genetic Risk Acute Myeloid Leukemia	Collectis社	NCT04106076	P1	0	2019/9/26	2019/7/11	英	24か月
			BPDCN*を対象としたPhase1	Collectis社	NCT03203369	P1	1	2017/6/29	2017/6/28	米	84日
UCARTCS1	CS1ターゲットCART。TALENでTCR $\alpha$ $\beta$ とCS1をノックダウン	ex vivo	難治性多発性骨髄腫を対象としたPhase1	Collectis社	NCT04142619	P1	18	2019/10/29	2019/11/21	米	24か月
UCART22	CD22ターゲットのCARをレンチベクターでノックイン。TALENでTCR $\alpha$ $\beta$ とCD52をノックダウン	ex vivo	B細胞急性リンパ芽球性白血病 Phase1	Collectis社	NCT04150497	P1	40	2019/11/4	2019/10/14	米	24か月

表 4-2 CRISPR-Cas の技術を利用した遺伝子編集治療製品の臨床試験 (著者作成)

プロダクト名	プロダクトの内容	投与形態	試験内容	開発者	臨床試験		エンロー ルメント	First posted date	Actual start date	実施国	観察期間
CTX001	CRISPR-CASでのHSPCの編集による鎌形赤血球症(SCD)の治療	ex vivo	CRISPR-CASによるβサラセミアの治療	CRISPR thx社	NCT03655678	P1/2	45	2018/8/31	2018/9/14	米、加、独、伊、英	24か月
		ex vivo	CRISPR-CASによるβサラセミアの治療	CRISPR thx社	同上	P2/P3	45	同上	同上		24か月
		ex vivo	CRISPR-CASによるβサラセミアの治療	CRISPR thx社	NCT05356195	P3	12	2022/5/2	2022/5/3	米、伊	24か月
		ex vivo	CRISPR-CASによる鎌形赤血球症(SCD)の治療	CRISPR thx社	NCT03745287	P1/2		2018/11/19	2018/11/27	米、加、独、伊、英	24か月
		ex vivo	CRISPR-CASによる鎌形赤血球症(SCD)の治療	CRISPR thx社	同上	P2/P3	45	同上	同上	米、ベルギー、加、仏、独、伊、英	24か月
ex vivo	CRISPR-CASによる鎌形赤血球症(SCD)の治療	CRISPR thx社	NCT05329649	P3	12	2022/4/15	2022/5/2	米、伊	24か月		
CTX110	CD19をターゲットとした他家のCAR-T	ex vivo	B細胞悪性腫瘍を対象とした試験	CRISPR thx社	NCT04035434	P1	143	2019/7/29	2019/7/22	米、濠、加、独	60か月
CTX120	BCMAをターゲットとした他家のCAR-T	ex vivo	多発性骨髄腫をターゲットとした試験	CRISPR thx社	NCT04244656	P1	26	2020/1/28	2020/1/22	米、濠、加、西	60か月
CTX130	CD70をターゲットとした他家のCAR-T	ex vivo	再発腎細胞がんをターゲットとした試験	CRISPR thx社	NCT04438083	P1	107	2020/6/18	2020/6/16	米、濠、加、蘭	60か月
			血液がん(B細胞、T細胞)をターゲットとした試験	CRISPR thx社	NCT04502446	P1	45	2020/8/6	2020/7/31	米、濠、加	60か月
EDIT-101	レーパー先天性黒内障10型(LCA10) のCRISPR-CASによる治療	in vivo 眼局所投与	LCA10患者を対象とした試験	Editas medicin社	NCT03872479	P1/2	34	2019/3/13	2019/9/26	米	12か月
EDIT-301	CRISPR-CASでのHSPCの編集による鎌形赤血球症(SCD)の治療	ex vivo	SCD患者を対象とした試験	Editas medicin社	NCT04853576	P1/2	40	2021/4/21	2021/5/4	米	24か月
	CRISPR-CASでのHSPCの編集によるβサラセミアの治療	ex vivo	βサラセミア	Editas medicin社	NCT05444894	P1/2	6	2022/7/6	2022/4/29	米	24か月
OTQ923	CRISPR-CASでのHSPCの編集による鎌形赤血球症(SCD)の治療	ex vivo	SCD患者を対象とした試験	Intellia thx社	NCT04443907	P1/2	20	2020/6/23	2020/8/26	米	24か月
NTLA-5001	自家T-Cell治療。Milms, Tumor1 (WT1) 標的。AMLがターゲット	ex vivo	AML患者がターゲット	Intellia thx社	NCT05066165	P1/2	6	2021/10/4	2021/11/22	米、英	28か月
NTLA-2001	CRISPR-CASでの肝細胞のATTRのKDによる遺伝性アミロイドーシスの治療	in vivo全身投与	家族性ATTRアミロイドーシスの患者を対象とした試験	Intellia thx社	NCT04601051	P1	72	2020/10/23	2020/11/5	新、英、瑞	24か月
NTLA-2002	CRISPR-CASでの肝細胞のKLKB1のKDによる遺伝性angioedemaの治療	in vivo全身投与	遺伝性血管性浮腫の患者を対象とした試験	Intellia thx社	NCT05120830	P1/2	55	2021/11/15	2021/12/10	新、蘭	26か月
Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL)	CISH (Cytokine-induced SH2 protein)をノックダウンしたT細胞	ex vivo	消化器がん	Intima Bioscience	NCT04426669	P1/2	20	2020/6/11	2020/5/15	米	24か月
PBLT T52CAR1	CD19ターゲットCAR-T、TCRをKD	ex vivo	B Acute Lymphoblastic Leukemia	Great Ormond Str	NCT04557436	P1	10	2020/9/21	2020/8/12	英	15年間
CB-010	CD19ターゲットCAR-T、TRAC遺伝子、PD-1遺伝子のノックダウン	ex vivo	Non Hodgkin Lymphoma	Caribou Bioscienc	NCT04637763	P1	50	2020/11/20	2021/5/26	米	12か月
GPH101	B グロビン 遺伝子の修正	ex vivo	CRISPR-CASによる鎌形赤血球症(SCD)の治療	Graphite Bio, Inc.	NCT04819841	P1/2	15	2021/3/29	2021/11/15	米	24か月
EBIT-101	HIV特異的なCRISPR-Cas9	in vivo全身投与	HIV感染症、HIVのウイルスDNAをカット	Excision BioThera	NCT05144386	P1	9	2021/12/3	2022/1/24	米	24か月
VOR33	CD33をノックダウンしたHSPC		Leukemia, Myeloid, Acute	Vor Biopharma	NCT04849910	P1/2	18	2021/4/19	2021/12/16	アメリカ・カナダ	24か月

表 4-3 ZFN の技術を用いた遺伝子編集治療製品の臨床試験 (著者作成)

プロダクト名	プロダクトの内容	投与形態	試験内容	開発者	臨床試験	エンロー ルメント	First posted date	Actual start date	実施国	観察期間	
SB-728-T	ZFNで処理でCCR5 Δ32/ Δ32の変異導入したCD4陽性T細胞の自家移植。HIVに対して耐性を有する。	ex vivo	1st in Human. HAART regimens failure, stable, 良く効くの3群	UPENN	NCT00842634	P1	12	2009/2/12	1/2009	米	9か月
		ex vivo	Dose finding	Sangamo Thx社	NCT01044654	P1	19	2010/1/8	12/2009	米	12か月
		ex vivo	Safety Phase2	Sangamo Thx社	NCT01252641	P1/2	21	2010/12/3	11/2010	米	12か月
		ex vivo	シクロフォスファミドでの前治療後にSB-728-T cellsを投与。Dose finding	Sangamo Thx社	NCT01543152	P1/2	26	2012/3/2	12/2011	米	12か月
		ex vivo	ランダムイズド、2重盲検、IUPM(感染細胞数)と安全性の群間比較。シクロフォスファミドの前治療あり。	Sangamo Thx社	NCT03666871	P1/2	30	2018/9/12	2019/6/12	米	24か月
SB-728mR-T	SB-728-Tから遺伝子導入法をAAVからmRNAのエレクトロポレーション法に変更したもの	ex vivo	HIV感染患者を対象とした試験	Sangamo Thx社	NCT02225665	P1/2	8	2014/8/26	2014/8/1	米	12か月
		ex vivo	HIV感染患者を対象とした試験	Sangamo Thx社	NCT02388594	P1	14	2015/3/17	2015/4/1	米	6か月
CD4 CAR+CCR5 SB-728mR T-cells	CSB-728mR-TにCD4をターゲットにしたCARを加えたもの	ex vivo	HIV感染患者を対象とした試験	UPENN	NCT03617198	P1	12	2018/8/6	2019/7/31	米	60か月
SB-728mR-HSPC	ZFNで処理でCCR5 Δ32/ Δ32の変異導入したHSPC	ex vivo	HSPCでの1st in Human	Sangamo Thx社	NCT02500849	P1	12	2015/7/17	2016/3/10	米	60か月
ST-400	ZFNによるβサラセミアの治療	ex vivo	ST-400の1st in Human	Sangamo Thx社	NCT03432364	P1/2	6	2018/2/14	2018/3/29	米	36か月
BIVV003(SAR445136)	ZFNによる鎌形赤血球症の治療	ex vivo	BIVV003のFIH	Sangamo Thx社	NCT03653247	P1/2	8	2018/8/31	2019/3/6	米	26か月
SB-318	静脈投与薬。ZFNによる肝臓へIDUA遺伝子挿入でのMPSIの治療	in vivo全身投与	Dose finding	Sangamo Thx社	NCT02702115	P1/2	3	2016/3/8	2017/5/24	米	36か月
SB-913	静脈投与薬。ZFNによる肝臓へIDS遺伝子挿入でのMPSIIの治療	in vivo全身投与	Dose finding	Sangamo Thx社	NCT03041324	P1/2	9	2017/2/2	2017/5/11	米	36か月
SB-FIX	静脈投与薬。ZFNによる肝臓へFIX遺伝子挿入での血友病Bの治療	in vivo全身投与	Dose finding	Sangamo Thx社	NCT02695160	P1	1	2016/3/1	2016/11/15	米	36か月

#### 4.3.2 遺伝子編集治療製品の臨床試験の試験プロトコル分析

表 4-1 から表 4-3 に示したプロジェクトの内、3つの遺伝子編集製品に関する臨床開発のプロトコルを解析した。患者由来の T 細胞に *ex vivo* での遺伝子編集によって HIV 耐性を付与して患者への再移植による治療を目指した感染症の治療製品の SB-728-T/SB-728-mRT に関する 2014 年のプロトコル<sup>77,78)</sup>、*ex vivo* での HSPC 遺伝子編集細胞を患者に移植することでβサラセミアの治療を目指した遺伝子編集治療製品 CTX001 に関する 2020 年のプロトコル<sup>90)</sup>、変異型トランスサイレチンを原因とした家族性アミロイドーシスを対象にした *in vivo* での肝臓の原因遺伝子のノックダウンを目指した遺伝子編集治療製品 NTLA-2001 に関する 2020 年のプロトコル<sup>91)</sup>の 3 製品である。いずれも米国、ないし欧州で治験が進められた(表 4-4)。

表 4-4 公開された遺伝子編集治療製品の臨床試験のプロトコル (著者作成)

Product Name	プロトコルの作成日 (改訂日)	対象疾患/投与経路	試験実施国
SB-728-T/SB-728mR-T	Jan 30, 2014 Oct 10, 2014	HIV感染症/ <i>ex vivo</i> / 遺伝子編集T細胞の自己移植	U.S.
CTX001	Feb 2, 2020	βサラセミア/ <i>ex vivo</i> / 遺伝子編集HSPCの自己移植	U.S., Canada, Germany, Italy, U.K
NTLA-2001	Sep 2, 2020	家族性アミロイドーシス/ <i>in vivo</i> 遺伝子編集酵素をコードしたmRNAを内包したLNPを 静脈投与・肝臓の遺伝子編集	New Zealand, U.K., Sweden

これら 3つのプロトコルの概要を表 4-5 にまとめた。

CTX-001 は、米国、カナダ、ドイツ、イタリア、イギリスの 5 か国で試験が進められたβサラセミアを対象とした遺伝子編集治療製品である。胎児性βグロビンを抑制する BLCA11 遺伝子のエンハンサーを CRISPR-Cas9 で破壊することで、胎児性βグロビンの発現抑制を解除、患者赤血球中での発現量を増加させ、これによって遺伝子異常を有する成人性βグロビンの機能を代替することを目指した。自家の HSPC を *ex vivo* にて CRISPR-Cas9 で遺伝子編集を行ったあとに被験者に再移植を行う。再移植前には、アルキル化剤の 1 種であるブスルファンで前処置による骨髄抑制を起こして未編集 HSPC を破壊する。これによって、再移植した遺伝子編集 HSPC の生着率を増やす<sup>17)</sup>。被験者はβサラセミアの患者群の中でも継続的な輸血が必要な生命予後の悪い患者に限られた。さらに、既存の治療法である骨髄移植の適合者は被験者の除外基準に該当するため、たとえ本人が希望しても治験には参加できない。安全性のエンドポイントには、遺伝子編集治療以外の一般的な臨床試験で用いられる安全性の基準である Common Terminology Criteria

for Adverse Events(CTCAE<sup>92</sup>)の基準が採用されていた。DNA 解析による安全性評価は計画されていなかった。その他に、適格基準で書面によりインフォームドコンセントが取得可能であること、また、プロトコルにおいて LTFU への参加をそれぞれ被験者に求めた。

NTLA-2001 は、ニュージーランド、英国、スウェーデンで臨床試験が実施されている。ビタミン A 輸送タンパク質であるトランスサイレチン(TTR)の家族性の変異が原因となるアミロイドーシスの治療を目的とした遺伝子編集治療製品である。TTR は肝臓から血漿へ分泌される分泌タンパク質である。肝臓から分泌された変異 TTR が、全身の神経細胞上でアミロイドを形成することで疾患が進行する。進行性の致死性の疾患である。NTLA-2001 は、CRISPR-Cas9 を用いて疾患の原因となる変異 TTR の遺伝子を肝臓細胞中でノックダウンする。トランスサイレチンをノックダウンしても、サプリメントによるビタミンAの補充に頼れば患者の健康を保つことができる<sup>4</sup>。DDS 技術としては、Lipid Nano Particle (LNP)技術が用いられた。CRISPR-Cas9 をコードした mRNA と、トランスサイレチンの DNA 配列を認識するための sgRNA を内包した LNP が被験者に静脈投与された。同疾患には、すでに有効性と安全性が確立したトランスサイレチンをノックダウンする siRNA 治療薬(Patisiran 等)が上市されている。NTLA-2001 の被験者適格基準には、既存の治療法が何らかの理由で適応できない、もしくは治療効果が得られなかった患者に限るとしている。被験者の除外基準においては、LNP に対するアレルギーを持つ患者が除外された。安全性のエンドポイントには、遺伝子編集治療以外の一般的な臨床試験で用いられる安全性の基準である Common Terminology Criteria for Adverse Events(CTCAE)の基準が採用されていた。ターゲット臓器である肝臓の組織の生検サンプルによる DNA 解析による安全性評価は計画されていなかった。その他、適格基準で書面によりインフォームドコンセントが取得可能であること、また、プロトコルにおいて LTFU への参加をそれぞれ被験者に求めた。

2014 年に発行されたプロトコルで計画された SB-728-T/SB-728mR-T の臨床試験では、ZFN を用いた ex vivo での遺伝子編集によって患者由来の T 細胞に HIV 感染耐性能を持たせて、患者に再移植する治療が試みられた。HIV が T 細胞に感染する際に足掛かりとして必要な細胞表面タンパク質 CCR5 の HIV ウイルスの接触部位を ZFN によって除去する。ZFN の T 細胞への導入技術としては、初期型の SB-728-T においては、ZFN をコードしたプラスミド DNA を AAV9 を用いて細胞に導入した。後期型の SB-728mR-T に

おいては、ZFN をコードした mRNA をエレクトロポレーションで導入した。治験の対象となる被験者は、既存の治療法である Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) で、血中のウイルス量がコントロールできている患者とし、活動中の AIDS 合併症がある患者を適格基準で除外対象とした。この条件は、薬理効果の確認の際に利用された。本試験では HAART を休薬した時の血中のウイルス量の増加をエンドポイントとして測定して、遺伝子編集治療によってウイルスの増加が抑えられるかを試験のアウトカムとして評価した<sup>33)</sup>。つまり、この試験は前述の CTX-001 や NTLA-2001 とは対照的に、他に有効な治療法がある患者を対象とした試験であった。有害事象は、Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology (MedDRA) で記述することとし、染色体 DNA 解析による安全性の確認は行われていなかった。

表 4-5 遺伝子編集製品の臨床試験の試験プロトコルの概要 (著者作成)

