

—総説—

特集：卵子学会トピックス 2018

# ヒト生殖細胞系列におけるゲノム編集治療：現状と課題

## Human germline genome editing therapy

三谷 幸之介

Kohnosuke Mitani

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子治療部門 〒350-1241 日高市

Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University, 1397-1 Yamane, Hidaka, Saitama 350-1241, Japan

**要旨：**ゲノム編集はゲノムDNA配列を自由に改変する技術であり、従来の遺伝子治療の可能性をさらに広げる新技術として注目されている。ゲノム編集技術により遺伝子ノックアウトや遺伝子修復効率が桁違いに上昇する。2015年に中国のグループがヒト受精卵を用いたゲノム編集実験を行い、研究の正当性を含めた倫理的な問題が大きな論議を呼んだ。それに対して、同年12月にゲノム編集のヒトへの応用を多角的に議論する国際サミットが開催された。さらに、2018年11月の第2回のサミットで、中国の別の研究者がゲノム編集を行ったヒト受精卵から双生児が生まれたことを発表して、科学界でなく一般社会にも大きな衝撃を与えた。本稿では、ヒト体細胞ならびに受精卵のゲノム編集技術の課題・展望について紹介する。

**キーワード：**ゲノム編集, 遺伝子治療, 受精卵, CRISPR

**Abstract:** Genome editing is an ideal strategy for gene therapy to treat various disorders. In contrast to the overexpression of therapeutic cDNA, genome editing enables precise gene repair as well as ensures the stable and regulated expression of the edited gene. The recent development of artificial nucleases, such as CRISPR-Cas9, has made it possible to overcome the low efficiency of targeted DNA integration, gene repair and gene knockout, which are not feasible with conventional gene addition therapy. Genome editing has already been used in clinical applications for cancer and AIDS therapy, where the benefits outweigh the associated risks. However, genome editing using donor DNA for homology-directed repair (HDR) still has challenges with regard to its efficiency and safety. Off-target mutations have not been fully evaluated concerning the infidelity of nucleases or random chromosomal integration of donor DNA. In contrast to somatic genome editing, which can be regulated similarly to conventional gene therapy, heritable genome editing must be considered more carefully from therapeutic as well as ethical aspects. The recent birth of genome-edited twin girls in China shocked the world and has ignited international debate on how to regulate this exciting but potentially dangerous technology.

**Key words:** Genome editing, Gene therapy, Fertilized eggs, CRISPR

### 遺伝子治療とゲノム編集

ここ数年、遺伝子治療は臨床試験の成功が続々と報告され、欧米では様々な遺伝子治療薬が承認されるに至り、日本でもようやく脚光を浴び始めた。欧米初の遺伝子治療薬で

ある2012年のGlybera（家族性リボ蛋白質リパーゼ欠損症治療用アデノ随伴ウイルスベクター（AAV））から2017年のKymriahとYescarta（CAR-T細胞）やLuxturna（遺伝性網膜ジストロフィー治療用AAVベクター）まで、欧米だけでなく日本においても次々と遺伝子治療薬が承認され始めている。

2000年のフランスにおけるレトロウイルスベクターを用いたX連鎖重症複合免疫不全症（SCID-X1）の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床試験は、遺伝子治療のみで顕著な治療効果が得られた初めての例として大きな反響を呼ん

（受付 2019年7月12日／受理 2019年8月12日）  
別刷請求先：〒350-1241 埼玉県日高市山根1397-1  
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター  
e-mail: mitani@saitama-med.ac.jp

だ<sup>1)</sup>。同様の方法で、これまでに100人以上の血液系遺伝病の患者が治癒している。一方、そのうち何人かで白血病が発症し、その安全性が問題となった。その原因が調べられた結果、治療に用いたレトロウイルスベクターが染色体上の組み込み部位の近傍にあるがん遺伝子を活性化したこと、また、レトロウイルスベクターは染色体上の転写開始点やCpG islandに組み込まれやすい傾向にあることなどが明らかとなった。このことから、より安全な遺伝子治療技術の確立に向けて、挿入変異を起きにくくしたベクターの改良が進み、顕著な成果が上がっている。その一方で、より理想的な戦略として、染色体の病因遺伝子の変異を正確に修復する、いわゆる遺伝子修復治療技術の開発も進められてきた。遺伝子修復の場合、細胞に導入される鋳型DNAは正常な塩基配列を含む染色体断片であり、従来の遺伝子(付加)治療のような、治療遺伝子のcDNAを発現するために必要な強力なエンハンサー・プロモーターはDNAにコードされていないため、染色体組み込み後に近傍の遺伝子を活性化する恐れがない。また、修復された病因遺伝子は、その遺伝子の本来持つ染色体上の調節領域によって発現が正確に調節される。

