医学・医療領域におけるゲノム編集技術のあり方検討委員会

（３）遺伝子治療の進展と体細胞ゲノム編集治療の可能性と今後の課題

- ゲノム編集治療と従来型遺伝子治療のコンセプトの差異
- ゲノム編集治療の対象疾患
- 想定されるリスク
- フォローアップの在り方

平成28年10月5日
大阪大学大学院医学系研究科
遺伝子治療学
金田安史

世界の遺伝子治療臨床研究の推移

1999年までは、夜明け：大きすぎる期待と不十分な技術。
その後、低迷：十分な成果が挙げられない一方で、死亡事故や発がんなど、重大な問題が浮上。
2011年以降、定着：長年培われてきた基盤技術が開花し、推進体制の整備が進み、多くの成功例が相次いで報告。

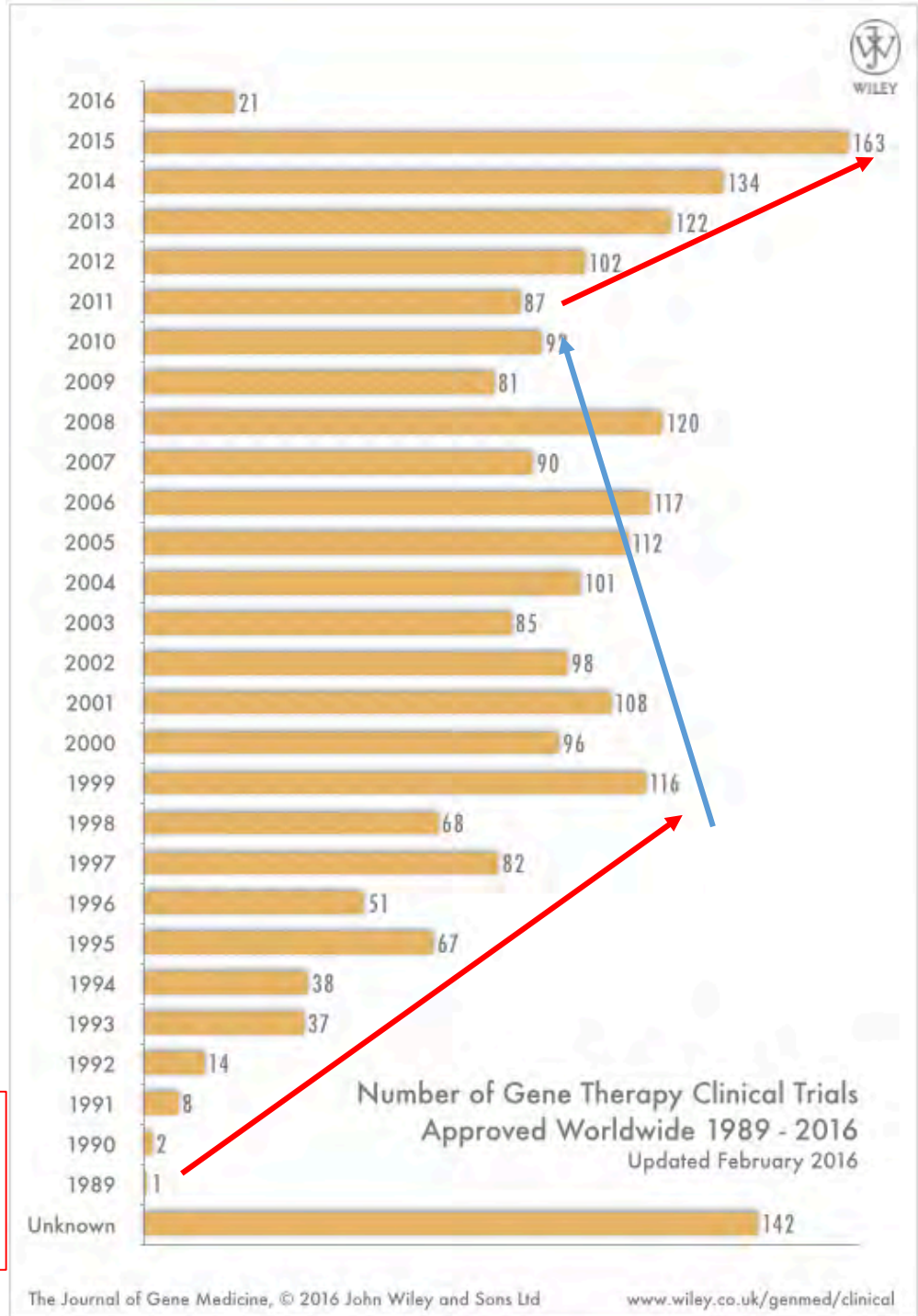
革新的基盤技術

レンチウイルス(LV)ベクター：改変HIVの組換えウイルスベクター（ゲノム中に挿入されるが、安全性が高く細胞は癌化しない）

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター：核内で染色体ゲノム外に長期に存在し、長期の遺伝子発現が可能