製品名	CTX001	NTLA-2001	SB-728-T/SB-728mR-T
発行日/改定日	Sep2, 2020	Feb 4, 2020	Oct 10, 2014
実施国	U.S., Canada, Germany, Italy, U.K	New Zealand, U.K., Sweden	U.S.
対象疾患	$\beta$ -Thalassemia	Transthyretin Amyloidosis with Polyneuropathy	HIV-Infected Subjects
想定作用機序	BCL11のエンハンサー破壊による胎児性Hbの発現向上 遺伝子編集HSPCの自己移植	アミロイドーシスの原因の変異TTR (VA輸送タンパク) のノックダウン	CCR5のHIV感染に必要な領域の除去 ex vivo, 遺伝子編集T細胞の自己移植
DDS	ex vivoで調製した遺伝子編集細胞 細胞への導入は、CRISPR-Cas9をエレクトロポレーションで導入	CRISPR-Cas9のタンパク質をコードしたmRNAをLipid Nano particleに内包した静脈投与製剤	ex vivoで調製した遺伝子編集細胞 細胞への導入は、プラスミドDNAをAAV5 で導入(SB-728-T)ないし、ZFNのmRNA をエレクトロポレーションで導入(SB- 728mR-T)
フェーズ	Phase1/2 a single-arm, open-label, multisite, single-dose	Phase 1/2, open-label, multi-center study.	Phase 1/2, open-label, multi-center study.
対象被験者	輸血が必要な重度な患者 18 to 35 years of age with non- $\beta 0/\beta 0$ TDT. 輸血依存的な患者: 100 mL/kg/年 or 10 単位/年	(承認薬があるため)その治療法が受けられない,または奏功し なかった患者	HAART療法でウイルスがコントロールで きている患者
被験者適格基準	書面でのインフォームドコンセントが可能 継続的な輸血が必要な重篤な患者( $\beta 0/\beta 0$ は除く) 移植前のブスルファン処置に耐えられる全身状態 LTFUの参加に同意すること	書面でのインフォームドコンセント 既存の治療法が適応できないか,奏功しなかった患者に限定	HAART治療でウイルスが非顕在化
被験者除外基準	骨髄移植の適合者は除外される (他に治療法のある患者の除外)	DDSに利用するLipid Nanoparticle(LNP)にアレルギーを持 つ患者の除外 ビタミンA欠乏症が問題になる患者	活動中のAIDS合併症のない患者
エンドポイント 安全性	遺伝子編集HSPCの移植の成否にかかわるもの CTCAEの基準で評価 (ゲノム解析による安全性評価は計画されていない)	CTCAEの基準で評価 (ゲノム解析評価は計画なし) ビタミンA濃度に関する評価 Lipid Nano Particleに関する補体形成の評価 Cas9タンパク質に関する免疫毒性の評価	Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) AE dictionaryで評価
LTFUの規定	LTFUの参加を求める	LTFUの参加を求める	プロトコル上は記載なし

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events

### 4.3.3 長期観察(LTFU)の設定

各遺伝子編集治療製品の臨床開発に関して、米国における LTFU 試験の登録状況を Clinical trial gov で調べて表 4-6 にまとめた。13 の遺伝子編集治療製品に関して、10 年間から 15 年間の長期に渡る LTFU の臨床試験が設定されていた。いずれの LTFU も開発企業がスポンサーだった。

米国では、同一の遺伝子編集酵素を用いる複数の遺伝子編集治療製品の臨床試験について、1 つの LTFU 試験でまとめて長期観察が行われていた。2009 年に臨床試験が始まった SB-728-T (NCT00842634) と 2014 年に試験が始まった SB-728mR-T (NCT02225665) は、NCT04201782 として 2019 年からまとめて LTFU の試験が設定された。肝臓のアルブミンの遺伝子座への正常酵素の導入療法に関する、同一の ZFN を用いた 3 つの遺伝子治療製品、1 型ムコ多糖症を対象とした IDUA 遺伝子の導入を目指した SB-318(2017 年開始、NCT02702115)、2 型ムコ多糖症を対象とした IDA 遺伝子導入の SB-913(2017 年開始、NCT03041324)、血友病 B を対象として血液凝固第 6 因子の遺伝子導入の SB-FIX(2016 年開始、NCT02695160)に対して、2020 年に 10 年間の観察期間を設定した 1 つの LTFU 試験(NCT04628871)が設定された。また、同一の ZFN をβサラセミア、鎌形赤血球症のそれぞれの治療に用いた ST-400(NCT03432364、2018 年開始)、BIVV003(NCT03653247、2019 年開始)については、2021 年から 15 年間の観察期間を設けた LTFU(NCT05145062)が設定された。

図 4-1 に米国における遺伝子編集治療製品の臨床試験の開始時期と LTFU 試験の開始時期をプロットした。2018 年の FDA による LTFU のドラフトガイダンス、2019 年の LTFU のガイダンスの発行に前後して、LTFU の設定と開始が促進された。米国では 26 製品の遺伝子編集治療製品の治験が開始され、そのうち 16 製品ががん以外を対象疾患とした製品である。この 16 製品中、12 製品にすでに LTFU が設定された。

表 4-6 遺伝子編集治療製品の米国における臨床試験の LTFU 試験の設定状況 (著者作成)

プロダクト名	製品の情報				薬効・安全性確認の臨床試験					LTFUの臨床試験			
	遺伝子編集技術		投与形態	対象疾患	開発者	番号	フェーズ	開始日	実施国	観察期間	試験番号	期間	登録日
SB-728-T	ZFN	CCR5 Δ32/Δ32の変異導入	ex vivo	HIV感染症	Sangamo Thx	NCT00842634	P1	1/2009	米	9か月	NCT04201782	12年間	2019/12/17
SB-728mR-T				HIV感染症	Sangamo Thx	NCT02225665	P1/2	2014/8/1	米	12か月			
UCART19	TALEN	CD19をターゲットとした他家CAR-T.	ex vivo	再発・難治性CD19陽性B細胞性急性リンパ性白血病	Cellectis	NCT02746952	P1	2016/8/1	米, 仏, 英, 日	12か月	NCT02735083	15年間	2016/4/12
SB-318	ZFN	肝実質細胞のアルブミンの遺伝子座へのZFNでの切断と各正常遺伝子挿入	in vivo全身投与	MPSI IDUA遺伝子欠損	Sangamo Thx	NCT02702115	P1/2	2017/5/24	米	36か月	NCT04628871	10年間	2020/11/16
SB-913				MPSII IDA遺伝子欠損	Sangamo Thx	NCT03041324	P1/2	2017/5/11	米	36か月			
SB-FIX				血友病B (FIX欠損)	Sangamo Thx	NCT02695160	P1	2016/11/15	米	36か月			
ST-400	ZFN	BCL11Aのエンハンサー領域の破壊	ex vivo	βサラセミア	Sangamo Thx	NCT03432364	P1/2	2018/3/29	米	36か月	NCT05145062	15年間	2021/12/6
BIVV003				鎌形赤血球症		NCT03653247	P1/2	2019/3/6	米	26か月			
CTX001	CRISPR-Cas	BCL11Aのエンハンサー領域の破壊	ex vivo	βサラセミア	CRISPR Thx	NCT03655678	P1/2	2018/9/14	米, 加, 独, 伊, 英	24か月	NCT04208529	15年間	2019/12/23
				鎌形赤血球症		NCT03745287	P1/2	同上	米, 加, 独, 伊, 英	24か月			
PBLTT52CAR1	CRISPR-Cas	抗CD19 CAR-T, TCRをKD	ex vivo	B Acute Lymphoblastic Leukemia	Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust	NCT04557436	P1	2020/8/12	英	15年間	P1試験と同じ	15年間	P1試験と同じ
CB-010	CRISPR-Cas	抗CD19自家CAR-T, TRAC遺伝子, PD-1 KD	ex vivo	Non Hodgkin Lymphoma	Carbon	NCT04637763	P1	2021/5/26	米	12か月	NCT05332054	15年間	2022/4/18
EBIT-101	CRISPR-Cas	HIV特異的配列の破壊	in vivo全身投与	HIV感染症	Excision Thx	NCT05144386	P1	2022/1/24	米	24か月	NCT05143307	15年間	2021/12/3
VOR33	CRISPR-Cas	CD33 KD HSPC	in vivo全身投与	Leukemia, Myeloid, Acute	Vor Biopharma	NCT04849910	P1/2	2021/8/31	米・加	24か月	NCT05309733	15年間	2022/4/4

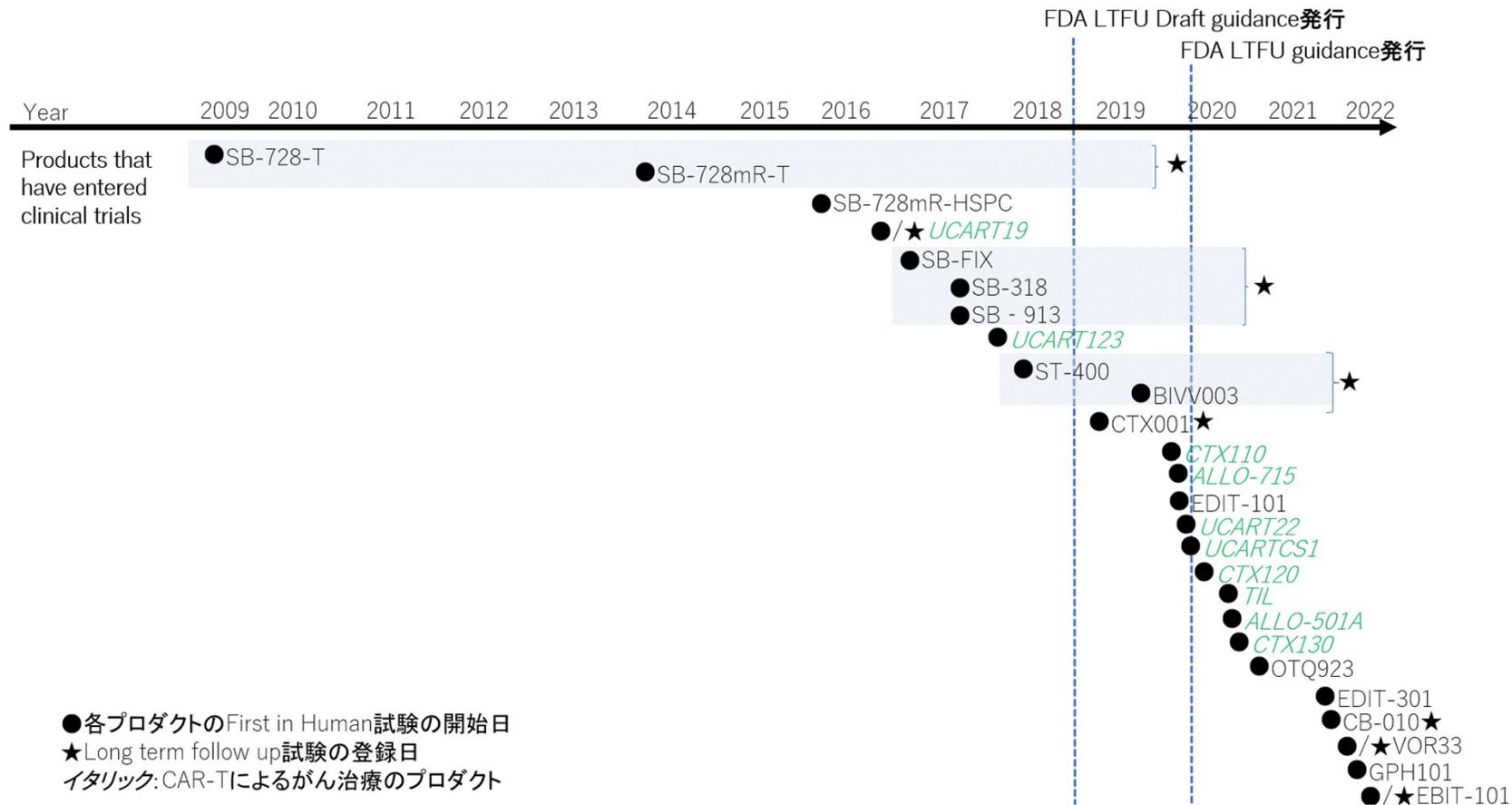


図 4-1 米国における遺伝子編集治療製品の P1 臨床試験と LTFU 試験のそれぞれの開始時期 (著者作成)

米国における遺伝子編集治療製品の臨床試験の開始時期と LTFU 試験の開始時期をプロットした。2018 年の FDA による LTFU のドラフトガイダンス、2019 年の LTFU のガイダンスの発行に前後して、LTFU の設定と開始が促進された。米国では 26 製品の遺伝子編集治療製品の治験が開始され、そのうち 16 製品ががん以外を対象疾患とした製品である。この 16 製品中、12 製品にすでに LTFU が設定された。

## 4.4 考察

### 4.4.1 臨床試験のプロトコルとガイドラインとの関係

SB-728-T/SB-728-mRT、CTX001、NTLA-2001のそれぞれのプロトコルは、2014年、2020年、2020年に作成(改定)された。これらのプロジェクトの治験は、米国、欧州、ないしニュージーランドで進められた(表 4-4)。第2章で解析を行ったFDAのLTFUのガイドラインUS-LTFU-Guideline(2020)とEUの遺伝子治療の安全性に関するガイドラインEU - Guideline(2018)は、それぞれ2020年と2018年に制定されたため、その設立時期の関係からCTX001及びNTLA-2001の臨床試験のプロトコルはこれらのガイドラインの影響を受けた可能性が高いと考えられる。一方、2014年に制定されたSB-728-T/SB-728-mRTのプロトコルは、時期的な関係からこれらのガイドラインの影響を受けていないはずである。

第2章で見た通り、FDAとEMAは発がん性のリスクが内在する遺伝子治療の安全性評価を臨床試験で実施することを推奨した。その前提は、①被験者への十分なインフォームドコンセントがなされていること、②既存の治療法と比較してベネフィットが上回ることが期待されること、③長期的観察(LTFU)により有害事象が確実に検出されること、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないことであった(第2章)。まず、被験者のベネフィットの確保について、CTX001とNTLA-2001は、βサラセミアと家族性アミロイドーシスという進行性の死に至る疾患を治療のターゲットにした。βサラセミアには骨髄移植<sup>93)</sup>、家族性アミロイドーシスにはsiRNA治療薬<sup>94)</sup>という有効性と安全性が確立された治療法が先行開発されている。CTX001とNTLA-2001のプロトコルの被験者の適格基準においては、これらの治療法が適応可能な患者は治験に参加することが拒まれた。また、両製品のプロトコルでは共に、インフォームドコンセントを取得可能な者であること、参加する臨床試験後に設定されるLTFUに参加することに同意する者であることを、適格基準で求めた。また、侵襲性のターゲット臓器(肝臓や骨髄)の生検サンプルのDNA解析は行われていなかった。これにより、ガイドラインの要求する①～④はカバーされていた。すなわち、このプロトコルで定義された被験者は、他の代替の治療法にアクセスできない進行性の致死性の疾患を患い、遺伝子編集治療製品のリスクを理解しインフォームドコンセントを示した上で、さらに、遺伝子編集治療のベネフィットだけではなく、リスクの情報を提供するための長期間のLTFUに合意した者のみがリクルートされる仕組みであった。臨床試験のプロトコルは、治験申請の際にFDAとEMAのそれぞれのレビューが入り、また、ス

ポンサー企業及び臨床試験施設、治験実施医師はこの内容の確実な実施が法的に求められる。このため、プロトコルに当局のガイドラインの要求を反映させることで、当局に対する合意形成を行うとともに、その履行を確実なものにしていると考えられる。また、この2つのプロトコルは、FDAやEMAのガイドラインの要求内容が、プロトコルの適格基準と非適格基準によって表現可能であること、またその要求を企業が実現できることを示す事例である。

ガイドライン制定以前の2014年にプロトコルが制定された古い臨床開発: SB-728-T/SB-728-mRTでは、既存のHIV感染症の治療法であるHAART療法で血中のウイルス数が抑えられている患者のみが被験者としてリクルート可能とされた。さらに、AIDSの症状を示す患者は除外基準に該当し、治験への参加が拒まれた。ガイドラインが整備される前に行われたSB-728-T/SB-728-mRTの試験では、ガイドラインの整備後のCTX001とNTLA-2001とは異なり、必ずしも遺伝子編集治療製品の治験への参加に絶対的なメリットのある患者が被験者としてリクルートされたわけではなかった。

表4-6および図4-1には、米国における遺伝子編集治療製品のLTFUの試験の設定状況をまとめた。同一種類の遺伝子編集酵素が複数の疾患の治療に用いられる例がある。同一のZFNを用いた肝臓のアルブミンの遺伝子座への正常遺伝子の導入療法に関する3つの遺伝子治療製品、1型ムコ多糖症を対象としたIDUA遺伝子の導入を目指したSB-318(2017年開始、NCT02702115)、2型ムコ多糖症を対象としたIDA遺伝子導入のSB-914(2017年開始、NCT03041324)、血友病Bを対象として血液凝固第6因子の遺伝子導入のSB-FIX(2016年開始、NCT02695160)は、それぞれ異なった遺伝子を導入する遺伝子編集治療製品である。これら3つに対して、10年間の観察期間を設定したLTFU試験(NCT04628871)が1本設定された。また、同一のZFNをβサラセミアと鎌形赤血球症のそれぞれの治療に用いたST-400(NCT03432364、2018年開始)、BIVV003(NCT03653247、2019年開始)についても、この2つに対して、1つのLTFU(NCT05145062)が設定された。これはLTFU試験の狙いが、治療対象の違いや導入遺伝子の違いを超えて、遺伝子編集酵素に関する安全性に関するデータを集約することにあることを示唆する。