哺乳類細胞の染色体上にDNA二本鎖切断を導入すると、その部位のDNA修復が活性化される。その一方で、特定のDNA配列を認識するzinc finger proteinと制限酵素FokIとを融合したいわゆるzinc finger nuclease (ZFN)の技術と、目的のトリプレットDNA配列に結合するZFタンパク質をデザインする技術とがそれぞれ発展し、それらを組み合わせた任意のDNA配列に対するZFNを構築する効率のよい技術を開発したSangamo社が、2005年にNature誌にヒトT細胞での遺伝子改変の論文を発表した<sup>2)</sup>。ちなみに、このNature誌の論文で初めてゲノム編集(genome editing)という言葉が用いられている。ZFNの構築には高い専門性を必要とし、Sangamo社の共同研究は制約が厳しいためになかなか技術が一般には広まらなかったが、2011年に、植物に感染するキサントモナス属の細菌がコードするDNA結合タンパク質からデザインされたtranscription activator-like effector nuclease (TALEN)が開発され、DNA認識部位のモジュラー化がZFNに比べると遙かに容易なこともあり、様々な動物種・幹細胞へのゲノム編集技術の応用が広がった<sup>3)</sup>。そして2013年に、細菌の外來性遺伝子に対する獲得免疫機構であるclustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9)の哺乳類細胞への応用が開発され<sup>4, 5)</sup>、その簡便性と効率の高さから、ゲノム編集は一気に大学生でも使える技術になった。

正確な相同組み換えによる遺伝子修復の効率が桁違いに向上したことから、これら人工ヌクレアーゼの技術は、遺伝病の究極の治療法として大いに期待されている。しかし、修復用のドナーDNAが存在しない場合にも、人工ヌクレアーゼは最終的に非相同末端結合(non-homologous end-joining: NHEJ)のエラーによってindel(挿入もしくは欠失)が入り、

標的配列に結合できなくなるまで切り続ける。こうして得られる高効率な遺伝子ノックアウトは、従来の遺伝子ターゲットングでも従来のcDNA付加型の遺伝子治療でも不可能であり、遺伝子治療に新しい可能性を与えた。一般に、NHEJの方がドナーDNAを要する相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)よりも高頻度に得られる。ゲノム編集を用いて、特にNHEJによる遺伝子ノックアウトによって、例えば筋肉量が倍増した家畜や病原体に耐性になった植物などが実験室レベルでは容易に作られるようになった。ゲノム編集技術を利用した遺伝子治療法の開発も急速に進んでいる。今年4月の米国遺伝子細胞治療学会(ASGCT)においても、500を越える口演のうちの約20%がゲノム編集に関連する演題であった。

### 臨床試験が進行中の体細胞ゲノム編集

現在までに、AIDSの治療としてHIVのCCR5共受容体遺伝子のノックアウトと、ユニバーサルなキメラ抗原受容体発現T細胞(CAR-T)樹立のための遺伝子ノックアウトとにゲノム編集が使われ、すでに臨床での成果が報告されている。AIDSの例では、CCR5遺伝子の $\Delta 32$ アミノ酸欠失をホモ接合体で持つ人はHIV感染に耐性があることを利用して、CCR5遺伝子に対するZFNのmRNAを造血細胞にエレクトロポレーションで導入して、人工的にノックアウトする。最初にT細胞で行われた臨床試験で治療効果が得られ<sup>6)</sup>、現在、CD34陽性細胞を標的とした臨床試験が行われている(SB-728mR-HSPC)。