腫瘍溶解ウイルス：癌細胞の特性を利用して、癌細胞で増殖・複製するようにウイルス遺伝子を改変し癌細胞を選択的に死滅させる。さらに治療遺伝子の強発現も可能。

キメラ抗原受容体T細胞 (CAR-T cell): 腫瘍抗原を認識する抗体分子をT細胞受容体に発現させ、癌細胞に結合すると、それを攻撃できるシグナルを誘導できるように遺伝子改変した自己のT細胞



最近の遺伝子治療の成果 (Naldini L. Nature 526, 351-60, 2015)

疾患	ベクター	方法	期間	有効率
遺伝性疾患		**造血幹細胞**		
ウィスコット・アルドリッチ症候群	LV	ex vivo, HSC	10-60 M.	7 out of 7 (100%)
ウィスコット・アルドリッチ症候群	LV	ex vivo, HSC	9-42 M.	5 out of 6 (83%)
X連鎖性重症複合免疫不全症	SIN-RV	ex vivo, HSC	12-39 M.	7 out of 9 (78%)
ベータ・サラセミア	LV	ex vivo, HSC	24-72 M.	1 out of 2 (50%)
ベータ・サラセミア	LV	ex vivo, HSC	15 M.	2 out of 2 (100%)
ベータ・サラセミア	LV	ex vivo, HSC	1-6 M.	2 out of 2 (100%)
副腎白質ジストロフィー	LV	ex vivo, HSC	54-101 M.	3 out of 4 (75%)
異染性白質ジストロフィー	LV	ex vivo, HSC	3-60 M.	20 out of 20 (100%)
		全身投与(肝臓標的)		
血友病 B	AAV8	IV	16-48 M.	6 out of 6 (100%)
		網膜内投与		
レーバー黒内障（網膜変性疾患）	AAV2	unilateral, subretinal	36 M.	5 out of 5 (100%)
レーバー黒内障	AAV2	unilateral, subretinal	54-72 M.	3 out of 3 (100%.)
レーバー黒内障	AAV2	unilateral, subretinal	36 M.	6 out of 12 (50%)
リンパ腫、白血病		**遺伝子改変T細胞**		
B細胞リンパ腫、白血病(B細胞)	RV	ex vivo, Anti-CD19	1-23 M.	12 out of 15 (80%)
急性リンパ性白血病(B細胞)	RV	ex vivo, Anti-CD19	1-4 M.	5 out of 5 (100%)
急性リンパ性白血病(B細胞)	LV	ex vivo, Anti-CD19	1-24 M.	27 out of 30 (90%)
急性リンパ性白血病(B細胞)	RV	ex vivo, Anti-CD19	av. 10 M.	14 out of 21(67%)

西欧諸国初の遺伝子医薬品が承認 (2012年11月2日)