図4-1に米国における遺伝子編集治療製品の臨床試験の開始時期とLTFU試験の開始時期をプロットした。2018年のFDAによるLTFUのドラフトガイダンス、2020

年の LTFU のガイダンスの発行に前後して、LTFU の設定と開始が促進された。米国では 26 製品の遺伝子編集治療製品の治験が開始され、そのうち 16 製品ががん以外を対象疾患とした製品である。この 16 製品中の 12 製品にすでに LTFU が設定された。LTFU の試験は、安全性・有効性を確認する試験に対して、後付けで設定される例もあることから、今後、残りの 4 製品についても後で設定される可能性はある。一方で、がんを治療対象とする遺伝子編集治療製品では 10 製品中 1 製品でのみ LTFU の試験が設定された。この 1 試験は UCART19 に対するものであり、ガイドライン制定の 4 年前の 2016 年に設定された。LTFU は発がん性等を含む遅延性のリスクを検出するという特性上、がん治療に関しては必ずしもその設定が要求されていない可能性がある。

#### 4.4.2 遺伝子編集治療製品に採用されたモダリティと DDS 技術と安全性評価

遺伝子編集酵素の細胞導入に用いるモダリティと DDS が歴史的にどのように遺伝子編集製品に採用されて来たかを図 4-2、図 4-3 にまとめた。第 1 章(1.1.3 節)で示したように、OTE によるリスクは、遺伝子編集酵素の細胞内での存在時間が長ければ長いほど増大する。ex vivo での製品では OTE は移植細胞による血液がんのリスクを、in vivo での製品では OTE は現在の主なターゲットである肝臓や副次的にデリバリーされる脾臓などの臓器での発がん性のリスクを増大させる。図 4-2 に示す通り ex vivo に関しては、Sangamo による初期の SB-728-T では ZFN をコードする遺伝子を載せたプラスミド DNA を AAV5 でデリバリーをする方法が試みられた。同じ Sangamo によって 2014 年に試験が開始された SB728mR-T では、ZFN の mRNA をエレクトロポレーションでデリバリーする方法に変更された。また、それに続く各社の遺伝子編集酵素(TALEN ないし CRISPR-Cas9)の導入法としては、遺伝子編集酵素もしくはその mRNA をエレクトロポレーションによって導入する方法が利用されている。in vivo のプロジェクトに関しては、2018 年に臨床試験が開始した EDIT-101 はプラスミド DNA を搭載した AAV が用いられたが、2019 年の NTLA-2001 以降は、mRNA を搭載した LNP がデリバリー技術として用いられた。Ex vivo と in vivo の両方のどちらの治療法においても、遺伝子編集酵素の細胞導入のモダリティが、DNA から mRNA やタンパク質に置き換わってきている。OTE のリスク管理の観点で、遺伝子編集酵素による染色体 DNA の切断作用の時間が一過性となる mRNA やタンパク質のモダリティでの細胞導入が、遺伝子編集酵素が不必要に長期発現する DNA での細胞導入に比

較して有利になる<sup>19)</sup>。開発企業である Sangamo、Intellia、Cellestis はそれぞれ自社製品について、遺伝子編集酵素の長時間の暴露の危険性を指摘<sup>95) 96) 97)</sup>して、一過性発現のモダリティ技術を導入したとしている。

mRNA が臨床で使用できるようになったのは近年のことである。大きな課題は 2 つであり、(1)人工合成した mRNA は、細胞に導入しても異物と認識されて機能しないという問題、と(2) mRNA の DDS 技術であった。(1)は、人工合成した mRNA を細胞にトランスフェクションする際に、mRNA 分子が細胞の Toll like receptor 等に外来性の mRNA(ウイルス感染)として認識され、炎症反応を惹起して、該当細胞でのタンパク質合成が停止するという問題だった。この課題は mRNA 分子のシュードウリジン修飾や 5'末端のキャップ構造の修飾によって解決されたことによって、2005 年頃から mRNA が医薬品用途で利用可能になった<sup>98)</sup>。また、in vivo における LNP による核酸のデリバリーはその基盤材料である全身投与用の ionizable lipid の実用化<sup>94)</sup>によって 2018 年頃から利用可能になった<sup>98)</sup>。

図 4-2 と図 4-3 で示した通り、近年臨床試験が開始された遺伝子編集治療製品では、mRNA や LNP の技術確立後はこれが主に採用されている。ただし、核酸を内包した LNP に関しては、権利範囲の広い特許が米国で成立している<sup>99)</sup>。Ex vivo の場合は、一過性発現が期待できるモダリティとして、mRNA と遺伝子編集酵素(タンパク質あるいは RNP)が選択可能で、いずれも LNP を用いない DDS としてエレクトロポレーションが利用できる。しかし、In vivo の場合は、一過性発現を実現できる技術は、現時点では mRNA の LNP によるデリバリーの一択である。この知財権<sup>99)</sup>にアクセスできる目途が立っていない企業は、in vivo での一過性発現の遺伝子編集治療を実現するモダリティの採用が困難な可能性がある。

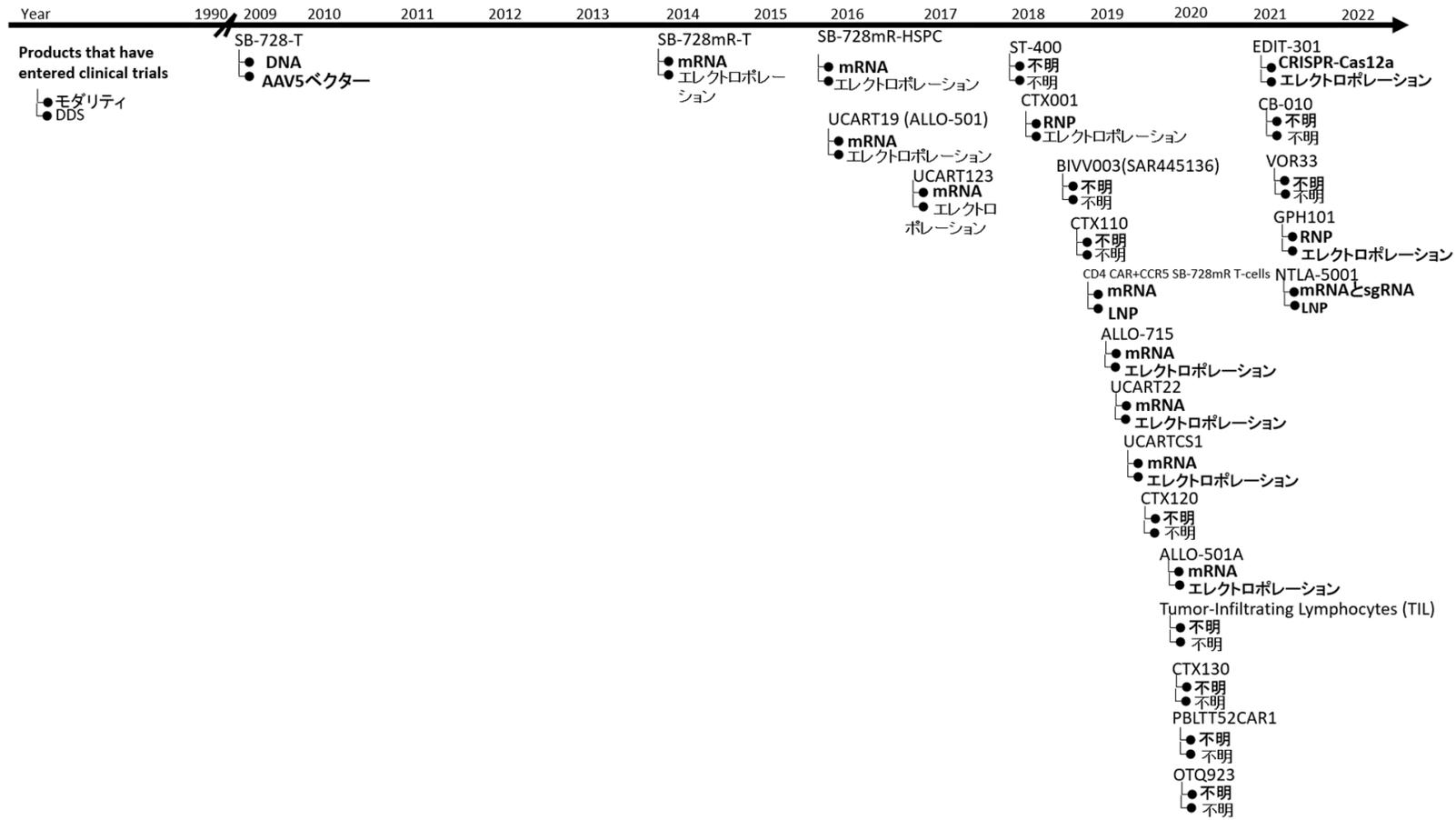


図 4-2 ex vivo の遺伝子編集治療製品に採用された遺伝子導入モダリティと DDS 技術 (著者作成)

遺伝子編集酵素の細胞導入に用いるモダリティと DDS が歴史的にどのように遺伝子編集製品に採用されて来たかをまとめた。ex vivo に関しては、Sangamo による初期の SB-728-T では ZFN をコードする遺伝子を載せたプラスミド DNA を AAV5 でデリバリーをする方法が試みられた。同じ Sangamo によって 2014 年に試験が開始された SB728mR-T では、ZFN の mRNA をエレクトロポレーションでデリバリーする方法に変更された。また、それに続く各社の遺伝子編集酵素(TALEN ないし CRISPR-Cas9)の導入は、遺伝子編集酵素もしくはその mRNA のエレクトロポレーションが利用されている。

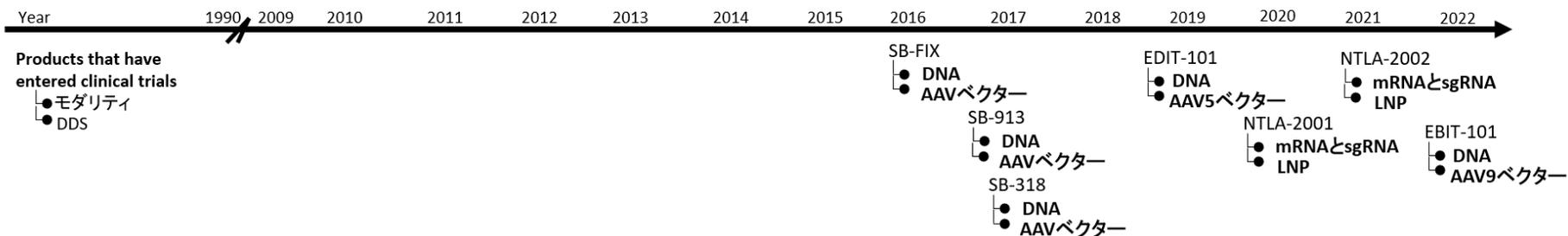


図 4-3 in vivo の遺伝子編集治療製品に採用された遺伝子導入モダリティと DDS 技術 (著者作成)

遺伝子編集酵素の細胞導入に用いるモダリティと DDS が、歴史的にどのように遺伝子編集製品に採用されて来たかをまとめた。in vivo のプロジェクトに関しては、2018 年に臨床試験が開始された EDIT-101 はプラスミド DNA を搭載した AAV が用いられたが、2019 年の NTLA - 2001 以降は、mRNA を搭載した LNP がデリバリー技術として用いられ始めた。

#### 4.5 本章の結論

FDA と EMA のガイドラインは、遺伝子治療の安全性評価を臨床試験で実施することを前提として、①被験者への十分なインフォームドコンセント、②既存の治療法に比較してリスク・ベネフィットが上回ることが期待されること、③長期的観察(LTFU)による確実な有害事象の検出、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないことを開発企業に求めた(第2章)。公開された遺伝子編集治療のプロトコル(製品名 CTX001 と NTLA-2001)を解析した結果、開発企業は、臨床プロトコルの被験者リクルートの適格基準と非適格基準によって上記の要求を実現していることが分かった。臨床試験のプロトコルでは、治験申請の際に FDA と EMA のそれぞれのレビューが入り、スポンサー企業及び臨床試験施設、治験実施医師はプロトコルの確実な実施が法的に求められる。プロトコルによって、当局との細部にわたる合意形成を行うとともに、ガイドラインの要求の履行を確実なものにしていると考えられる。

米国においては、2018年のFDAによるLTFUのドラフトガイダンス、2020年のLTFUのガイダンスの発行に前後して、LTFUの設定と開始が促進された。米国では26製品の遺伝子編集治療製品の治験が開始され、そのうち16製品ががん以外を対象疾患とした製品である。この16製品中の12製品にすでにLTFUが設定された。一方で、がんを治療対象とする遺伝子編集治療製品では10製品中1製品でのみLTFUの試験が設定された。LTFUは発がん性等を含む遅延性のリスクを検出するという特性上、がん治療に関しては必ずしもその設定が要求されていない可能性がある。

近年、臨床試験が開始された遺伝子編集治療製品においては、細胞導入モダリティとして、一過性発現によってOTEのリスクが低減され则认为られている mRNA や遺伝子編集酵素(タンパク質、RNP)が、開発企業に積極的に採用されていた。

## 第5章 日本における遺伝子編集治療製品開発の課題と開発推進のための提言

### 5.1 日本における遺伝子編集治療製品開発の課題

#### 5.1.1 日本での臨床開発状況

日米欧のそれぞれの国と地域において臨床試験を開始した遺伝子編集治療製品の数を図 5-1 にプロットした。米国での治験の数が最も多く、23 製品が臨床試験に入っている。欧州でも 6 製品の臨床試験が進められている。遺伝子編集によって移植片対宿主病に関連する遺伝子をノックダウンした他家 CAR-T の製品が最も多い。CAR-T はがん治療用の製品である。その他、HIV や C 型肝炎に関する感染症領域や、遺伝病の治療をターゲットとした *in vivo*、*ex vivo* の遺伝子編集治療製品の臨床開発が進められている。欧州においても他家 CAR-T に加えて、遺伝病の遺伝子編集治療製品の臨床試験が取り込まれている。がん以外の治療領域においては、OTE による発がん性のリスク評価及び管理が重要な課題となるが、米国と欧州で治験が開始されたがん領域以外の遺伝子編集治療製品には、非臨床試験でのリスク評価が難しく(第 1 章 1.1.4 節)、技術的な挑戦難易度の高い全身投与の遺伝子編集治療製品も含まれた。

図 5-2 に遺伝子編集技術を用いた製品の開発企業と治験実施機関の位置を示した。ここには、第 4 章で調査した遺伝子編集治療製品について技術開発企業を起点、臨床試験の実施施設(病院)を終点として位置関係をプロットした。治験実施施設名は Clinical trial.com から入手した。各施設の位置情報(経度・緯度)は Google map API で取得した。図の作成には Tableau を用いた。欧米では、国境を跨いだ遺伝子編集治療製品の臨床開発が、Intellia Therapeutics, Inc.、CRISPR Therapeutics Inc.、Collectis Inc を中心に進められていた。

一方で、日本においては、遺伝子編集治療製品の臨床試験は 1 製品に関するものにとどまった。該当の製品は、フランス企業(Collectis Inc.)が開発を進める他家 CAR-T(製品名 UCART-19)である。日本における遺伝子編集治療製品の臨床開発は、OTE によるリスク評価の難易度が比較的低いがん領域において、海外開発品の治験が 1 件のみ行われたにとどまる。自国での製品開発、及び他国製品の臨床試験の受け入れの両面で遺伝子編集治療製品の開発が活発化している米国、欧州に比べ(図 5-2)、日本での遺伝子編集治療製品の臨床開発は大きく遅れている。

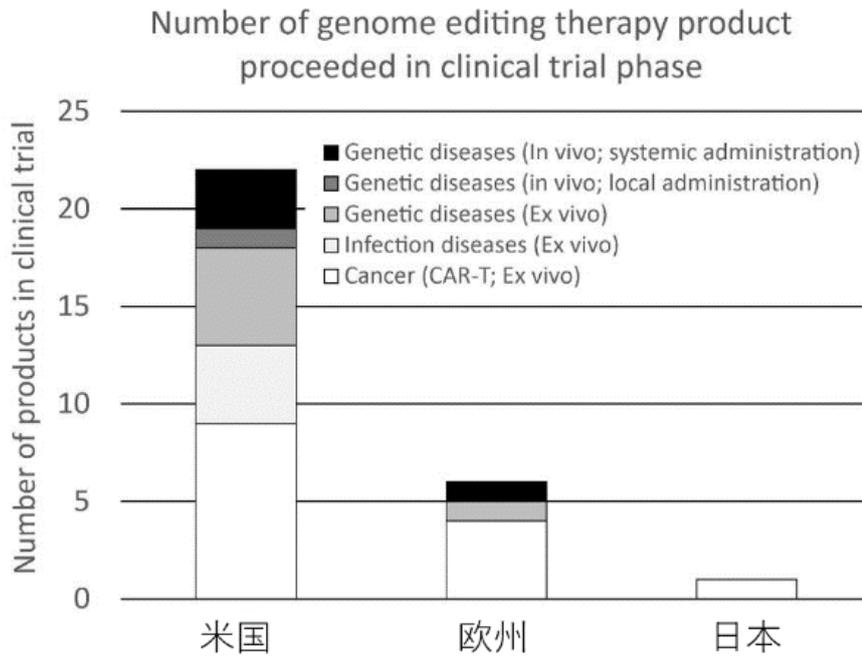


図 5-1 日米欧のいずれかで臨床試験が開始された遺伝子編集治療製品の数 (著者作成)