ユニバーサルCAR-Tの例では、CD19陽性の急性リンパ性白血病(ALL)を標的としたCAR-Tを、患者のヒト白血球型抗原に拘束されずに使用するための遺伝子改変である。そのために、TALENのmRNAのエレクトロポレーションによって、T細胞受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子と、ALLに対する抗CD52抗体薬でCAR-Tが除かれないようにCD52遺伝子とをノックアウトしている(さらに自殺遺伝子として、CD34とCD20の両方の抗体に対するエピトープであるRQR8遺伝子を発現し、抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ抗体であるrituximabの処理で、副作用が生じた場合に細胞を除去できるように工夫がされている)。このような、ユニバーサルCAR-Tが2名のALLの小児患者に対して有効に使われたことが報告された<sup>7)</sup>。

また、CRISPRによりPD-1遺伝子をノックアウトしたT細胞を用いるがん免疫療法も進められているという。これらAIDSやCAR-Tへの応用は、疾患が重篤であり、かつ成人に利用するため、リスクベネフィットの観点からも後述する安全面での課題をそれほど重視する必要はない。したがって、今後も当面は、遺伝子ノックアウトによる後天性疾患の遺伝子治療が中心となってゲノム編集の応用が拡大すると考えられる。

一方、一昨年、遺伝性代謝疾患であるムコ多糖症の患者の肝臓のアルブミン遺伝子座に*in vivo*(生体内への直接の導入)で治療遺伝子をノックインする臨床試験が開始された。

HDRの低い効率をアルブミン遺伝子座からの高い遺伝子発現効率で補うストラテジーである。初めての*in vivo*でかつHDRを利用するプロトコルということで注目されているが、今年のASGCTでの発表によると、顕著な治療効果は認められていないようである。

### 体細胞ゲノム編集治療に向けた現状と課題

ゲノム編集を臨床応用する場合には、生物学的研究への応用とは異なり治療としての視点で考える必要があり、あくまでも遺伝子治療の一種として評価されるべきである。一方、ゲノム編集の臨床応用に向けて克服すべき課題については、従来の遺伝子治療の課題に加えて、ゲノム編集技術に特有の課題がある。

効率に関しては、例えばヒトのCD34陽性造血幹前駆細胞における*ex vivo*ゲノム編集（体外に取り出した細胞にゲノム編集を施した後に体内に戻す）で、NSG超免疫不全マウスに一次・二次移植して生じる本当の幹細胞により近い細胞集団で評価されている。遺伝子ノックアウトに関しては90%を越える細胞で、HDRの効率についても10–20%の効率で可能となり、一部の遺伝病で遺伝子修復治療が期待出来るレベルに達した。

一方、肝臓においては、マウスでの*in vivo*ゲノム編集モデルにおいてHDRは~10%であるが、一塩基編集を用いて10–25%の肝細胞で変異を修復した例が報告された<sup>8)</sup>。また、meganucleaseを用いてサル肝臓で約40%の効率でPCSK9遺伝子ノックアウトが報告されている<sup>9)</sup>。筋肉では筋ジストロフィーモデルイヌでの変異エクソンの切りだしなど、大型の疾患モデル動物での治療成功例が報告されるようになり始めたが、DNAレベルでの効率はまだ低い<sup>10)</sup>。

近年の遺伝子治療の成功の背景には、長年にわたるデリバリー法（ベクター）の開発と、高効率化と安全面での改良、ならびにベクターや治療遺伝子に対する宿主の免疫応答に関する研究の進歩がある。特に、ベクター技術の改良により、様々な標的組織へ100%近い効率で遺伝子導入が可能になった点が最も重要であった。人工ヌクレアーゼも従来の遺伝子治療のベクター技術を用いることで、高効率に発現できる。しかし、ゲノム編集においては、その後高効率な染色体切断とDNA修復が必要である。ゲノム編集がより広範な疾患に応用されるためには、これらの各ステップのさらなる改良が必須だと考えられる。特に、オフターゲット変異や*in vivo*でのヌクレアーゼ遺伝子の免疫原性を考えると、従来の遺伝子治療に用いられるウイルスベクターのように高効率かつ安定な遺伝子発現は、ゲノム編集には必ずしも向かないかもしれない。例えばCRISPRの場合には、Cas9タンパクとgRNAとの複合体であるRNPを標的細胞・組織へこれまで以上に高い効率で導入する技術の開発が望まれる。

ゲノム編集の臨床応用を考えるうえで最も重要なのは、治療である以上「安全性」である。遺伝子治療全体の課題として、遺伝子導入に用いられるベクターに由来する免疫原性や細胞毒性がある。また、レトロウイルスやレンチウイル

