

対面助言実施日 2020年7月14日（火）
相 談 者 公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団

相談事項概要

財団が作製するHLAゲノム編集iPS細胞ストックにおけるゲノム編集によるオフターゲット効果評価は以下のとおり行う予定であるが、この適切性についてPMDAの意見を聴きたい。

- 全ゲノム解析及びSNPアレイ解析を行い、遺伝子変異の有無を確認する。
- in silico解析によりガイドRNAに類似するゲノム配列を検索し、当該配列における遺伝子変異の有無を確認する。認められた場合は、その旨を細胞株の提供先に情報提供する。



PMDAの意見

相談者が提示したゲノム編集株に対するオフターゲット効果に関する評価方法は**受入れ可能**である。

オフターゲット効果に係る評価について

相談者は、iPS細胞を利用する同種移植の際のT細胞及びNK細胞を介した免疫拒絶反応のリスクを抑えるために、CRISPR-Cas9ゲノム編集技術を用いて、HLA-A、HLA-B及びCIITA遺伝子をノックアウトしたiPS細胞（以下、「ゲノム編集iPS細胞」）を作製し、医療用に利用可能な水準で製造管理及び品質管理を行った上で配布することを予定している。

ゲノム編集iPS細胞の作製にあたっては、エレクトロポレーションによりCRISPR-Cas9システムのタンパク質及びガイドRNAをHLAホモ接合体のiPS細胞に導入し、標的部位のゲノムDNAが編集された可能性のあるiPS細胞をサブクローニングすることでシングルクローン（以下、「ゲノム編集株」）を得る。その後、得られたシングルクローンについて、以下の全ゲノム解析及びSNPアレイ解析を行い、ゲノム編集に伴う意図しない遺伝子変異（以下、「オフターゲット効果」）に関する評価を実施する。

<全ゲノム解析>

Illumina社製のNovaSeq6000を用いて、ゲノム編集前のiPS細胞（以下、「コントロール」）とサンガーシーケンスにより標的HLA部位に適切な欠失導入が確認されたゲノム編集株（以下、「サンプル」）の全ゲノム解析（平均深度70×、リード長2×151 bp）を実施し、両者を比較することにより、オフターゲット効果（SNV; Single Nucleotide Variants、Indel; Insertion/deletion及びCNV; Copy Number Variationsの有無）に関する評価を行う。なお、当該評価では、ヘテロ変異を想定した場合0.5アレル頻度の変異を検出できる必要があると考えるが、予定する全ゲノム解析において70×の深度で解析することで、0.15程度のアレル頻度であっても、遺伝子の変異が検出可能と判断している。

<SNPアレイ解析>

サンプル及びコントロールからゲノムDNAを抽出し、Illumina Infinium OmniExpressを用いたSNPアレイ解析及びジェノタイピングを実施することにより、オフターゲット効果（CNVの有無）に関する評価を行う。

全ゲノム解析及びSNPアレイ解析の評価結果から、がんゲノム変異データベースのCosmic Cancer Gene Census及びShibata Listに登録されている遺伝子に変異がないゲノム編集株を選択する。さらに、in silico解析により、CRISPR-Cas9システムに用いたガイドRNAに類似するゲノム配列（以下、「ガイドRNA類似配列」）を検索し、全ゲノム解析の結果と合わせてガイドRNA類似配列における変異の有無を確認した上でゲノム編集株として出荷する。なお、出荷するゲノム編集株のガイドRNA類似配列に遺伝子変異が認められた場合には、その旨を細胞株の提供先に情報提供する。

以上に示したゲノム編集細胞株に対するオフターゲット効果に関する評価方法の適切性について、機構の意見を聞きたい。