遺伝子編集治療の臨床試験(CRISPR-CAS、ZALEN、ZFN)を Clinical trial gov、Clinical Trial registry、臨床試験ポータルサイトで検索、国・地域別に積算した。遺伝子編集製品で臨床試験に進んだものは、米国で 22 件、EU が 6 件に対して日本は 1 件であった。

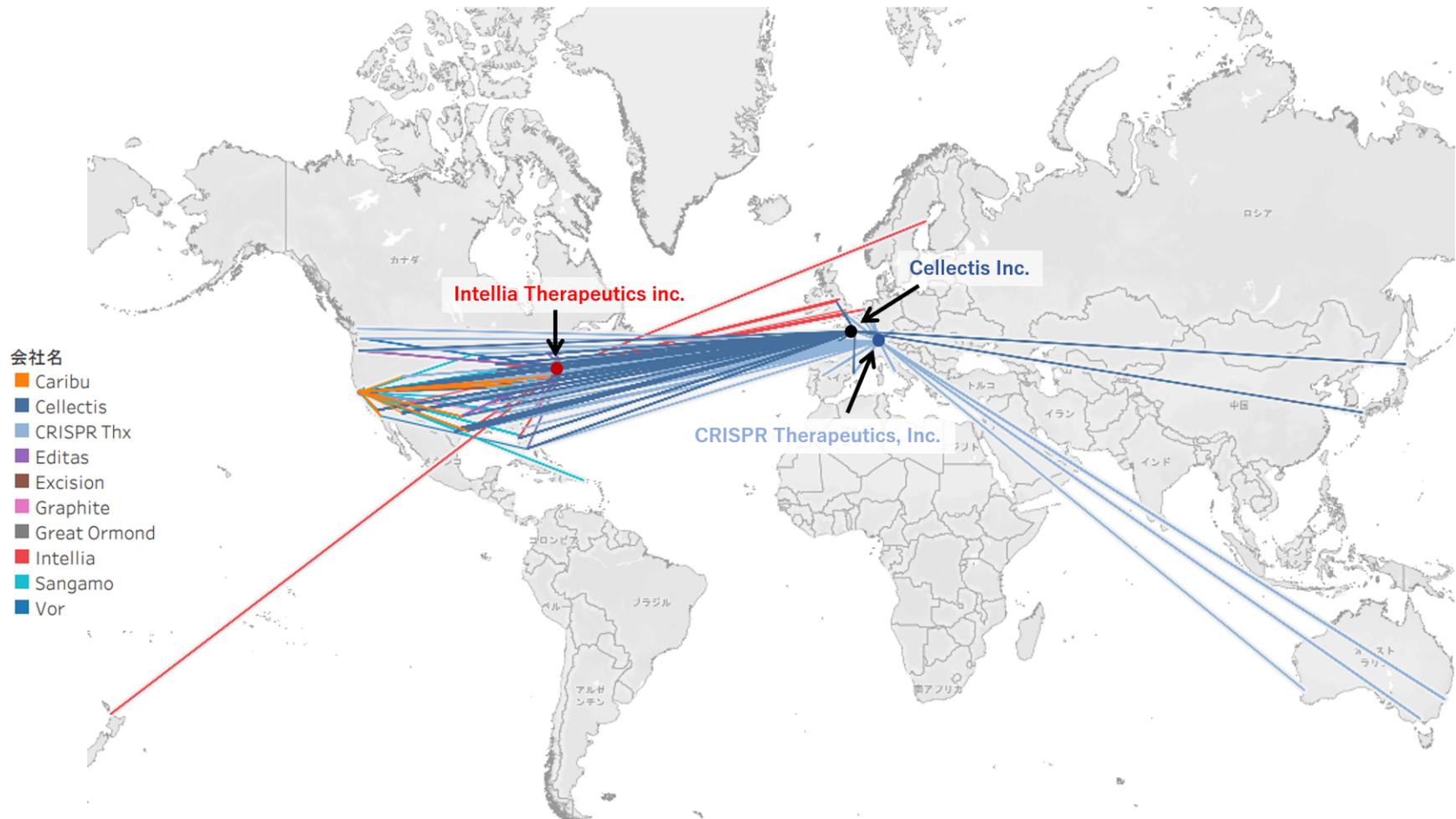


図 5-2 遺伝子編集技術を用いた製品の開発企業と治験実施機関の位置 (著者作成).

第 4 章で調査した遺伝子編集治療製品について技術開発企業を起点、臨床試験の実施施設(病院)を終点として位置関係をプロットした。治験実施施設名は Clinical trial.com から入手した。各施設の位置情報(経度・緯度)は Google map API で取得した。図の作成には Tableau を用いた。国境を跨いだ遺伝子編集治療製品の臨床開発が、Intellia Therapeutics, Inc.、CRISPR Therapeutics Inc.、Collectis Inc を中心に進められていた。

### 5.1.2 日本での治療対象患者数と開発ニーズ

前節 5.1.1 にて、欧米に比較して日本における遺伝子編集治療製品の臨床開発が進んでいない状況を整理した。この節では、日本において開発が進まない原因が日本における医療ニーズの不足にあるという仮説を検証する。本節では、日本における遺伝子編集治療の対象となる患者の患者数、すなわち開発ニーズを調べる。

遺伝子編集技術で治療法の開発が可能な遺伝病は、(1)単一もしくは少数の遺伝子が原因であること、(2)原因遺伝子と疾患の関係が十分に理解され、原因遺伝子のターゲットバリデーションが進んでいること、(3)原因遺伝子の操作(オンターゲット編集)で重篤な副作用が生じないこと、(4)OTE のリスクに対して治療メリットが上回ること、などの条件が必要である。このため、遺伝子編集治療製品の開発が進められる疾患ターゲットの数は限られる。

表 5-1 には、米国および欧州で臨床開発が取り組まれた疾患について、日本を含む各国での患者数をまとめた。第 4 章(4.3.1 節)で見たとおり、遺伝子編集治療製品のうち、現在臨床試験が進められているターゲットは、他家 CAR-T による血液がんの治療:Non-Hodgkin lymphoma、多発性骨髄腫、Leukemia、感染症である HIV、遺伝病である鎌形赤血球症、家族性アミロイドーシス、遺伝性血管浮腫、血友病 B、βサラセミア、1 型ムコ多糖症、2 型ムコ多糖症である。表には、日本、アメリカ、スペイン、イギリス、フランス、ドイツ、イタリアにおける各疾患の患者数を、がんは年間の死亡者数ベースで、HIV と各遺伝病については診断数ベースで患者数を記載した。また、各疾患領域で臨床試験が開始された遺伝子編集治療製品の数を記載した。表中の各項目の上段が患者数、下段が遺伝子編集治療製品の数である。民族的な遺伝背景が異なるため、各国での遺伝病の患者数に大きな違いがある。青文字で、1,000 人以上の患者がいる疾患で遺伝子編集治療製品の開発が取り組まれているもの、赤文字で 1,000 人以上の患者がいるが遺伝子編集治療製品の開発が進められていない疾患、黒文字で患者数が 1,000 人以下の疾患を示した。家族性アミロイドーシスと血友病 B は日本での患者数が多くニーズがあるが、海外の遺伝子編集治療製品の日本への導入のための臨床開発は行われていない。

米国を中心に多くの製品開発が行われている他家 CAR-T 製品についても、日本での開発は限定的である。

表 5-1 遺伝子編集治療製品の開発対象となる疾患と各国における患者数 (著者作成) IRAC<sup>100)</sup>、Global Data<sup>101)</sup>、厚労省調査<sup>102)</sup>より

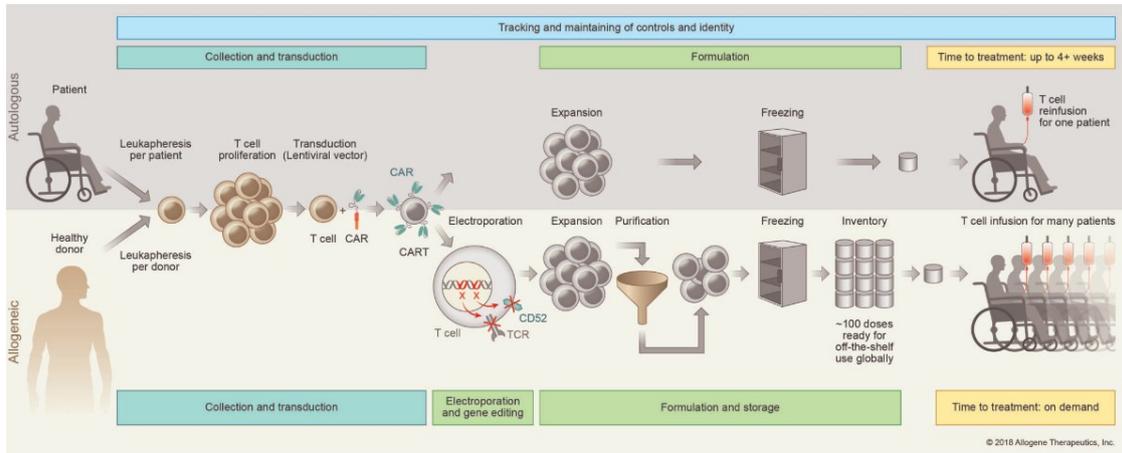
血液がん IARC	Japan	United States	Spain	United Kingdom	France	Germany	Italy	
Non-Hodgkin lymphoma (C82-85,C96)	6810	11512	1504	2082	2578	3634	2680	死亡者数/年
	0	2	0	0	0	0	0	開発品目数
多発性骨髄腫 C90	2205	7016	1030	1736	1662	2355	1757	死亡者数/年
	0	3	1	0	0	0	0	開発品目数
Leukaemia (C91-95)	5398	13270	1941	2752	3215	4542	3406	死亡者数/ソース
	1	6	2	3	1	1	0	開発品目数
感染症 Global Data								
HIV	939	43030	3865	3568	6168	3042	3162	患者数/診断ベース/
	0	2	0	0	0	0	0	開発品目数
遺伝病 Global Data								
Sickel Cell Disease	0	294255	1443	43275	72692	8172	5533	患者数/診断ベース/
	0	4	0	1	0	1	2	開発品目数
herodofamilialamyloidosis	2260	4882	40	52	54	64	50	患者数/診断ベース/
	0	0	0	1	0	0	0	開発品目数
hereditary angioedema	51	4399	545	865	892	1054	961	患者数/診断ベース/
	0	0	0	1	0	0	0	開発品目数
hemophilia-B	1201	4072	533	1590	1548	643	959	患者数/診断ベース/
	0	1	0	0	0	0	0	開発品目数
Thalassemia	80	1359	75	1793	1152	22479	2154	患者数/診断ベース/
	0	3	0	1	0	1	1	開発品目数
MPSI	23	162	70	93	104	58	139	患者数/診断ベース/
	0	1	0	0	0	0	0	開発品目数
MPSII	161	156	50	68	70	80	60	患者数/診断ベース/
	0	1	0	0	0	0	0	開発品目数

### 5.1.3 医療経済におけるニーズ

この節では、遺伝子編集技術による CAR-T 治療の費用の削減効果について述べる。CAR-T は、患者から採取した T 細胞にキメラ抗原受容体を導入した遺伝子治療製品である。移植片対宿主病の制約があるため、CAR-T 細胞は、患者の自己 T 細胞をもとに製造される。このため、がん患者から個別に採取した T 細胞に遺伝子操作を施し、GMP 施設で培養増殖するプロセスを必要とする(図 5-3<sup>103)</sup>)。個別化製造のため、CAR-T の製造コストは高く、これが原因で薬価が高額となる(日本で承認のあるキムリア点滴静注は 2021 年 7 月時点で 3,364 万円<sup>104)</sup>)。

移植片対宿主病の制約を解消するために、免疫拒絶の反応をつかさどる TCR 等の遺伝子をロックダウンした他家 CAR-T の遺伝子編集技術による開発が進められている。他家 CAR-T は、健常人のボランティアから採取した血液細胞をもとに 50~100 人の患者分の CAR-T を一度に大量製造できる。このため、自家(Autologous)に比較して、他家(Allogenic)の CAR-T の製造コストは\$95,780 から\$4,460 と、約 20 分の 1 に低減できると推算されている(図 5-4<sup>105)</sup>)。

CAR-T 療法の高額な医療費の削減が期待できる遺伝子編集技術を利用した他家 CAR-T の臨床開発は、高齢化によって医療費の増大による財政懸念が深刻化する日本において、一刻も早く導入を進めるべき医療経済上の大きなニーズが存在すると考えられる。



文献 103) より引用

図 5-3 CAR-T の製造プロセス

上段は従来の自家 CAR-T、下段は遺伝子編集技術を用いた他家 CAR-T の製造プロセス。自家 CAR-T は、患者由来の血液細胞から都度製造を行う個別化医療である。他家 CAR-T は、健康人のボランティアから採取した血液細胞をもとに 50~100 人の患者分の CAR-T を一度に大量製造できる。

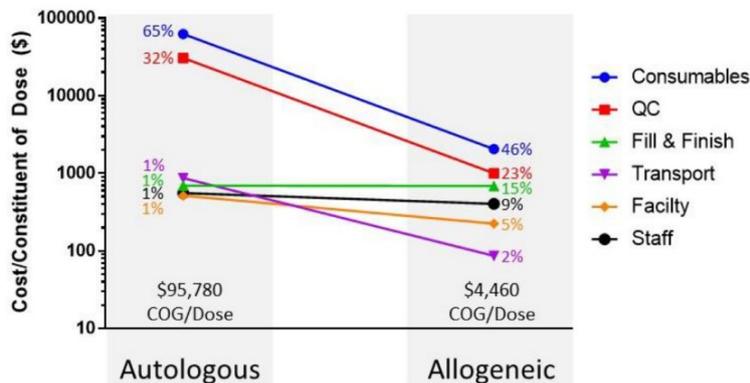


Figure 3. COGs between autologous and allogeneic CAR-T cell manufacturing processes. The process modelled used an 8- (auto) and 10- (allo) day manufacturing process with an identical facility structure and QC panel. Staffing levels were similar but additional operators were present for the autologous process. Percentages shown as portion of total production COGs.