スなどの染色体に組み込まれるベクターを用いる場合には、染色体挿入変異などの遺伝毒性（染色体DNAに対する悪影響）が問題となる。それに加えてゲノム編集技術に付随する問題点は、人工ヌクレアーゼの免疫原性、細胞毒性、遺伝毒性（いわゆるオフターゲット変異）が挙げられる。さらに、HDRのためにドナーDNAを用いる場合には、ドナーDNAが染色体に組み込まれることによる遺伝毒性も考慮に入れる必要がある。前述したように、遺伝病の遺伝子治療法としてゲノム編集が注目されてきた一番の理由は、従来の遺伝子治療法で白血病の発症があったからである。したがって、安全性が確保されないのであれば、すでに臨床で成功例を重ねている従来の治療法をゲノム編集が取って代わるのは難しい。

人工ヌクレアーゼの不正確さによるオフターゲット変異を解析するには様々な方法がある<sup>11)</sup>。理論的には、一番正確なのは全ゲノムシーケンス（whole genome sequence: WGS）であろう。しかしコストが高いうえ、これまでのWGSを用いる解析法の多くは100%の細胞が同一のDNA配列を持つという仮定によるため、オフターゲット変異のような対象細胞の1%以下が持つ変異を検出するのは容易ではない。仮に全ゲノムの100xのカバレッジでも検出感度は1%ということになり、それ未満の頻度の変異は検出困難である。また、現在の次世代シーケンサー（next generation sequencer: NGS）の技術上の問題としてエラーが0.1%位とされており、検出感度に限界が生じる1つの原因となっている。すなわち、感度の点でもコストの点でも、WGSは一般的なオフターゲット変異の解析法としては適さない。一方、現在主に用いられているのは、ゲノム編集の標的配列に類似の配列をコンピューター解析によって同定する方法である。簡便であるために広く使われているが、後ほど述べる網羅的で偏りのない方法ほど正確ではない。網羅的でありかつ偏りのない方法として、実際に細胞のなかで人工ヌクレアーゼによってどの配列が切断されるかを検出する方法もある。これらの方法では、細胞で人工ヌクレアーゼを発現した後に切断末端を標識して免疫沈降したり（BLESS）、もしくは、短い二本鎖オリゴを人工ヌクレアーゼの発現と同時に導入して、それらが組み込まれた部位を解析する（GUIDE-seq）。これらの方法は、ほかの方法に比べて、実際に細胞内で切断される部位を同定するという大きな長所を持つ。その一方、多数の細胞が必要であったり、また、多量の二本鎖DNAの導入に耐えられる丈夫な細胞株でしか応用できないなどの限界もある。もう1つの方法は、DNAをヌクレアーゼで切断するように、標的細胞のDNAを人工ヌクレアーゼによって試験管内で切断し、全ゲノム配列を決めるか（Digenome-seq）、もしくは切断末端にアダプターを付けてその部分の配列を決定する方法（CIRCLE-seq）である。特に後者は非常に感度が高く、かつ個人間のゲノム配列のSNPによる違いさえ検出可能であるが、高感度のために実際の細胞内で生じる切断以外まで検出している可能性もある。いずれにしても、WGS以外の方法はあくまでも潜在的

なオフターゲット部位のスクリーニング法であり、煩雑なうえに定量性には限界がある。したがって、実際のゲノム編集細胞でのオフターゲット変異の頻度を調べるには、それぞれの方法で同定した予想部位に対して、ゲノム編集処理後の細胞で deep sequencing を行う必要がある。しかし、次世代シーケンサーのエラー率から検出感度は~0.1%位であり、例えば  $10^8$  の細胞にゲノム編集をした場合には  $10^5$  未満の頻度の変異は判別できない。最近、p53 遺伝子とゲノム編集の関係が注目されており、p53 遺伝子が正常な細胞は DNA 二本鎖切断で死にやすいため、ゲノム編集に成功した細胞には p53 経路に異常がある可能性が高いことが示唆されている。しかし、少なくともヒト造血幹前駆細胞では、オフターゲット変異が少ない標的を選ぶことでこの問題を回避できる。それに加えて、DNA 二本鎖切断の修復エラーの際に数千塩基対以上のサイズの欠失が入ったり、高頻度に染色体転座が生じる可能性も示唆されている。さらに、ドナー DNA (二本鎖 DNA や AAV ベクター) を用いる場合には、それらが高頻度にオンターゲットならびにオフターゲット部位に組み込まれることが知られている。これらの染色体レベルでの変異の高感度な検出法と、それらを軽減するストラテジーの開発が強く望まれる。そして何よりも、これらの解析で得られるのは DNA レベルの変異に過ぎず、治療の副作用として問題となる細胞の形質の変化に結びつくような変異を見分けることはできない。結局、ゲノム編集細胞に生じる変異の結果で一番問題となるのは細胞のがん化であるが、これらの方法では細胞のがん化の原因となる染色体転座を感度良く検出するのは難しい。現在のゲノム編集の治療応用に向けた研究はまだ高効率を求める段階にあり、安全性の評価は遅れているといえる。