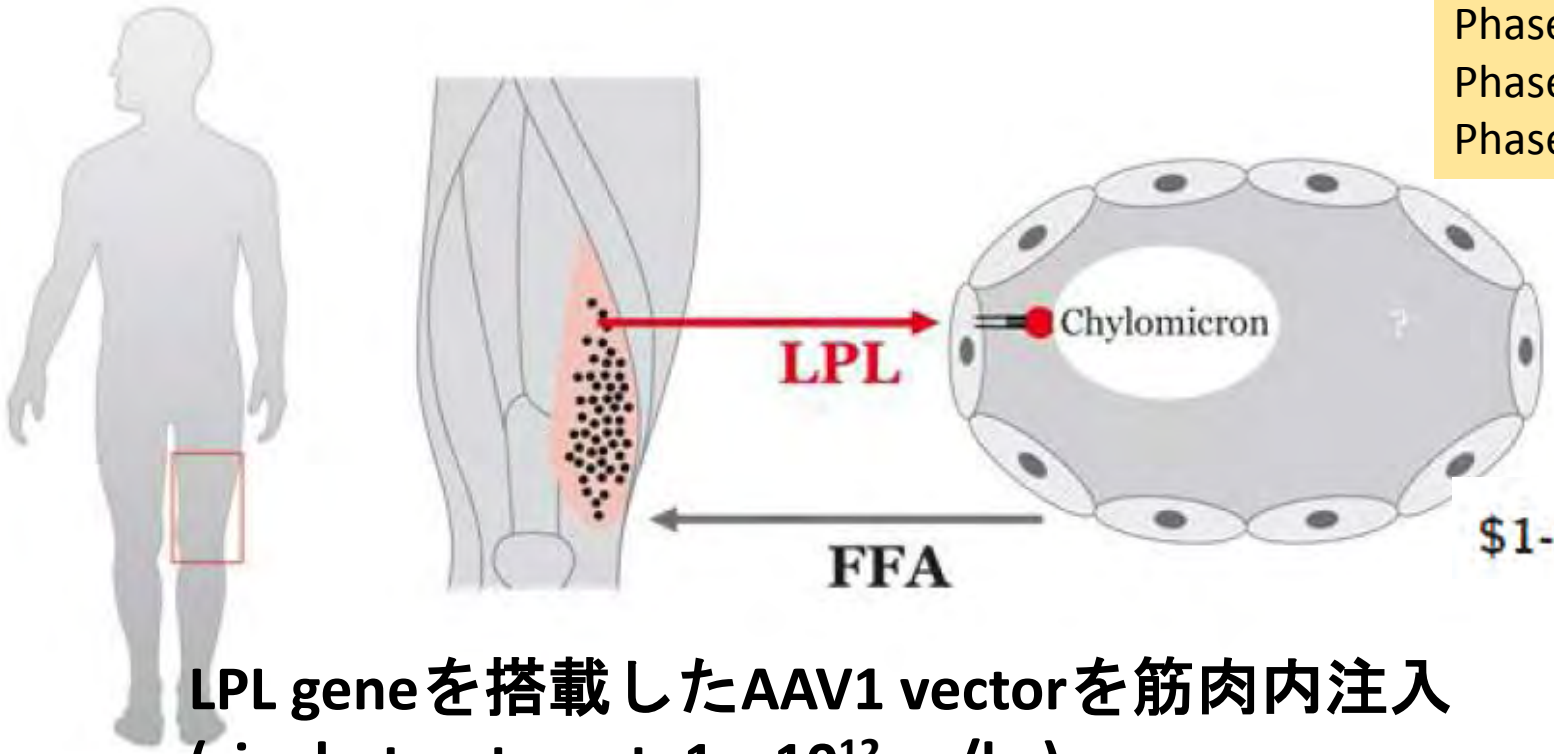
Alipogene Tiparvovec (Glybera®) - a Gene Therapy for LPLD

LPLD (lipoprotein lipase deficiency;　リポ蛋白リパーゼ欠損症)

Glybera® (alipogene tiparvovec) has been approved by the European Commission for commercialization in the European Union. It is the first gene therapy to receive approval in the Western world.

100万人に1-2人、接種した脂肪の分解ができない
Chylomicron血症、膵炎、糖尿病、動脈硬化などがおこる

Phase 1/2: 8 patients (single-center, two doses)
Phase 2/3: 14 patients(single-center, dose-escalation)
Phase 2/3: 5 patients (dual-center, single dose)



LPL geneを搭載したAAV1 vectorを筋肉内注入
(single-treatment, 1 x 10^{12} gc/kg)

薬価が問題

$1-million price tag set for Glybera gene therapy

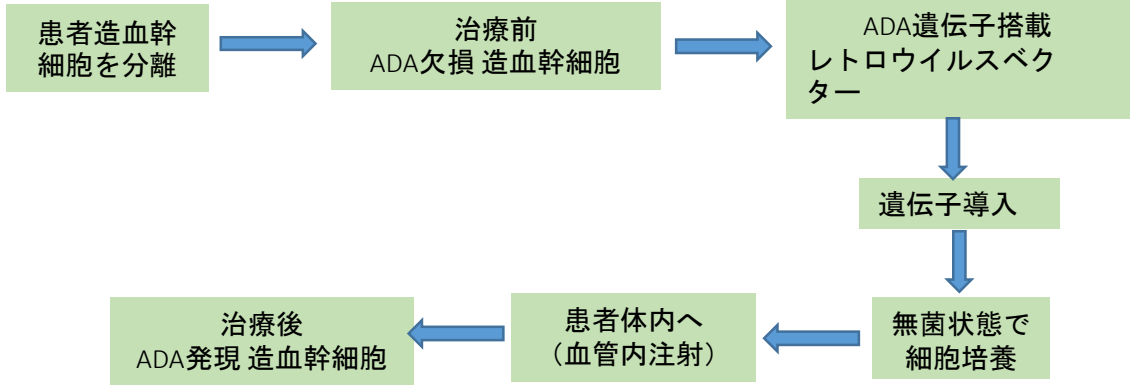
Appr. $50,000/vial., 19 vials /patient
(Up-front price by six years)