文献 105)より引用

図 5-4 自家と他家の CAR-T の製造費用の比較

自家(Autologous)と比較して、他家(Allogenic)の CAR-T の製造コストは\$95,780 から\$4,460 と、約 20 分の 1 に低減できると推算されている。

## 5.1.4 企業の立地要因と特許障壁について

### 遺伝子編集治療の開発拠点の立地

第3章(3.3.1節)で整理した遺伝子編集治療の臨床開発に取り組む企業について、その所在地を表5-2に記載した。遺伝子編集治療の臨床開発に進んだ企業の本社の所在地は、米国、スイス、フランスの3か国である。これら企業は日本に拠点を持っておらず、これは障壁になりうる。

しかし、図5-2で見たように、アメリカ企業の Intellia Therapeutics Inc.が自社拠点を持たないニュージーランド、ノルウェー、イギリスで遺伝子編集治療製品の治験を開始していること、スイス企業である CRISPR Therapeutics, Inc.が同様に自社拠点を持たないオーストラリアで治験を開始していることを鑑みると、自社拠点を持たないことが当地での臨床試験の開始の致命的な障壁にはならないと考えられる。

表 5-2 遺伝子編集治療の臨床試験に取り組む企業の所在地 (著者作成)

開発者	拠点	拠点所在地	
Collectis社	本社	フランス	8 rue de la Croix Jarry 75013 Paris
	支社	アメリカ	430 East 29th Street, New York, NY 10016
	研究所	アメリカ	2500 Sumner Boulevard, Raleigh, NC 27616
CRISPR thx社	本社	スイス	Baarerstrasse 14, ZUG V8 CH-6300 Switzerland
	研究所1	アメリカ	105 West First Street, South Boston, MA 0212
	研究所2	アメリカ	455 Mission Bay Boulevard South, San Francisco, CA 94158
Editas medicin社	本社・研究所	アメリカ	11 Hurley Street, Cambridge, MA 02141
	製造拠点	アメリカ	4909 Nautilus Court North, Suite 208/211, Boulder, CO 80301
Intellia thx社	本社	アメリカ	40 Erie St, Cambridge, MA 02139
Intima Bioscience, Inc.	本社	アメリカ	3 Columbus Circle, New York, NY 10019, USA
	研究所	イギリス	Building 250, Babraham Research Campus, Cambridge, CB22 3AT, United Kingdom
Caribou Biosciences, Inc.	本社	アメリカ	2929 7th Street, Suite 105, Berkeley, CA 94710
Graphite Bio, Inc.	本社	アメリカ	201 Haskins Way, Suite 210, South San Francisco, CA 94080
Excision BioTherapeutics	本社	アメリカ	499 Jackson Street, San Francisco, CA 94111
Vor Biopharma	本社	アメリカ	100 Cambridgepark Dr, Suite 101, Cambridge, MA 02140
	本社	アメリカ	7000 Marina Blvd, Brisbane, CA 94005
Sangamo Thx社	製造拠点	フランス	Allée de la Nertière, 06560 Valbonne, France
	研究所	アメリカ	501 Canal Blvd, Richmond, CA 94804
	拠点	イギリス	Carrick House, Lypiatt Road, Cheltenham, Gloucestershire, GL50 2QJ, United Kingdom

## 特許係争による開発障壁

日本での遺伝子編集治療の臨床開発が進まない原因として、特許に関する問題が考えられるかを本節で考察する。

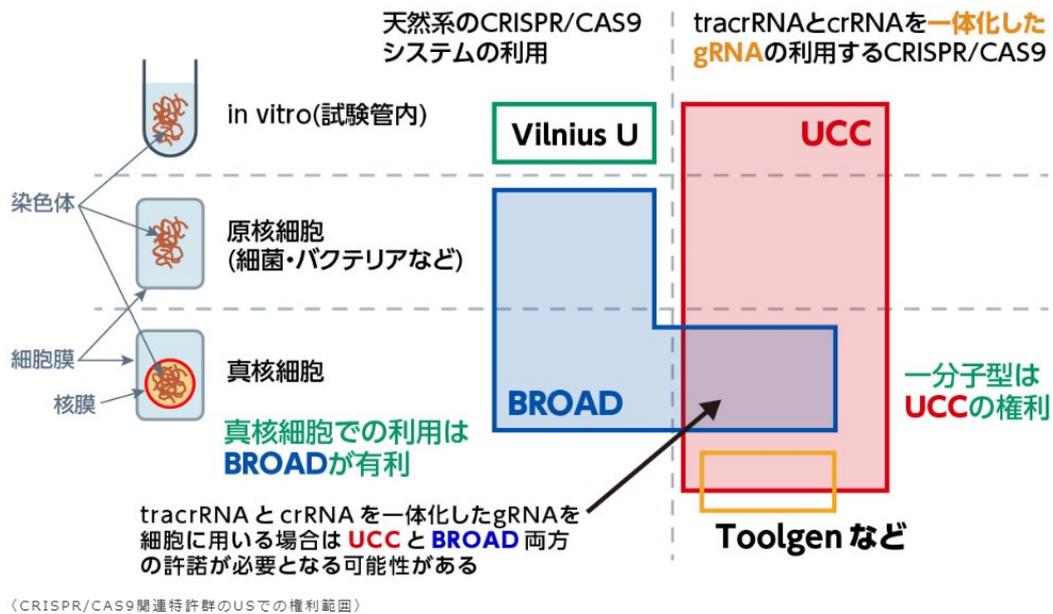
表 5-3 に主な遺伝子編集酵素の治療用途における知財権の状況を整理した。

CRISPR-Cas9 は、有名な CRISPR-Cas9 の特許係争が MIT・ハーバード大の Broad 研とカリフォルニア大学(UCC)の間で争われている。米国では、真核生物に対する CRISPR-Cas9 の応用をクレームした Broad 研の特許と、真核生物において sgRNA の使用をクレームする UCC の特許の両方が成立した(図 5-5<sup>106</sup>)。ヒトでの疾患応用には、sgRNA と CRISPR-Cas9 の両方を真核生物細胞上で使用する必要があるため、商用化の折には、対立する Broad 研と UCC の両陣営からの特許許諾を得る必要がある。現在までに Broad 研と UCC の両方から特許の許諾を得た医療系企業はないため(図 5-6<sup>107</sup>)、将来の上市場の折には大きな困難が生じると予想される。

一方、日本では知財法体系が異なることから、Broad 研の特許は成立せず、UCC の特許のみが成立した<sup>106</sup>)。日本では、すでに UCC の特許の許諾を得ている企業(CRISPR Therapeutics, Inc.や Intellia Therapeutics Inc.)は自社単独の意思で商用化が可能である。その他の遺伝子編集酵素に関しても日本では大きな係争はなく、特許関連の実施環境は整理されている(表 5-3)。特許上は、米国と比較して日本は、遺伝子編集治療製品の開発が行いやすい環境が整備されている。

表 5-3 主な遺伝子編集酵素の知財権(治療用途)の状況 (著者作成)

	CRISPR Cas9	CRISPR Cas12(Cpf1)	CRISPR Cas3	TALNEN	ZFN
開発企業	Crispr Therapeutics AG(瑞) Intellia Therapeutics(米) Editas Medicine Inc.(米) 他6社	Editas Medicine Inc.(米)	C4U(日本)→大日本住友	Collectis S.A(仏)	Sangamo Therapeutics, Inc.(米)
特許権の所有	米国: Broad研, UCCの双方の特許が有効.商用化には両社の許諾が必要 EU: UCCの特許が成立 日本: UCCの特許が成立	Editas Medicineが, 日本を含む各国での基本特許を取得	C4Uが日本を含む各国での基本特許を取得	Collectis S.Aが日本を含む各国での関連特許の収集に成功	Sangamoが日本を含む各国での関連特許の収集に成功
実施への障壁	・日本では, UCCから特許の許諾を受けているCrispr-Therapeutics社, Intellia社の自由意志で実施できる. ・米国では, Broad研とUCCの特許が独立に権利化, 係争中	日本を含む各国について, Editas社の自由意志で実施できる.	日本を含む各国で, C4U社の自由意志で実施できる.	日本を含む各国で, Collectisの自由意志で実施できる.	日本を含む各国で, Sangamo社の自由意志で, 実施できる.



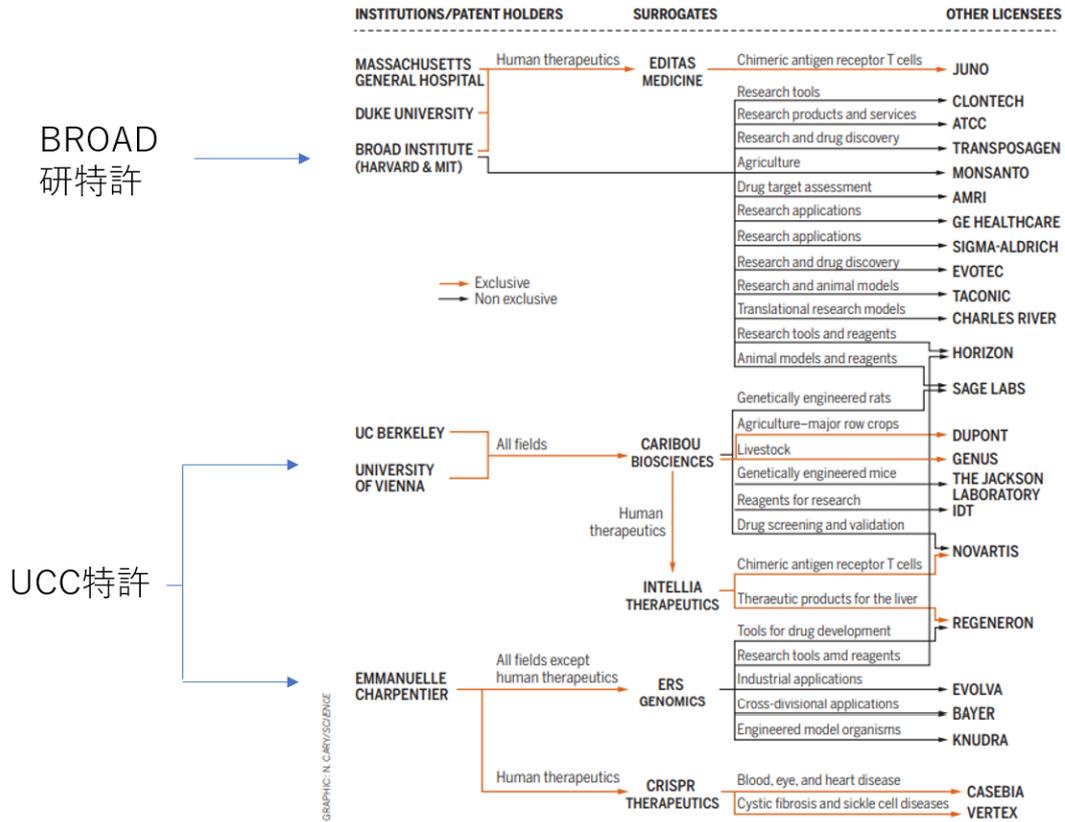
文献 106 より引用

図 5-5 CRISPR Cas9 に関する主要な特許：US での登録状況

米国では、真核生物に対する CRISPR-Cas9 の応用をクレームした Broad 研の特許と、真核生物において sgRNA の使用をクレームする UCC の特許の両方が成立した。ヒトでの疾患応用には、sgRNA と CRISPR-Cas9 の両方を真核生物細胞上で使用する必要があるため、商用化の折には、対立する Broad 研と UCC の両陣営からの特許許諾を得る必要がある。

### CRISPR-CAS9 licensing agreements

Exclusive licenses to surrogates for human therapeutics limit access to CRISPR as a platform technology.



文献 107 より引用

図 5-6 米国における CRISPR-Cas9 の特許に関する Broad 研と UCC からの許諾状況

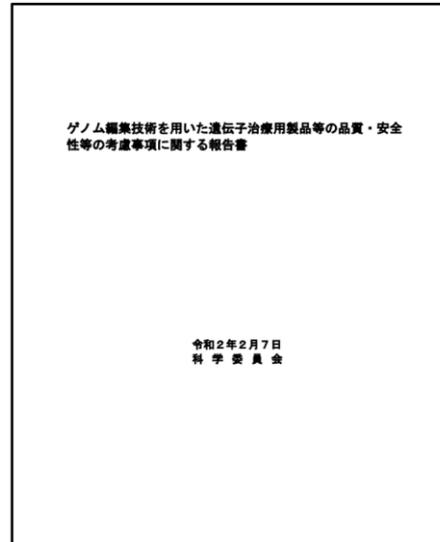
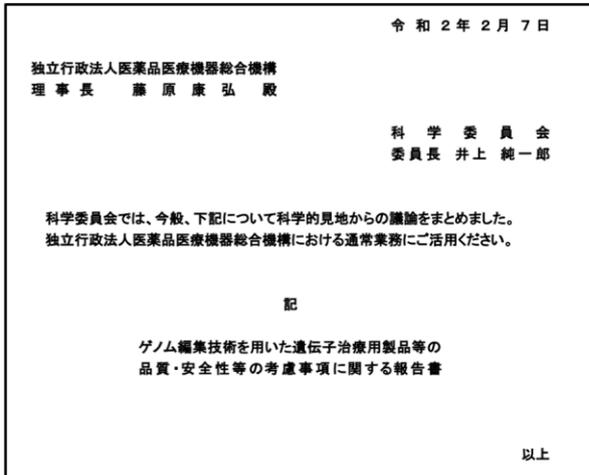
Broad 研と UCC は、CRISPR-Cas9 の特許をさまざまな会社へ許諾しているが Broad 研と UCC の両方から特許権の許諾を受けている遺伝子編集治療製品開発企業はない。

### 5.1.5 PMDA, AMED, NIHS での議論

本節では、日本における遺伝子編集治療の安全性に関するガイドライン制定の動きをレビューする。2022年12月現在、遺伝子編集治療の臨床試験にてリスク評価を行うガイドラインを制定する動きはない。

#### PMDA 科学委員会による議論

日本学術会議の提言「我が国の医学・医療領域におけるゲノム編集技術のあり方」(平成29年9月27日)によるサジェスト、「ゲノム編集治療製品の開発については、厚生労働省と独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)が、関連学会などの支援を得て、オフターゲット変異等のリスクを評価する体系を構築するなど、相談支援の具体的な内容を明らかにすべきである。」を受け、2018年7月のPMDA科学委員会において、ゲノム編集技術を応用した医薬品等のリスク評価の考え方について、専門部会を設置して整理していくことが決定された<sup>108)</sup>。その後、5回の専門部会を経て、2019年12月に報告書(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について)が議論の成果物として採択された<sup>109)</sup>。これは、PMDAの科学委員会が主導して科学委員会の考え方をまとめた白書である。そのカバーレターによると、PMDA理事長に宛てたPMDAの業務活用のための文書であった(図5-7)。FDAのガイドラインやEMAのガイドラインのように、産業界に向けたガイドではない。また文章の内容は遺伝子編集の論点整理にとどまり、具体的な非臨床試験や臨床試験のガイドラインを与えるものではなかった(表5-4)。



文献 109)より引用

図 5-7 『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について』のカバーレター(図左)と表紙(図右)

このカバーレターは、この文書は PMDA 理事長に宛てた PMDA の業務活用のための文書であるとしている。

表 5-4 科学委員会『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に関する報告書』の要旨 (著者作成)

章立て	要旨	ポイント
序論・定義		
遺伝子編集特有の課題	(1) 遺伝子改変細胞のがん化等のリスク ・オフターゲット作用のリスクが、特に懸念されるのが、細胞のがん化 ・染色体異常によるがん化のリスクについても検討する必要がある。	がん化のリスクを指摘
	(2) 生殖細胞における意図しない遺伝子改変リスク 次世代への遺伝的な影響を十分に検討する必要がある。	編集が後世に伝わるリスクを指摘
遺伝子編集技術の分類とその品質特性に関する課題	(1) 遺伝子編集ツールによる分類とその留意事項 ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, ゲノム切断を行わない遺伝子編集	遺伝子編集酵素のモダリティごとの論点整理
	(2) 遺伝子編集ツール及び遺伝子改変した細胞における留意事項 ウイルスベクター, プラスミドベクター, mRNA, タンパク質, ガイド RNA, 遺伝子編集ツールを用いて加工したヒト細胞加工製品	DDSの手法ごとの論点整理
	(3) 遺伝子編集の目的による分類 遺伝子破壊及び相同組換え, ゲノム切断を伴わない遺伝子改変	遺伝子編集のアウトプットごとの論点整理
安全性評価の考え方	(1) 遺伝子編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の共通事項 オフターゲット作用, ゲノム欠失・目的外配列の挿入, 染色体の転座, 逆位, p53 等のゲノム修復遺伝子の変異リスク, 標的細胞によるがん化リスクの違い, ゲノム編集酵素の免疫原性	安全性の評価の観点の論点整理
	(2) in vivo遺伝子編集	
治験において留意すべき事項 (長期フォローアップ等)	染色体組込み型ベクターを用いた従来の遺伝子治療用製品と同様のリスク評価, 有害事象を確認するフォローアップ期間を設定する必要がある[60](FDA LTF guideline).ゲノム編集においては相同組換えにより p53 等のゲノム修復遺伝子の変異リスクが高まることや, DSBによる染色体転座のリスクが指摘されていることから, これらに起因するin vivo 遺伝子編集では目的外の組織・細胞, 特に生殖細胞に導入されるリスクを十分に考慮する必要	(発がん性*が懸念されることから)治験では長期観察が必要 *左記の治験の項では発がん性という言葉は使われていない。
おわりに	本文書に示した考え方は適用可能な部分もあると思われるが, その開発動向に合わせ考え方を適宜見直していくことが必要	

## AMED と NIHS による議論

AMED では医薬品等規制調和・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」が、2016年～2018年の3か年の計画で実施された。この研究は国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)遺伝子医薬部の主導で成された。成果物として遺伝子編集製品に関するガイドラインの案「ゲノム編集技術を利用した *ex vivo* 遺伝子治療製品における目的外の遺伝子改変の安全性評価に関するガイドライン (案)」が作成され、*Translat Regulat Sci.* 2(3): 107–114, 2020 に概要が報告された<sup>110)</sup>。内容は、*ex vivo* 製品に関する非臨床試験での OTE の評価方法について、*in vitro* での OTE の探索と確定を行った後に OTE とがん関係遺伝子との関連からリスクアセスメントを行うという提案である。3章 3.3.3 節の図 3-2 に示した欧米の先行する遺伝子編集治療製品に共通して実施された OTE の評価スキームと同様の考え方が提示されていた。このガイドライン案は、*ex vivo* の製品の非臨床試験に議論が限定されている。また、非臨床試験で検出できない OTE のリスクに対して、臨床試験でどのようにリスク評価を行うべきかについて、どのようなガイドラインを作成すべきかという点には踏み込まれていなかった。