また、人工ヌクレアーゼによるオフターゲット変異のみが問題ではない。それ以外にも、遺伝子修復やノックインのようにドナー DNA を導入するゲノム編集の場合、それらが染色体上のランダムな部位に組み込まれる頻度が過小評価されている。用いる細胞や DNA 導入法によるが、ドナー DNA の染色体組み込みの頻度については細胞あたり 1% のオーダーであろうと考えられ、また、人工ヌクレアーゼでの indel に比べると組み込まれた部位の染色体 DNA の変化が大きい。

ただし、さらに高頻度に起きる変異は、DNA 複製のエラーの結果で生じる突然変異である。1 回の DNA 複製あたり、 $10^{10}$  塩基に 1 塩基の頻度で DNA 複製エラーにより自然変異が入るとされている。一見稀な現象のようであるが、例えば、全く変異のない幹細胞が 1 個あるとする。それを移植可能な  $10^9$  個まで増殖させるとする。ヒト 2 倍体ゲノムサイズが  $7 \times 10^9$  であり、1 個から  $10^9$  個になるまでには約 30 回の細胞分裂が必要なので、平均して細胞当たり 10 ヶ所ほどの変異が入ることになる。となると、細胞当たり 0.1% 以下と予想されるヌクレアーゼのオフターゲット変異に比べて、自然変異の方が遙かに頻度が高いことになる。すなわち、例えば患者由来 iPS 細胞で遺伝子を修復したあとに増殖・分化

させて患者に移植する治療ストラテジーは、コンセプトとしては重要であるが、コスト、必要な日数、導入される変異によるリスクのいずれにおいても現実的ではないことがわかる。

一方、実際の患者の試料でのオフターゲット変異の解析を困難にする要因として、我々個人間のゲノム DNA 上のバリエーションがある。我々は純系化された実験動物とは異なり、個人間のゲノム DNA 配列の違いは約 0.1% といわれており、SNP だけでなく indel やさらに大きなサイズの多型が存在する。1 細胞あたりでは  $10^6$  のオーダーのバリエーションがあることになり、これまでに述べた様々な変異と比べて桁違いに多い。このために、実際にはゲノム配列の個人間の多様性のなかに、人工ヌクレアーゼのオフターゲット変異や DNA 複製による変異は埋もれてしまい、特に受精卵では、DNA レベルの変異のリスクの解釈は非常に困難になる。

最近開発された、いくつかの high-fidelity Cas9 バリエーションは、野生型の Cas9 と比べてオフターゲット変異の頻度がさらに桁違いに低い。in vivo のプロトコールとは異なり、ex vivo の方法に対する安全性の考え方は、ES 細胞や iPS 細胞を治療目的で使用する場合と似ているといえる。2013 年に独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の細胞組織加工製品専門部会が「iPS 細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論」という報告書を出した。それによると、幹細胞の安全性の基準となるのは、ゲノム不安定性とがん関連遺伝子の変異とされている。前者については、10 世代前後の全エクソンシーケンスを行い変化がないことを確認すること、後者については、約 230 のがん関連遺伝子を調べることにしている。ゲノム編集の場合、ゲノム DNA 配列そのものを標的とするため、ヒトに使う材料とまったく同じものをヒトとゲノム配列の異なる動物実験で試すのは不可能である。しかし、何らかの基準が必要で、動物を用いた安全性評価も不可欠になると思われる。一方米国 FDA は、ex vivo のヒト造血幹前駆細胞のゲノム編集で安全性を示すデータとして、1) 上記のバイアスのない網羅的な解析法 2 種類による DNA レベルのオフターゲット変異の詳細な解析、2) 核型解析と軟寒天培地による細胞レベルでの形質転換アッセイ、3) 患者に移植するのと同数のゲノム編集処理した細胞を NSG マウス 100 匹以上に分けて移植して 5 ヶ月間の観察を求めている。結局、オフターゲット変異の問題は細胞のがん化であり、生物学意義の不明なオフターゲット候補部位を感度がそれほど高くない deep sequencing で解析するよりも、動物への移植の方が現実的で感度が高いということであろう。現在は、少なくとも米国では、慎重にデザインされた人工ヌクレアーゼ (もしくはその標的配列) を用いれば、そのオフターゲット変異のリスクは極めて小さいと考えられている。一方、in vivo のゲノム編集については、移植実験はほぼ不可能であるうえ、ヒトとモデル動物とでゲノム配列が異なるが、FDA は霊長類での実験データを求めている。さらに、これまでの in vivo のゲノム編集の多くは、ウイルスベクターなどで持続的に人工ヌク