www.uniqure.com/uploads/Glybera%202pp%20Factsheet_lr.pdf

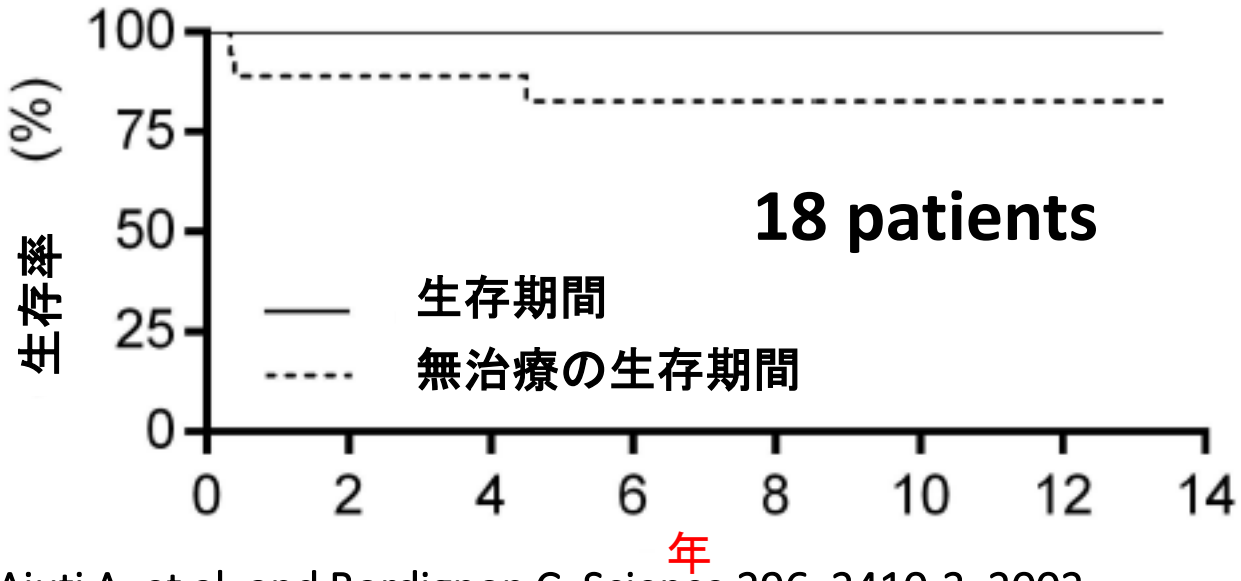
ADA遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターがアデノシンデアミナーゼ欠損症の治療薬として承認された

GSK receives positive CHMP opinion in Europe for Strimvelis™, the first gene therapy to treat very rare disease, ADA-SCID

(CHMP: Committee for medicinal products for human use)



15 patients/year in EU



Aiuti A, et al. and Bordignon C. Science 296, 2410-3, 2002.