## 5.2 日本で遺伝子編集治療の開発が進まないことへの考察

5-1 に述べたように、日本では遺伝子編集治療の開発推進への阻害要因は見つからなかった。しかし、日本では欧米に比較して遅れているのが現実である。なぜ日本で遺伝子編集治療が進まないのかについて、3つの観点、第一にガイドライン、第二に国内外の企業・学会・医師・研究者などによる遺伝子編集治療製品の開発促進のための働きかけ、第三に、国民社会とのリスクコミュニケーションと開発のコンセンサスの取得、について考察した。

第一は、欧米のようながん化リスクの取り扱いの基準を示したガイドラインが存在しないという観点である。発がん性の可能性が否定できない製品の臨床開発の推進を試みる企業・研究者には、臨床試験における発がん性のリスク管理に関するガイドラインは間違いなく有用である。しかし、第2章で述べたように、従来の遺伝子治療に関するガイドラインは日本に存在するが、臨床試験におけるがん化リスクは触れられていない。ガイドラインで臨床試験におけるがん化リスクを想定してその取り扱いを記載することが日本では難しいということが考えられる。

日本の遺伝子治療に関するガイドラインにおいて臨床での発がん性に関する記載の不足は、遺伝子編集治療だけでなく、レンチウイルス等を用いた染色体挿入型の従来の遺伝子治療の開発にも影響を与えている可能性がある。

従来の遺伝子治療には、レンチウイルスやレトロウイルス等で染色体 DNA 上にランダムに正常遺伝子を挿入する方法と、AAV やプラスミド DNA で染色体外に正常遺伝子を留置する方法がある。前者の方法は発がん性の懸念があり、後者にはその懸念がないとされる<sup>111)</sup>。

2022 年時点、国内では、染色体挿入型のレンチウイルスあるいはレトロウイルスを用いた遺伝子治療製品として、キムリア等の自己 CAR-T 細胞製品の 5 品目が承認されている。加えて、腫瘍溶解性 HSV1 を用いたデリタクト、脊髄性筋萎縮症の治療薬であるゾルゲンスマ(AAV9 ベクター)、慢性動脈閉塞症の治療薬であるコラテジェン(プラスミド DNA ベクター)が上市されている<sup>112)</sup>。つまり、日本における染色体挿入型のベクターを用いた遺伝子治療製品の上市例は、がん治療領域に限られている。米国ではこれまでに 13 品目の遺伝子治療製品が承認された<sup>112)</sup>。この内 1 品目は、がん以外を対象としたレンチウイルスを用いた β サラセミアの治療薬であった。欧州においては 17 製品の遺伝子治

療製品の承認品目があり、この内4品目が染色体挿入型のウイルスベクターを用いたがん以外の疾患を対象とした製品であった<sup>112)</sup>。つまり、日本における染色体挿入型ウイルスベクターの利用はがん領域(CAR-T)に限られるが、欧米ではがん以外の領域にも利用されている。臨床試験中の製品については、日本には41件の臨床研究ないし臨床試験中の遺伝子治療製品があるが、海外上市品、国内開発品を含め、レトロウイルス等の染色体組み込み型ベクターを使用したがん治療以外の領域での企業治験は国内では行われていない<sup>113)</sup>。

新規技術による医療用製品に対するがん化リスクの評価については、iPS細胞との比較考察が有効と思われる。iPS細胞の発見は、2006年に京都大学の山中教授のグループによってもたらされた。体細胞の初期化のために導入が必要な4つの遺伝子が特定されたが、このうちの1つであるC-Mycががん関連遺伝子である。このため、iPS細胞を治療用途で患者へ移植することには、発がん性のリスクがあると指摘されてきた。遺伝子編集治療とリスクの状況は似ているが、国内におけるiPS細胞の移植による臨床開発は順調に数を伸ばし、2021年時点<sup>114)</sup>で10件の臨床研究あるいは臨床試験が開始された。これは全世界の臨床試験数19件の過半数を占め、第2位の米国の4件に対して大きく先行している。日本で進められている10件の内訳は、iPS細胞由来の心筋シート(他家)、iPS細胞由来のドーパミン産出細胞の前駆細胞のパーキンソン病患者への移植、脊損患者へのiPS細胞由来の神経前駆細胞の移植など、すべてががん以外の治療領域であった<sup>114)</sup>。つまり、iPS細胞の領域では、日本は世界に先駆けて臨床安全性のリスクが高い領域での臨床開発を開始することができている。

iPS細胞他に関しては、“ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について薬食発0907第2号”<sup>115)</sup>、“ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について薬食発0907第3号”<sup>116)</sup>の品質と安全性に関する2つのガイドラインが2012年に制定されている。これらのガイドラインは、第2章で分析した遺伝子治療に関する品質と安全性のガイドラインと同様に、臨床試験に関する記載量はわずか(約280英文ワード相当)であり、詳細なガイドは与えていない。しかし、iPS細胞に関しては、この当局のガイドラインを補佐する形で、一般社団法人日本再生医療学会によって、「ヒト幹細胞等加工再生医療製品の品質及び安全性等評価に共通の基本となる技術要件・基準・留意事項」(ミニマム・コンセンサス・パッケージ：MCP)<sup>117)</sup>が提示されている。このガイドライン

の制定目的は、当局によるガイドラインが多種多様な製品を想定してあらゆる可能性を網羅できるように作成されたものであるのに対して、過剰な試験やデータを求めないために、あらゆる製品に最低限必須・共通の要件や基準を示すこととされた。非臨床試験においては、技術的に可能で科学的合理性のある範囲で試験を実施することし、iPS 細胞の臨床応用上の懸念である発がん性については、非臨床試験での造腫瘍性試験について詳細な方法と判断基準のガイドを与えている。このガイドラインは、非臨床開発から臨床開発へのトランスレーショナルリサーチの段階で評価すべきことのミニマム・コンセンサスを示し、さらに、臨床試験に入れるべき製品のリスク・ベネフィットの考え方を示した。国内での臨床開発が進む iPS 細胞の分野では、このようなアカデミア・学会主導のガイドライン制定等の活動が、発がん性のリスクが懸念される iPS 細胞等の開発プランの作成のために役立っている可能性がある。

遺伝子編集治療における日本での安全性リスク・ベネフィットのコンセンサスの形成やガイドライン制定の方法は、iPS 細胞・再生医療に学ぶことができるかもしれない。

第二の観点とは、関連の企業・アカデミア・医師・研究者による遺伝子編集治療製品の開発促進のための働きかけが十分でないという可能性があるということである。遺伝子編集技術の CRISPR/Cas9、TALEN、ZFN の基本特許を有するステークホルダである海外企業は巨額の資本を集めて海外で開発を進めているが、日本ではそのような企業はほとんど存在しない。また、国内の iPS 細胞の開発における専門学会からの自発的なガイドライン作成やアカデミアを中心とした啓蒙活動などは非常に盛んであり、国や国民に大きな影響を与えていたことに比べると、遺伝子編集治療に関するそれらの動きは小さい。再生医療については、国による再生医療推進法の制定（2013 年）も進められた。国産発の新規技術や開発製品では、先駆け審査指定制度での認定や早期承認制度の活用なども有用であり、遺伝子編集治療製品についても、iPS 細胞のように国産の技術や製品が開発されることが、これらの推進に重要な役割を果たすことが考えられる。現在、日本発の遺伝子編集技術として CRISPR/Cas3 の研究<sup>118)</sup>が進められており、国産の Prime CAR-T<sup>119)</sup>の遺伝子編集で共同開発する計画がある<sup>120)</sup>。また Allogeneic CAR-T では遺伝子編集した iPS 細胞の利用が考えられている<sup>121)</sup>。この取り組みは、iPS 細胞の開発の勢いを遺伝子編集治療の分野に取り込む機運となるかもしれない。

本論文で分析した通り、FDA のガイドライン“Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products Guidance for Industry JANUARY 2020”は、遺伝子編集治療の臨床開発の推進において重要な役割を果たしている。これは、タイトルからもわかる通り産業界に向けたものである。作成の経緯が冒頭にまとめられているが、the American Society of Gene Therapy (ASGT)での公開セッション<sup>122)</sup>などで規制当局である FDA、先端の技術を開発するアカデミア、患者を抱える医師、開発の主導者(スポンサー)である企業のプロフェッショナルな当事者間による議論をベースに作成された。規制側及びユーザー側が新規技術による医療技術開発を促進するという一つの目的を共有して話し合う場が、規制側と利用者(企業・アカデミア)にどちらにとっても使いやすく、結果的に産業育成につながるバランスのよいガイドラインの作成には必要であるかもしれない。日本における遺伝子編集の規制に関する議論の主だったものは、5章で取り上げたPMDAの専門部会による遺伝子編集の論点整理であったが、この専門部会の名簿に企業からの参加者はなかった。日本においても、FDA ガイドラインの制定にならい、ガイドラインの制定による受益者である産官学が協調して遺伝子編集のガイドラインを制定する場が必要かもしれない。iPS 細胞の先例にならいアカデミアが中心をになって技術の可能性とリスクと公益性の議論をリードすることが国民社会の納得がえられやすいであろう。さらに、産業推進に有効な規制の確立には、企業側からもガイドラインやその他の制度設計の議論への主体的な参加が求められる。ただし、日本においては遺伝子編集治療製品に関する産業が未成熟なため、企業側から十分な議論の材料や論点が提供されない可能性もある。その場合は、日本で開発の可能性がある先行する外国企業を招致して、産業界の代表として議論に参加させるのも、迅速な産業振興の一つの手段であると考えられる。

第三に、国民社会への遺伝子編集技術に関する情報を提供し、その長所と短所を伝え、リスクコミュニケーションを取り、開発のコンセンサスを得ることが重要である。現状では、遺伝子編集治療製品に関する海外の情報が国内に広く伝えられておらず、また国内の専門家も少ないため、国民社会とのリスクコミュニケーションが十分になされていない事が考

えられる。そのため、関連する学会や専門家である医師や研究者が積極的に情報を広めて、社会の認識を高めていく必要があるだろう。

第一から第三には、いずれにも専門家人材が重要になる。実際のところ、(1)遺伝子編集技術による医薬品開発の基礎・応用に関する人材の集積が日本で十分になされていないこと、(2)欧米に比較して企業間・企業-アカデミア間の人材の流動性の低い日本では、企業が新たに遺伝子編集治療分野のような新規分野に参画を試みても必要な人材を迅速に揃えるのが困難であること、(3)企業は短期的な利益獲得が責務であるため、国内の既存企業は人材獲得が容易な海外でのラボ設立<sup>123)</sup>や海外ベンチャーとの共同研究・委託研究<sup>124)</sup>により、遺伝子編集治療のような新規技術研究及び開発の拠点を国外に移し始めていること、(4) 海外の先行企業にとって日本での開発のハードルが高く、日本への技術導入や拠点確立の動きが緩慢であること、などのファクターが存在するため、遺伝子編集技術に関わる人材の確保と育成も、国内での開発の推進には重要な観点である。

### 5.3 日本での開発推進のための提言

5.1 においては、日本における開発の障害となっているものがないことがわかった。5.2 において、日本の遺伝子編集の開発が積極的に進んでいない原因について考察した。それらを踏まえて、日本における遺伝子編集治療製品の開発推進のための提言を本節で行う。

製薬企業の利益の源泉は、言うまでもなく特許にある。長期間の開発期間を短縮して、上市から特許満了までの期間を可能な限り長くとるのが企業の主題になっている。新規機序による医薬品開発では、ヒト Proof of Concept(POC)の獲得の成否に大きなチャレンジがあり、有望な候補品を残して育て、望みの少ないプロジェクトをいち早く切り捨てるための First in Human(FIH)試験での POC の獲得が投資判断上の重要なマイルストーンとなる。このような観点から、新薬開発に取り組む企業は、迅速な FIH 試験の開始を目指す<sup>125)</sup>。

製薬企業による医薬品開発はグローバル化が進んできた。各国に存在する治験受託 CRO や医薬品物流 CMO を利用すれば、治験実施国に支社を設けなくとも臨床試験を実施することが容易にできる。また、ICH や GCP 等の国際スタンダードの整備も、各企業のグローバルでの治験の推進を容易にしている。このような背景のもと、製薬企業では日系、外資を問わず、自社製品の臨床試験の実施国を商業的な市場の大きさだけではなく、迅速かつ高品質の臨床試験が可能な国であるかを基準にして選ぶようになってきた<sup>126)</sup>。臨床試験と製品の開発をサポートするレギュレーションの整備状況は、臨床試験の速度を決める要因になる。このため、製薬企業は各国のレギュレーションの整備状況を、臨床試験の実施国の決定要因の一つとしている<sup>126)</sup>。

第2章、第3章、第4章で見てきた通り、欧米では発がん性のリスクの残存する遺伝子編集治療製品の臨床開発をガイドするガイドラインが制定され、これが非臨床開発及び臨床開発を効果的にガイドしてきた。日本においては遺伝子編集をカバーするガイドラインは制定されておらず、また近隣領域をカバーする遺伝子治療のガイドライン(JP-Guideline(2019))においても、発がん性のリスクの臨床での管理方法のガイドを与えていない。日本においては、このようなガイドラインの未整備状態が開発企業の視点における開発リスクとなり、日本での開発が進まない要因の一つとなっている可能性がある。先進の治療法をいち早く必要とする患者に届ける国民の福祉、自家 CAR-T 治療における高額な医療費という医療経済上の要請、先進の医薬品開発における日本国の国際競争力の向上の観点から、この課題に国家として取り組む必要があると考える。

5.1.5 節で整理した通り、日本における遺伝子編集治療の安全性に関するガイドラインの制定の議論は、2019年までの論点整理にとどまっている。日本国においても、遺伝子編集治療製品について、企業が製品のリスクに対して責任をもって開発を進められるように、政府が主導してガイドラインの制定を急ぐべきである。

以上により、日本における遺伝子編集治療の安全性に関するガイドラインの制定を提言する

制定するガイドラインでは、下記の要素を含む。

・これまで治療法がなかった疾患に対する治療法を政府として国民に対して提供する

遺伝子編集治療はこれまでの技術で実現できなかった染色体 DNA の精密な操作が行えるため、これまでに治療法がなかった重篤な疾患に対して新たな治療手段を提供できる可能性がある。ただし、染色体 DNA の操作の精度は 100%ではないので発がん性を含む有害事象を生じるリスクがある。このリスクの大きさ(発がん性の確率)を動物実験で予測することは技術的にできないため、ヒト臨床試験での実績を積む必要がある。しかし、世界には発がんのリスクよりも高いリスクの疾患を抱えている患者が存在する。その方々に対する医療手段の提供を政府として進める。ゼロリスクの開発は不可能であり、現在最大限に可能なリスク管理の方法、考え方をガイドラインとして提供する。これは、治験に参加する被験者のリスク・ベネフィットの確保、および開発企業の保護、それによる将来の患者への医療の提供、につながる。この理念をガイドラインで示す。国外で外国人を対象にした試験で安全性が確認された製品のみを導入するという選択肢もあるが、それでは日本への導入時期が遅れ、治療が間に合わなかった患者は亡くなる。日本で開発が行われる保証もない。日本国において、リスクの高い製品の臨床開発を政府の責任において実施できるようにすると、ガイドラインの冒頭でその理念を説明する。

・リスクのある開発に取り組む企業を保護して、開発を日本に誘導する。

資本主義、自由競争での市場では、遺伝子編集治療製品の開発の事業上の成否は、製品の薬理効果と安全性の実力はもとより、開発に掛かる費用と期間が重要なファクターを占める。非臨床開発と臨床開発の期間と費用は、レギュレーションの要求によって制約される面が大きい。リスクに対して過剰な評価の要求を行うと、検討費用と期間が不必要に

増大する。非臨床及び臨床試験は、科学的に有意な情報が得られる範囲での検討に抑えられるガイドラインを作成する。科学的に有意な情報が得られない領域は、無知の知としてリスクを管理する。

非臨床試験では、第3章で示した State of the Art の方法で検出可能な OTE のリスク評価を要求項目とし、そのクライテリアは、「検出された OTE について、その染色体 DNA の位置と頻度の情報及び、既知の発がん性のメカニズムを鑑みて、該当の OTE による発がん性のリスクが小さいことを科学的に説明できること」とする。これは、第3章で示した先行各社が実施したリスク評価の方法が参考になる。臨床試験では、LTFU による CTCAE 基準等での安全性評価を行い、発がん等の重篤なイベントが起こった際に、製品との関連を調べることを要求することとする。

#### ・被験者の利益を最大限に確保する

被験者の最大限の保護を行う。製品の安全性の確保のために、State of the Art の方法での非臨床試験の実施(本論文の第3章)、OTE の発生頻度が原理的に低いと考えられる利用可能なモダリティと DDS 技術の採用(本論文の第4章)を求める。被験者のベネフィットを確保するために、他に治療法のない進行性の重篤な患者(本論文の第4章)に限定して遺伝子編集治療の試験の被験者とする(臨床試験の実績が積み上がり遺伝子編集治療の安全性が確立した後に、対象疾患を広く拡大する)。被験者にはリスク・ベネフィットに関して十分な説明を行う。リスクに暴露する被験者の数を不用意に増やさないために、ひとりひとりの被験者から有害事象に関する情報を確実に取れる試験計画とする。このためには遅延性の有害事象を確実にとらえるための LTFU が有効であるため、企業による実施を求める。この提言を現実化し、社会・国民に十分に浸透させるために、企業・学会・医師・研究者等の積極的な活動と努力が必要である。