レアーゼを発現しており、オフターゲット変異の蓄積の問題がある。in vivoゲノム編集の安全性評価は、今後の課題である。

遺伝子治療の研究で最も重要なテーマの1つは、宿主の免疫応答であった。人工ヌクレアーゼが人工的なタンパク質であるうえに、特に細菌由来のものを使う場合には、免疫原性の問題は避けて通れない。実際に正常人で抗Cas9抗体や抗Cas9T細胞の保有率を調べた研究では、対象集団によっては半数以上の正常人がCas9に対する液性ならびに細胞性免疫をすでに保有している<sup>12)</sup>。一方、最近のマウスを用いた筋肉のin vivoゲノム編集の結果によると、成獣では免疫応答が惹起されたが、新生児マウスではそれは回避された<sup>13)</sup>。これまでの遺伝子治療研究の歴史を顧みると、近交系マウスで治療を成功しても雑種である大型動物ましてやヒトが対象になると、スケールアップの問題や免疫系の複雑さの問題が顕著になり、期待するような治療結果が得られないことが多かった。ゲノム編集の臨床応用に向けても、これらのハードルは覚悟しておく必要がある。何らかの免疫応答は当然でてくるので、ほかの治療法と比較してわざわざ強い免疫抑制剤を使ってまで行うベネフィットがゲノム編集にあるか、よく考える必要がある。

実際にはどのような先進医療にもリスクは付きものであり、リスクゼロで安全な技術を求めるのは現実的ではない。したがってゲノム編集を、遺伝子(付加)治療を含めた既存の治療法と比較して、リスクベネフィットを考慮する必要がある。すなわち、ゲノム編集でのみ治療可能な疾患は、ベネフィットは大きく優性遺伝病がそれに相当する。また、制御された遺伝子発現が必要とされるCD40リガンド欠損症やFasリガンド欠損症等の免疫疾患も、ゲノム編集によるベネフィットが大きく有力な対象疾患である。また、現時点での遺伝子修復効率はそれほど高くないため、正常細胞(遺伝子修復細胞)が変異細胞のなかで増殖優位性があることが知られている。血液系では重症複合性免疫不全症候群や、肝臓では遺伝性高チロシン血症I型や、低い遺伝子発現でも治療レベルが期待される血友病なども対象として考えられている。一番考慮すべきことは、ゲノム編集ありきではなく、遺伝子付加治療を含めた既存の治療法と比較してのリスクベネフィットである。SCID-X1のような患者数の非常に少ない疾患で、かつ若干のリスクがあるとはいえ、通常の遺伝子治療が成功している疾患でどれだけの基礎データが揃ったときに、新たな患者に効果と安全性のいまだ不明なゲノム編集治療を施すかは、容易な問題ではない。

### 生殖細胞ゲノム編集治療の問題点

さて、2015年4月に中国からヒト3前核受精胚を用いたゲノム編集の論文が発表され<sup>14)</sup>、大きな議論となった。この研究では、βサラセミアの治療を名目としてβグロビン遺伝子座を標的とした実験が行われた。その結果によると技術的な問題が顕著であり、正確な遺伝子修復は7%に過ぎず、それらはすべてモザイク(変異細胞と修復細胞が混ざった