現在、日本発の遺伝子編集技術・遺伝子導入技術が開発されており、iPS 細胞への利用も進められている。これらの国産の新技术や新薬剤の開発をきっかけとして、上記のような産官学連携が促進され、関係する医師・学会、患者・企業・有識者・国民等から遺伝子編集製品開発の要望が高まり、そのためのガイドライン制定に向けた活動が活発になることが期待される。

## 第6章 本研究の結論・限界・今後の展望

第1章では、遺伝子編集に関する遺伝子編集酵素、遺伝子導入モダリティ、DDS、OTEの評価技術の俯瞰を行い、本論文で中心的に議論すべき課題としてOTEに焦点を当てた。

まず、遺伝子編集治療の原理を述べ従来の遺伝子治療との差異を下記2点にまとめた。

「遺伝子治療」は、正常遺伝子をコードするDNAを細胞に導入することを特徴とする。

「遺伝子編集治療」は、細胞のDNAの特定部位を遺伝子編集酵素で2本鎖切断(DSB)することを特徴とする。

次に、遺伝子編集治療に関する遺伝子編集酵素の細胞導入のモダリティとDDSに関する技術を整理した。また、遺伝子編集酵素によるオフターゲットの遺伝子編集作用(OTE)の危険性をその評価技術の限界とあわせてまとめた。遺伝子編集治療には、これらの選択によってさまざまな安全性のリスクが存在する。ウイルスベクターを遺伝子編集酵素の導入のために採用する場合は、ウイルスベクターによるがん遺伝子の活性化や、ウイルスベクターの感染能の再獲得による持続感染の確立など、mRNAでの送達に関するリスクとしては、外来性mRNAの細胞導入に対する拒絶反応(TLRによる炎症反応)、LNPに対するインフュージョンリアクションなどがある。本章では、これらの課題を遺伝子治療の課題やmRNA-LNP医薬品の課題として、遺伝子編集とは別の領域で解決への取り組みが進められているものとした。その上で、遺伝子編集酵素によるOTEによるがん遺伝子の活性化/がん抑制遺伝子の不活化が、遺伝子編集治療に固有で新しい課題であること、また、OTEはシリアスな結果をもたらすが、実験的な検出が困難なリスクであることから、本論文では、遺伝子編集治療製品の安全性の担保の研究として、OTEを議論の中心に置くこととした。

第2章では、日米欧の規制当局が自国・域内でのこのようなリスクのある遺伝子編集治療製品の開発を支援するために、どのようなガイドを与えているかを明らかにすることを目的に、各規制当局が発行したガイドラインの比較分析を行った。各国のガイドラインの記載内容の棚卸による質的な比較に加えて、記載事項の量的な解析を補完的に実施することを試みた。遺伝子編集治療に関する日本、米国、欧州のガイドラインを比較した結果、品質、非臨床開発、臨床開発の各セクションの中で、臨床試験のガイダンスの発がん性のリスクに関する考え方に違いがあった。米国と欧州のガイドラインは、臨床試験に進む遺伝

子治療製品に非臨床試験では完全には否定できない発がん性のリスクの内在を認めていた。その上で、発がん性の残存リスクを臨床試験で検証することを認め、その考え方を示した。リスクを被験者に負わせる前提として、①被験者への十分なインフォームドコンセント、②既存の治療法に比較してリスク・ベネフィットが上回ることが期待されること、③長期的観察(LTFU)による確実な有害事象の検出、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないこと、を産業界向けのガイダンスによって開発企業に要求した。一方、日本のガイドラインは、臨床試験での発がん性のリスク管理に関する記載やガイドを提供しなかった。また、日本のガイドラインが、臨床の安全性評価に関して提供した情報は英文相当で 225 ワードと非常に限られた。本章では、最後に臨床安全性評価のガイドの有無は、OTE による発がん性のリスクを内在する遺伝子編集製品の臨床開発をどの国と地域で進めるかを定める開発企業の判断に影響を与える可能性がある」と指摘した。

第 2 章の研究の限界は、分析対象としたガイドラインが 4 つに限定されたことにある。医薬品の開発は多数の複合的なガイドライン群によって規制と助言がなされる。例えば ICH には 76 の正式化されたガイドラインが存在する。第 2 章では、2018 年以降に制改定が行われた日米欧の遺伝子治療の品質と安全性に関するガイドライン 4 つに限定した解析を行ったが、背後にある多数のガイドラインとの相補的な関係については十分な解析や考察がなされていない。また、ガイドラインに示されていない規制当局の考え方は、具体的な製品案件を前提とした当局との対面相談の際にもたらされる可能性があるが、本研究ではこの点についてもアプローチができていない。

第 3 章では、遺伝子編集治療製品の OTE の評価の限界に対して、先行する開発企業がどのような取り組みをしているのか調べ、異なる企業・製品で共通した評価スキームが存在していることを明らかにした。遺伝子編集によって生きた細胞の染色体 DNA に生じた OTE の分析には、発生頻度 0.1% 以下の OTE の染色体 DNA 上の位置と頻度を知ることができないという限界がある。わずか数個の細胞のゲノムの変異が個体に大きな影響を与える発がんの事象の可能性を考えると、この検出感度は不十分であり、これが遺伝子編集治療の臨床試験開始にあたってのハードルとなる。この課題に対して、各規制当局からは非臨床評価の方法やリスク評価のクライテリアは示されておらず、また、アカデミアにおいても、非臨床試験から臨床試験へのトランスレーショナルフェーズにおいて、検出可能および検出不可能な OTE の評価方法およびリスク評価の方法について、科学的なコンセ

ンサスを与える研究はこれまで報告されていなかった。第3章ではこれを明らかにすることができた。

本章では、米国における IND と欧州における CTA のクリアランスを取得して臨床試験に進んだ遺伝子編集治療製品に関するすべての公開情報を調査することで、トランスレーショナルフェーズにおける OTE のリスク評価のプロセスを明らかにした。結果、非臨床試験では、その時点で利用可能な State of the Art の解析手法とヒト臨床試験の実態に近いモデルを用いて OTE のプロファイルが取得され、関連する遺伝子の情報からリスクアセスメントが行われた。現行技術で検証ができない低頻度の OTE のリスク検証は非臨床試験のフェーズでは保留された状態で、臨床試験でのリスク評価に進んでいることがわかった。これは、FDA や EMA の遺伝子編集治療製品のガイドラインが示した、非臨床試験で検証できないリスクについては臨床試験にて確認することを認めるガイドに沿っていた。

遺伝子編集治療製品の臨床開発の歴史は浅く、研究の材料となる公開情報が少ないことが第3章の研究の限界となった。臨床試験に入った製品数は31品目に限られ、またそのフェーズのほとんどがフェーズ1/2と若く、フェーズ3が1品目のみであり、上市品はなかった。非臨床試験の情報は、論文やプレゼンテーションで報告された8本に限られた。またリスク評価議論に関する情報は、遺伝子編集治療製品の臨床試験のプロトコルから得たが、これも3本にとどまった。この限られた文献から今回見出された、異なる企業が異なる製品に対して共通して採用した OTE の評価スキームは、初期の臨床試験に入る際のトランスレーショナルリサーチには適応可能と考えられる。しかし、販売承認申請時、または市販後の安全性調査にどのような OTE の評価が求められるかは、今回の調査では明らかにできていない。今後、承認品が現れた際に公開される審査報告書を解析することで、この残課題を研究することができるだろう。また、本章で検討できた非臨床試験の情報は米国、欧州、オーストラリア等の外国で実施された臨床試験に関するものがほとんどであり、日本に関するものはがん治療1品目(UCAR-T19)であったという限界もある。今回示した外国の臨床試験で共通で用いられた遺伝子編集治療製品の OTE と発がんに関するリスク評価のスキームが、日本において、特にがん治療以外を目的とした遺伝子編集治療製品の治験申請において受け入れられるかどうかに関しては、本章の調査では考察に足る情報を得ることができなかった。

第4章では遺伝子編集治療製品の臨床試験の調査をおこなった。遺伝子編集治療製品の開発が進む欧米では、OTEの非臨床試験におけるリスク評価は現時点での最先端の方法を用いて実施し、それでも残存するリスクはLong Term Follow-Up(LTFU)を前提とした臨床試験でリスクを評価するという方針であった。第4章では、遺伝子編集治療製品の臨床試験の実態を調べ、第2章で調べた欧米の遺伝子治療のガイドラインが遺伝子編集治療製品の臨床試験をどのように効果的にコントロールしているかを考察した。FDAとEMAのガイドラインは、リスクの高い遺伝子治療の安全性評価の臨床試験の前提として、①被験者への十分なインフォームドコンセント、②既存の治療法に比較してリスク・ベネフィットが上回ることが期待されること、③長期的観察(LTFU)による確実な有害事象の検出、④被験者に過度な侵襲性のある評価を求めないことを開発企業に求めた。今回調査した遺伝子編集治療のプロトコル(製品名CTX001とNTLA-2001)においては、被験者リクルートの適格基準と非適格基準によって上記の要求を実現していることが分かった。臨床試験のプロトコルは、治験申請の際にFDAとEMAのそれぞれのレビューが行われ、また、スポンサー企業及び臨床試験施設、治験実施医師はこの内容の確実な実施が法的に求められる。開発企業は、ガイドラインの要求事項をプロトコルに反映することで、当局との細部にわたる合意形成を行うとともに、ガイドラインの要求の履行を確実なものにしていると考えられた。

近年、臨床試験が開始された遺伝子編集治療製品においては、細胞導入モダリティとして、遺伝子編集酵素の発現が一過性であるためにOTEのリスクが低いと期待されるmRNAや遺伝子編集酵素(タンパク質、RNP)が、開発企業に積極的に採用されていることを明らかにした。

第4章における研究の限界も、やはり解析可能な情報量の少なさにあった。3本という限られた数の臨床試験のプロトコルから、FDAとEMAのガイドラインの要求をプロトコルの記載によって臨床試験に反映させている状況を明らかにしたが、ベースとなった情報量は限定的である。今後、承認品の審査報告書が開示されれば、臨床試験における安全性評価のより詳細な内容や着目点、またその結果の解釈に関する情報が得られるであろう。また、第4章の解析では、日本で実施された臨床試験の例は含まれなかったため、本章の結果から日本の規制当局の考え方を考察することはできなかった。

第5章においては、日本における遺伝子編集治療製品の開発に影響を与える要因をまとめ、遺伝子編集治療製品の臨床試験でのリスク評価に対して、政府によるガイドラインの制定が必要であることを提言した。日本における遺伝子編集治療製品の開発は遅れている。自国の遺伝子編集治療製品の開発において臨床試験の候補品はなく、また外国製品の日本での開発はがん領域の開発が1製品のみである。海外で臨床開発が進められている製品の中には、日本においてもアンメットメディカルニーズがある製品がある。また、遺伝子編集技術を利用した他家 CAR-T は、CAR-T の高額な製造費用を 1/20 に削減するインパクトを持つため、医療費による財政圧迫の問題を抱える日本には、開発に対する医療経済上のニーズが存在する。

製薬企業による医薬品の開発はグローバル化が進んできた。各国に存在する治験受託 CRO や医薬品物流 CMO を利用することで、治験実施国に拠点を設けなくとも臨床試験を実施することが容易にできるようになってきた。製薬企業では日系、外資を問わず、自社製品の臨床試験の実施国を、商業的な市場の大きさだけでなく、迅速かつ高品質の臨床試験が可能な国であるかを基準にして選ぶようになってきた。製薬企業は、開発の成否と速度に対する大きな要因となる各国のレギュラトリーの整備状況を、臨床試験の実施国の決定要因の一つとしている。本論文で示した、日本における遺伝子編集治療の臨床開発のガイドラインの欠如が、日本における遺伝子編集治療製品の開発の阻害要因になっている可能性がある。レギュラトリーに関する明確な考え方を示さなければ、世界を舞台に先端医療技術の開発を行って開発国を自由に選ぶことができる製薬企業は、日本を開発国として選ばなくなるであろう。

先進の治療法をいち早く必要とする患者に届ける日本国民の福祉、自家 CAR-T 治療における高額な医療費という日本の医療経済上の要請、先進の医薬品開発における日本の国際競争力の向上の観点から、この課題には国家として取り組む必要があると著者は考える。

以上から、本論文では、日本国においても遺伝子編集治療製品について、企業が製品のリスクに対して責任をもって開発を進められるように、政府が主導してガイドラインの制定を急ぐべきであると提言し、第5章にガイドラインの要素を案として示した。

本論文の結言として『非臨床で検出できない OTE のリスクを内在した遺伝子編集治療製品の臨床試験を適切にガイドするガイドライン』の制定が重要であると提言する。このガイドラインの制定および国民の合意と浸透のためには、『発がん性が原理的に否定できない医薬品の開発では、実際に発がんが起こらないことをヒトで確かめる試験が必要である』ことを日本の社会が科学的に理解して了解することが重要となると考えられる。本研究成果がその大きな障壁を取り除く扶翼になることを切に期待する。

## 引用文献

- 1 Krnov FD, Miller JC, Lee Y-L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005; 435: 646–651.
- 2 Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e82.
- 3 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337: 816–821.
- 4 Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2021; 385: 493-502.
- 5 Rahimmanesh I, Boshtam M, Kouhpayeh S, et al. Gene Editing-Based Technologies for Beta-hemoglobinopathies Treatment. *Biology* 2022; 11: 862.
- 6 Sharma R, Anguela XM, Doyon Y, et al. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood* 2015; 126: 1777–1784.
- 7 Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016; 533: 420-424.
- 8 Beam Therapeutics. Beam Therapeutics Enrolls First Patient in BEACON Clinical Trial of BEAM-101 Base Editing Therapy Candidate for the Treatment of Sickle Cell Disease, <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/11/14/2554716/0/en/Beam-Therapeutics-Enrolls-First-Patient-in-BEACON-Clinical-Trial-of-BEAM-101-Base-Editing-Therapy-Candidate-for-the-Treatment-of-Sickle-Cell-Disease.html> (accessed Jan 7 2023).
- 9 Zhang XH, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther* 2019; 27: 735-746.
- 10 Zhang XH, Tee LY, Wang XG, et al. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015; 4: e264.
- 11 WareJoncas Z, Campbell JM, Martínez-Gálvez G, et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14: 663-677.
- 12 山本卓. ゲノム編集の基本原理と応用. 2018年、第2章
- 13 Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1982; 1: 841–845.
- 14 Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol* 2019; 14: 1084–1087.
- 15 Rodriguez-Pulido A, Aicart E, Llorca O, et al. Compaction Process of Calf Thymus DNA by Mixed Cationic–Zwitterionic Liposomes: A Physicochemical Study. *ACS Publications*, <https://doi.org/10.1021/jp7095828> (accessed Jan 7 2023).
- 16 小澤敬也編. 実験医学増刊. 2020、Vol.38、No.2、概論、第1章及び第5章
- 17 Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2021; 384: 252–260.
- 18 山本卓. ゲノム編集の基本原理と応用. 2018年、第3章

- 19 Taha EA, Lee J, Hotta A. Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: Trends and challenges. *J Control Release* 2022; 342: 345-361.
- 20 Cheng H, Zhang F, Ding Y. CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for Genome Editing in Therapeutic Applications. *Pharmaceutics* 2021; 13: 1649.
- 21 Van Haasteren J, Li J, Scheideler OJ, et al. The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 845–855.
- 22 Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 765–771.
- 23 FDA: Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products; Guidance for Industry.
- 24 Bao XR, Pan Y, Lee CM, et al. Tools for experimental and computational analyses of off-target editing by programmable nucleases. *Nat Protoc* 2021; 16: 10–26.
- 25 Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 808–816.
- 26 Kuscu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 677–683.
- 27 Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods* 2015; 12: 237–243.
- 28 Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 2017; 14: 607–614.
- 29 Cameron P, Fuller CK, Donohoue PD, et al. Mapping the genomic landscape of CRISPR–Cas9 cleavage. *Nat Methods* 2017; 14: 600–606.
- 30 Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 187–197.
- 31 Wienert B, Wyman SK, Yeh CD, et al. CRISPR off-target detection with DISCOVER-seq. *Nat Protoc* 2020; 15: 1775–1799.
- 32 Potapov V, Ong, JL. Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169774> (accessed Jan 7 2023).
- 33 Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014; 370: 901–910.
- 34 Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017; 9: eaaj2013.
- 35 Holmes MC, Reik A, Rebar EJ, et al. A Potential Therapy for Beta-Thalassemia (ST-400) and Sickle Cell Disease (BIVV003). *Blood* 2017; 130: 2066.
- 36 Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* 2013; 40: 463–471.
- 37 Ghosh S, Brown AM, Jenkins C, et al. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl Biosaf* 2020; 25: 7-18.

- 38 Szebeni J, Storm G, Ljubimova JY, et al. Applying lessons learned from nanomedicines to understand rare hypersensitivity reactions to mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines. *Nat. Nanotechnol* 2022; 17: 337–346.
- 39 PMDA: <https://www.pmda.go.jp/index.html> (accessed Jul 17 2022).
- 40 FDA: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry (2020). <https://www.fda.gov/media/113760/download> (accessed Jul 17 2022).
- 41 FDA: Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products. Guidance for Industry (2020). <https://www.fda.gov/media/113768/download> (accessed Jul 17 2022).
- 42 EMA: Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (2018). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 43 厚生労働省: 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(薬生機審発 0709 第 2 号 令和元年 7 月 9 日). <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/guideline01.pdf> (accessed Jul 17 2022).
- 44 医薬品、医療機器等の品質、有効性および安全性の確保等に関する法律 (平成 27 年法律第 50 号)
- 45 PMDA: <https://www.pmda.go.jp/files/000155974.pdf> (accessed Jan 13 2023).
- 46 FDA: Non-Penicillin BetaLactam Drugs; A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination Guidance for Industry DRAFT GUIDANCE (accessed Jan 13 2023).
- 47 PMDA: <https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0069.html> (accessed Jan 13 2023).
- 48 ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/> (accessed Jul 17 2022).
- 49 EU Clinical Trials Register – Update, <https://www.clinicaltrialsregister.eu/> (accessed Jul 17 2022).
- 50 臨床研究情報ポータルサイト, <https://rctportal.niph.go.jp/> (accessed Jul 17 2022).
- 51 Lekakis LJ, Locke FL, Tees M, et al. ALPHA2 Study: ALLO-501A Allogeneic CAR T in LBCL, Updated Results Continue to Show Encouraging Safety and Efficacy with Consolidation Dosing. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 649.
- 52 Mailankody S, Matous JV, Liedtke M, et al. Universal: An Allogeneic First-in-Human Study of the Anti-Bcma ALLO-715 and the Anti-CD52 ALLO-647 in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood* 2020; 136 (Supplement 1): 24–25.
- 53 Sugita M, Galetto R, Zong H, et al. Allogeneic TCR $\alpha\beta$  deficient CAR T-cells targeting CD123 in acute myeloid leukemia. *Nat Commun* 2022; 13: 2227.
- 54 ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04142619> (accessed Jul 17 2022).
- 55 Jain N, Roboz GJ, Konopleva M, et al. Preliminary Results of Balli-01: A Phase I Study of UCART22 (allogeneic engineered T-cells expressing anti-CD22 Chimeric Antigen Receptor) in Adult Patients with Relapsed or Refractory (R/R) CD22+ B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL), *Blood* 2020; 136, Supplement 1: 7-8.

56 Collectis Inc., <https://collectis.com/en> (accessed Jul 17 2022).

57 De Dreuzy E, Heath J, Zuris JA, et al. EDIT-301: An Experimental Autologous Cell Therapy Comprising Cas12a-RNP Modified mPB-CD34+ Cells for the Potential Treatment of SCD. *Blood* 2019; 134: 4636–4636.

58 Intellia Therapeutics Inc., <https://www.intelliatx.com/> (accessed Jul 17 2022).

59 Lattanzi A, Camarena J, Lahiri P, et al. Development of  $\beta$ -globin gene correction in human hematopoietic stem cells as a potential durable treatment for sickle cell disease. *Sci Transl Med* 2021; 13: eabf2444.

60 CRISPR Therapeutics, Inc., <http://www.crisprtx.com/> (accessed Jul 17 2022).

61 Dar H, Henderson D, Padalia Z, et al. Preclinical Development of CTX120, an Allogeneic CAR-T Cell Targeting Bcma. *Blood* 2018; 132: 1921.

62 Dequeant ML, Sagert J, Kalaitzidis D, et al. Abstract 1537: CD70 knockout: A novel approach to augment CAR-T cell function. *Cancer Res* 2021; 81: 1537.

63 Cossette D, Aiyer S, Kimball C, et al. Clinical-Scale Production and Characterization of Ntla-5001 - a Novel Approach to Manufacturing CRISPR/Cas9 Engineered T Cell Therapies. *Blood* 2021; 138: 3881.

64 Caribou Biosciences, Inc., Developing Sophisticated Allogeneic Cell Therapies, <https://www.cariboubio.com/> (accessed Jul 17 2022).

65 Vor Biopharma, <https://www.vorbio.com/> (accessed Jul 17 2022).

66 Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med* 2019; 25: 229–233.

67 Seitzer J. NTLA-2002: CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of KLKB1 to treat hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2021; 147: AB147.

68 *Excision BioTherapeutics*, <https://www.excision.bio> (accessed Jul 17 2022).

69 Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 839-847.

70 DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther - Methods Clin Dev*; 3. Epub ahead of print 1 January 2016. DOI: 10.1038/mtm.2016.67.

71 Harmatz P, Lau HA, Heldermon C, et al. EMPOWERS: A phase 1/2 clinical trial of SB-318 ZFN-mediated in vivo human genome editing for treatment of MPS I (Hurler syndrome). *Mol Genet Metab* 2019; 126: S68.

72 Muenzer J, Prada CE, Burton B, et al. CHAMPIONS: A phase 1/2 clinical trial with dose escalation of SB-913 ZFN-mediated in vivo human genome editing for treatment of MPS II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab* 2019; 126: S104.

73 Sangamo Therapeutics, Inc., Sangamo Announces Treatment Of First Patient In Phase 1/2 Clinical Trial Of In Vivo Genome Editing Therapy For Hemophilia B, <https://investor.sangamo.com/news-releases/news-release-details/sangamo-announces-treatment-first-patient-phase-1-2-clinical-0> (accessed Aug 10 2022).

74 Wechsler T, Meyer KE, Spratt SK, et al. ZFN-Mediated Gene Targeting at the Albumin Locus in Liver Results in Therapeutic Levels of Human FIX in Mice and Non-Human Primates. *Blood* 2015; 126: 200.

- 75 Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinforma Oxf Engl* 2014; 30: 1473–1475.
- 76 Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, et al. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3(12):e214.
- 77 ClinicalTrials.gov, protocol SB-728-1101 Amendment 9 Jan 30, 2014, [https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/52/NCT01543152/Prot\\_000.pdf](https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/52/NCT01543152/Prot_000.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 78 ClinicalTrials.gov, SB-728mR-1401 Amendment 2 Oct 10, 2014, [https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/65/NCT02225665/Prot\\_001.pdf](https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/65/NCT02225665/Prot_001.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 79 The New England Journal of Medicine, [https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2031054/suppl\\_file/nejmoa2031054\\_protocol.pdf](https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2031054/suppl_file/nejmoa2031054_protocol.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 80 The New England Journal of Medicine, [https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2107454/suppl\\_file/nejmoa2107454\\_protocol.pdf](https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2107454/suppl_file/nejmoa2107454_protocol.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 81 Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 2011; 29(9):816-823.
- 82 Kim D, Kim JS. DIG-seq: a genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. *Genome Res* 2018; 28(12):1894-1900.
- 83 Frock RL, Hu J, Meyers RM, et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol* 2015; 33(2):179-86.
- 84 山本卓. ゲノム編集の基本原理と応用. 2018年、第1章
- 85 Koyama M, Kuns RD, Olver SD, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2011; 18: 135-42.
- 86 Cullis PR, Hope MJ. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy* 2017; 25: 1467-1475.
- 87 Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol* 2019; 14: 1084–1087.
- 88 Sato Y, Kinami Y, Hashiba K, et al. Different kinetics for the hepatic uptake of lipid nanoparticles between the apolipoprotein E/low density lipoprotein receptor and the N-acetyl-d-galactosamine/asialoglycoprotein receptor pathway. *Journal of Controlled Release* 2020; 322: 217-226.
- 89 Chen S, Tam YYC, Lin PJC, et al. Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration. *Journal of Controlled Release* 2014; 196: 106-112.
- 90 CTX-001, Protocol Number: CTX001-1, [https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2031054/suppl\\_file/nejmoa2031054\\_protocol.pdf](https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2031054/suppl_file/nejmoa2031054_protocol.pdf) (accessed Jul 17 2022).
- 91 NTLA-2001, Protocol Number: ITL-2001-CL-001, [https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2107454/suppl\\_file/nejmoa2107454\\_protocol.pdf](https://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa2107454/suppl_file/nejmoa2107454_protocol.pdf) (accessed Jul 17 2022).

- 92 Cancer Therapy Evaluation Program, [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/ctc.htm](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/ctc.htm) (accessed Jul 17 2022).
- 93 Sharma A, Jagannath VA, Puri L. Hematopoietic stem cell transplantation for people with  $\beta$ -thalassemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2021; 4.
- 94 Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2018; 379: 11-21.
- 95 Conway A, Mendel M, Kim K, et al. Non-viral Delivery of Zinc Finger Nuclease mRNA Enables Highly Efficient In Vivo Genome Editing of Multiple Therapeutic Gene Targets. *Mol Ther*. 2019; 27: 866-877.
- 96 Lipid nanoparticles (LNPs) as a superior CRISPR/Cas9 delivery modality for highly efficient multiplex gene editing of T cells for adoptive cell therapy Aaron Prodeus, PhD European Society of Gene and Cell Therapy Annual Congress October 19, 2021
- 97 Collectis Inc., <https://collectis.com/en/research/pulseagile/>(accessed Jan 13 2023).
- 98 Dolgin, Elie. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*. 2021; 597.7876: 318-324.
- 99 パソナナレッジパートナー, <https://pasona-kp.co.jp/column/detail/10> (accessed Dec 24 2022).
- 100 International Agency for Research on Cancer, <https://www.iarc.who.int/> (accessed Oct 25 2022).
- 101 GlobalData, <https://www.globaldata.com/>.
- 102 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 総括研究報告書 [https://hospital.luke.ac.jp/about/approach/pdf/ra15/research\\_activities\\_15\\_1.pdf](https://hospital.luke.ac.jp/about/approach/pdf/ra15/research_activities_15_1.pdf) (accessed Feb 5 2022).
- 103 Allogene Therapeutics, <https://allogene.com/allocar-t/> (accessed Nov 25 2022).
- 104 グローバルヘルスコンサルティング・ジャパン, <https://gemmed.ghc-j.com/?p=26382> (accessed Nov 25 2022).
- 105 Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, et al. Levine, Chimeric antigen receptor-T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods, *Cytotherapy* 2019; 21: 224-233.
- 106 パソナナレッジパートナー, <https://pasona-kp.co.jp/column/detail/> (accessed Nov 30 2022).
- 107 Contreras JL, Sherkow JS. CRISPR, surrogate licensing, and scientific discovery. *Science* 2017; 355: 698-700.
- 108 PMDA, <https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/science-committee/0031.html#order> (accessed Nov 25 2022).
- 109 PMDA, <https://www.pmda.go.jp/files/000233744.pdf> (accessed Nov 25 2022).
- 110 Uchida E. Regulations and safety assessment of genome editing technologies for human gene therapy. *Translational and Regulatory Science* 2020; 2: 107-114.
- 111 Nyberg K, Carter BJ, Chen T, et al. Workshop on long-term follow-up of participants in human gene transfer research. *Molecular Therapy* 2004; 6: 976-980.
- 112 国立衛生食品研究所ウェブサイト, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section1-1.pdf> (accessed Jan 30 2023).

- 113 国立衛生食品研究所, <https://www.nih.go.jp/mtgt/pdf/section1-2.pdf> (accessed Jan 30 2023).
- 114 Kim JY, Nam Y, Rim YA, et al. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 2022; 18: 142–154.
- 115 PMDA, ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 2 号, <https://www.pmda.go.jp/files/000205400.pdf> (accessed Jan 30 2023).
- 116 PMDA, ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 3 号, <https://www.pmda.go.jp/files/000205401.pdf> (accessed Jan 30 2023).
- 117 早川, 青井, 梅澤, et al. 「ヒト幹細胞等加工再生医療製品の品質及び安全性等評価に共通の基本となる技術要件・基準・留意事項」 (ミニマム・コンセンサス・パッケージ : MCP) の策定とその活用について. *再生医療* 2020; 19: 409-448.
- 118 Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y, et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun* 2019; 10: 5302.
- 119 Adachi K, Kano Y, Nagai T, et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 346–351.
- 120 Noile-Immune Biotech Inc., [https://www.noile-immune.com/dcms\\_media/other/20200525\\_News\\_C4U\\_and\\_Noile\\_PR\\_JP.pdf](https://www.noile-immune.com/dcms_media/other/20200525_News_C4U_and_Noile_PR_JP.pdf) (accessed Jan 30 2023).
- 121 CiRA, <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/221213-010000.html> (accessed Jan 30 2023).
- 122 Nyberg K, Carter BJ, Chen T, et al. Workshop on long-term follow-up of participants in human gene transfer research. *Molecular Therapy* 2004; 6: 976-980.
- 123 Modalis Therapeutics Corporation, <https://www.modalistx.com/jp/company/history/> (accessed Jan 30 2023).
- 124 Astellas Pharma Inc., [https://www.astellas.com/jp/innovation/primary-focus-genetic-regulation\\_](https://www.astellas.com/jp/innovation/primary-focus-genetic-regulation_) (accessed Jan 30 2023).
- 125 Criffiths B. Pharmaceutical Outsourcing, Speed Quality and Cost Leveraging Australia to Expedite Clinical Development, <https://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/361330> (accessed Dec 20 2022).
- 126 Rickwood S, Pereira F, Gomez CA. IQVIA, IQVIA White Paper: Attracting Investment in Clinical Development How pharmaceutical companies make clinical development location decisions, and what healthcare policy makers can do to attract commercial clinical investment, <https://www.iqvia.com/library/white-papers/attracting-investment-in-clinical-development> (accessed Dec 24 2022).

## 謝辞

博士課程では、私の会社での業務やこれまでの経験とは関連のない分野において、新しく研究テーマを立ち上げ、原著論文を書き出版することができました。私はこの経験によって、人類の知識の縁を見極め新たな知見を加える(つまり原著論文を書く)ということができるようになりました。これは博士号取得者に求められる基本的な能力ですが、本専攻への入学前の私には十分ではありませんでした。科学産業界で国際的に活躍するため必要で重要なこの能力を獲得できたことを心より嬉しく思っております。これは指導教員の有賀先生の心より暖かい傾聴と見守りによる粘り強いご指導のおかげです。有賀先生より賜りました師恩に心より感謝を申し上げます。

研究指導や博士論文の草稿のご確認において具体的なご指摘をいただきました副査の武岡先生、田村先生に心より感謝をいたします。私なりに真剣に一所懸命に考え抜いたつもりでの博士論文案に、不足点があることを的確にご指摘をいただきましたことで、私の着目点の不足があることを強く理解させていただき、視野を広げていただくことができました。いただきました“気づき”は、今後の学究活動だけでなく、会社での業務においてもよりよい戦略やプランを作成する際にきっと役に立つものと考えております。

笠貫先生には、本論文での私の主張と日本におけるレギュラトリーの現状の関係について大所高所からの議論をいただき、今後、私が社会にたいして何ができるのかと自分に問い直す、**Eye Opening** となる大きなサジェスションと強い心構えをいただきました。感謝いたします。

本共同大学院を運営されている共同大学院の先生方、諸先輩方、学生の皆様に感謝いたします。社会人になって真剣に学び、切磋琢磨しながら自己研鑽をする場所は希少です。本専攻を設立し、「学びと学究の場」を維持・管理、発展させておられる皆様に強い感服の念と、私にこの場で学びと成長の機会を与えていただいたことに感謝をいたします。博士論文を作成するという目標を軸に、毎回の研究指導に真剣に準備をして挑戦して、その際に諸先生からいただいたご指摘、ご批判、ご助言を受け止める改善する。というサイクルを行うことで、毎回、思考の幅が広がり、考え軸が定まっていくのを感じました。皆様から頂きましたご経験と深い洞察からのご指導とご助言に心より感謝いたします。

この博士課程の期間は、海外転勤と職務変更が伴う職場異動が重なり、大変な労力が必要でしたが、無事に完成することができました。穏やかに支えてくれた家族と友人、同僚の皆さん、そしてこの機会に挑戦する蒙を開いてくれた上司、諸先輩方に感謝いたします。

将来、3人の子供たちがこの論文を手にとって読んだときに、それぞれの仕事や学究の励みや糧になってくれることを期待します。

令和5年2月5日

## 研究業績

○論文:Analysis of off-target effects and risk assessment leading from preclinical to clinical trials of gene-edited therapeutic products, *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, Naoki Yamada, Atsushi Aruga, 24 Nov. 2022. <https://doi.org/10.1007/s43441-022-00481-2>.

発表:遺伝子編集治療の品質と安全性に関する日米欧ガイドラインの比較. 第23回医療機器に関するレギュラトリーサイエンス研究会. 2022年2月19日. 山田 直樹, 有賀 淳.

発表:遺伝子編集治療製品の前臨床試験におけるオフターゲット作用の解析とリスクアセスメントの戦略. 第24回医療機器に関するレギュラトリーサイエンス研究会. 2022年8月20日. 山田 直樹, 有賀 淳.