状態)であった。この論文以降、現在までに行われたヒト受精胚でのゲノム編集の報告の数は10を越える。技術的にはオフターゲット変異とモザイクが二大課題とされるが、いずれは今後の技術の進歩で改善されるであろう。倫理的な観点から、最初は生殖補助医療の余剰胚のうち発生が進まない3前核受精胚が用いられていた。しかしその後、患者由来精子と正常卵子の人工授精や正常卵への患者由来リンパ球の核移植など、研究目的の初期胚作製が始められている。2016年には、初めて米国のグループがヒト受精胚でのゲノム編集を行った<sup>15)</sup>。劣性の肥大型心筋症の原因遺伝子の1つである心筋ミオシン結合蛋白遺伝子3(MYBPC3)に4塩基対の欠失を持つ男性患者由来の精子を、正常卵子に人工授精して得られた受精胚を用いたものである。CRISPR複合体を精子と同時に導入する工夫で、モザイクを防いでいる。その結果、HDRによって正常遺伝子座がホモの受精卵が生じる効率も、コントロール群の47%(理論値は50%)を有意に上回る72%であったが、ヒトに応用するにはまだ低い。一方、詳細な解析にもかかわらずオフターゲット変異は検出されなかった。ただし、この結果には疑義があげられている。問題とされているのは主に、修復用の一本鎖合成DNAではなく、母方由来正常染色体を鋳型としたHDRが大多数を占めた点である。例えば、1)受精直後はしばらく父親由来と母親由来の前核の位置が受精卵内で離れているのに、どのようにして組換えが起きるのか、2)CRISPRによる変異染色体切断後の欠失サイズに対し、遺伝子修復を検出するためのPCRのプライマーの位置が標的配列に近いために結果的に母方の正常な染色体のみを増幅したのではないかと、といった可能性が指摘された。それに対して、著者らも追加データを添付した反論を発表したが、他グループによりこの結果は再現されていない。また、この結果が正しいとして母型由来染色体が優先的に修復の鋳型となるのであれば、母方が変異遺伝子を持っている場合には遺伝子修復効率が低くなる恐れがある。

ヒト受精胚を対象にしたゲノム編集は、技術的のみでなく倫理的に多くの問題がある。2015年に中国のグループからの論文の発表後、学会その他の組織などからいくつも声明などが出されている。技術的にはほぼ完璧になったとしても、受精胚でのゲノム編集については慎重な意見が圧倒的に多いが、正当化する意見もある。2015年12月には、US National Academy of Sciences, U.S. National Academy of Medicine, Chinese Academy of Sciences, The Royal Societyの共催で、“International Summit on Human Gene Editing”が開かれ、ヒトへのゲノム編集技術の応用について、生物学的、社会学的、倫理的側面などから熱い議論が展開された。最後に声明が発表されたが、ゲノム編集のヒトへの応用に関しては、基礎研究目的か治療目的か(もしくは機能増強か)、またsomatic(体細胞)かheritable(生殖細胞、配偶子、初期胚を含む)かによって分けられている。受精卵に対する臨床応用に対しては非常に慎重である一方で、ほかの治療

法のない重篤な疾患の治療で10の厳密な基準(疾患の条件, 遺伝子修復の仕方, 患者の人権を保護しつつ透明性を確保する体制, 何世代にもわたるフォローアップ体制, 専門家や一般市民による定期的なリスクベネフィットの評価, 適応範囲が広がりすぎないための監視体制など, おそらく現時点では達成不可能)を満たすという条件付きで可能性を残した<sup>16)</sup>. いずれにせよ, どこまでが良くどこからが駄目かという明確な線を引くのは難しいと考えられる. 基礎研究においても, わざわざヒト受精卵を用いて行う正当性は何か, という問いに戻る必要がある. 受精卵でのゲノム編集の代わりに, 出生直後の遺伝子治療や幹細胞治療の適用は不可能か, 体外受精と着床前診断は不可能か, といったことも考えるべきである.

### 結 論

以上が昨年の卵子学会でお話した内容である. しかしながら, 2018年11月に香港で開催された第2回サミットで中国の研究者が, CCR5遺伝子をノックアウトした受精卵で双生児が生まれたとの衝撃的な発表をした. この研究者は, CCR5遺伝子をノックアウトすることが上記の10の条件の最初にある, 「ほかに治療法の存在しない重篤な疾患」に該当すると強く信じている. その時点ですでに歯止めがかかっていないことになる. それが一研究者の思い込みに留まらずに実際に臨床まで進んだことは, 中国における審査体制の問題かもしれないが, 日本でも同様のことが起きないとも限らない. これほどの研究がコソリ進められていたこと, すなわちtransparencyの欠如が, この研究者だけでなく研究者社会に対する信用を全く失わせている. 科学者の自己規制能力の限界を示したこの事件によって, この分野はどのように展開して行くのであろうか. さらに最近, ロシアの研究者が同様の臨床試験を計画していることを明らかにした. 今後, 様々な議論が積み重ねられると同時に, 議論が不十分な状況でヒト受精卵への臨床応用が始められることがないように, またそれともなう医療ツーリズムの問題が生じないように, 我々研究者は国際レベルで注目していくことが必要である. 特に我が国においても, より広い対象をカバーした議論を繰り返す必要がある. 第2第3の例が, 特に日本から出てこないことを願ってやまない.

### 文 献

- 1) Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. and Fischer, A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 669–672.
- 2) Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D. and Holmes, M.C. (2005): Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435, 646–651.
- 3) Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 39, e82.
- 4) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819–823.
- 5) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. and Church, G.M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823–826.
- 6) Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Ando, D.G., Kalos, M., Collman, R.G., Binder-Scholl, G., Plesa, G., Hwang, W.T., Levine, B.L. and June CH. (2014): Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.*, 370, 901–910.
- 7) Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., Ghorashian, S., Pinner, D., Ahsan, G., Gilmour, K., Lucchini, G., Ingloft, S., Mifsud, W., Chiesa, R., Peggs, K.S., Chan, L., Farzeneh, F., Thrasher, A.J., Vora, A., Pule, M. and Veys P. (2017): Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.*, 9, eaaj2013.
- 8) Villiger, L., Grisch-Chan, H.M., Lindsay, H., Ringnald, F., Pogliano, C.B., Allegri, G., Fingerhut, R., Häberle, J., Matos, J., Robinson, M.D., Thöny, B. and Schwank, G. (2018): Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat. Med.*, 24, 1519–1525.
- 9) Wang, L., Smith, J., Breton, C., Clark, P., Zhang, J., Ying, L., Che, Y., Lape, J., Bell, P., Calcedo, R., Buza, E.L., Saveliev, A., Bartsevich, V.V., He, Z., White, J., Li, M., Jantz, D. and Wilson J.M. (2018): Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat. Biotechnol.*, 36, 717–725.
- 10) Amoasii, L., Hildyard, J.C.W., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., Harron, R., Stathopoulou, T.R., Massey, C., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., Piercy, R.J. and Olson EN. (2018): Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 362, 86–91.
- 11) Tsai, S.Q. and Joung, J.K. (2016): Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat. Rev. Genet.*, 17, 300–312.
- 12) Charlesworth, C.T., Deshpande, P.S., Dever, D.P., Camarena, J., Lemgart, V.T., Cromer, M.K., Vakulskas, C.A., Collingwood, M.A., Zhang, L., Bode, N.M., Behlke, M.A., Dejene, B., Cieniewicz, B.,

- Romano, R., Lesch, B.J., Gomez-Ospina, N., Mantri, S., Pavel-Dinu, M., Weinberg, K.I. and Porteus, M.H. (2019): Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.*, 25, 249–254.
- 13) Nelson, C.E., Wu, Y., Gemberling, M.P., Oliver, M.L., Waller, M.A., Bohning, J.D., Robinson-Hamm, J.N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R.M., Collier, J.H., Asokan, A. and Gersbach, C.A. (2019): Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.*, 25, 427–432.
- 14) Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C. and Huang, J. (2015): CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprounuclear zygotes. *Protein Cell*, 6, 363–372
- 15) Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S.W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A.R., Kim, D., Kim, S.T., Gong, J., Gu, Y., Xu, X., Battaglia, D., Krieg, S.A., Lee, D.M., Wu, D.H., Wolf, D.P., Heitner, S.B., Belmonte, J.C.I., Amato, P., Kim, J.S., Kaul, S. and Mitalipov, S. (2017): Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548, 413–419.
- 16) National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations. (2017): *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. The National Academies Press, Washington, DC.