2002年に報告された遺伝子治療の方法が、2016年3月にようやく承認された

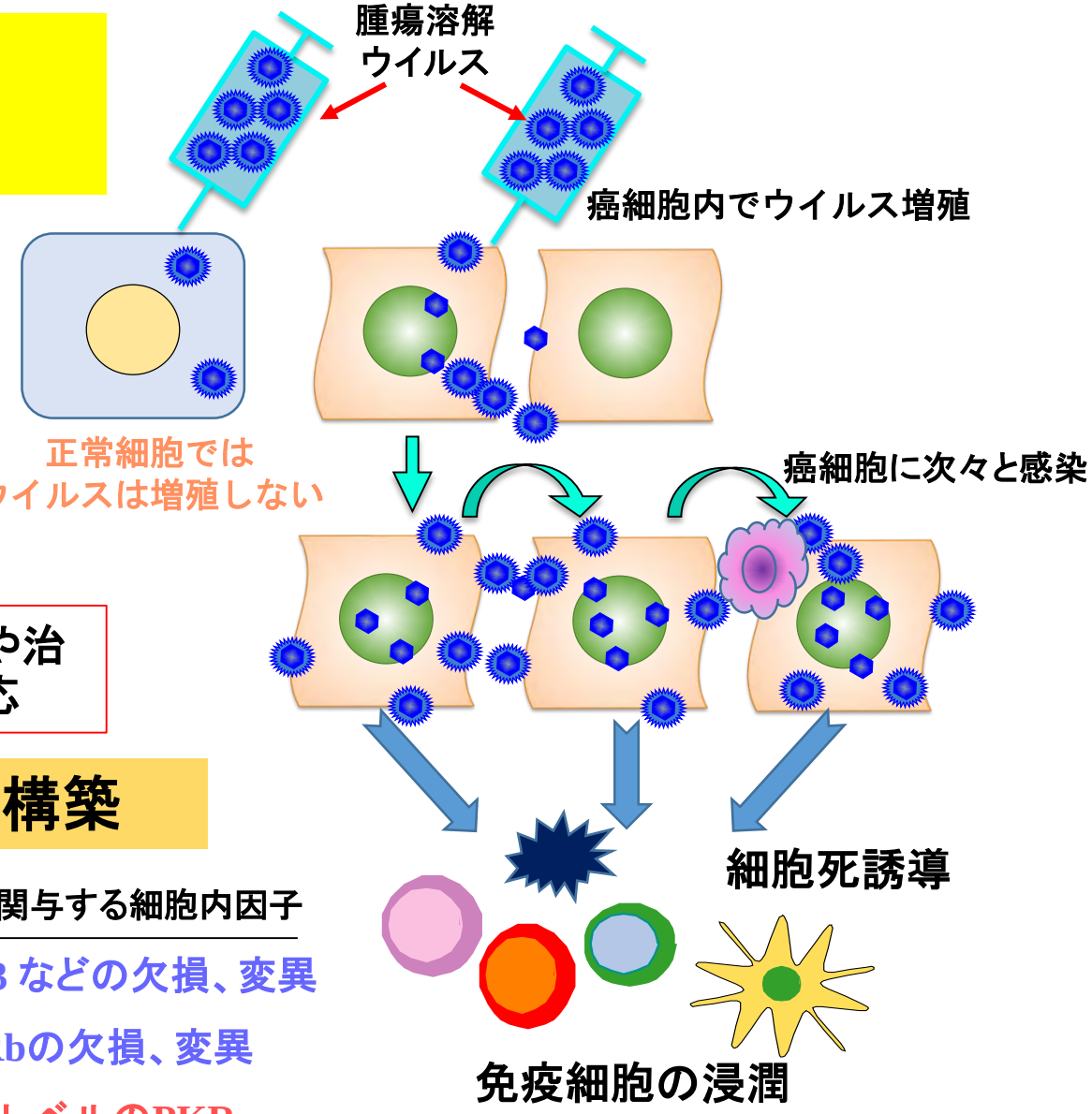
- 社会からの財政支援 (Telethon)
- 2010年よりGlaxo SmithKlein社が引き継ぎ、臨床研究のデータを承認申請に使用して承認を得た（GSKは最初から治験をやり直す必要はなかった）

Amgen社の腫瘍溶解ヘルペスウイルスが
メラノーマ治療薬として米国FDAで薬事承認された
（2015年10月）（EUでは2015年12月に承認）

IMLYGIC® (talimogene laherparepvec; T-VEC)

ヘルペスウイルス(HSV-1)の遺伝子を欠損させて腫瘍細胞で選択的に増殖させるように改変した腫瘍溶解ウイルスであり、さらに免疫細胞を浸潤させて抗腫瘍免疫を活性化させるため、*GM-CSF*の遺伝子を発現するウイルスベクターでもある。

大手のベンチャー企業による治験のデザイン（対照群の選択や治療対象患者の選択）が巧妙であったが、規制当局が柔軟に対応



癌細胞の特性を利用した腫瘍溶解ウイルスの構築

腫瘍溶解ウイルス	欠損、変異ウイルス遺伝子	ウイルス増殖に関与する細胞内因子
アデノウイルス（ONYX-015）	E1B	癌抑制遺伝子p53 などの欠損、変異
アデノウイルス(dl922-947, D24)	E1A(CR1 & CR2)	癌抑制遺伝子Rbの欠損、変異
ヘルペスウイルス(G207, T-vec)	ICP34.5など	癌細胞で低レベルのPKR
ワクシニアウイルス(vvDD)	TK, VGF	癌細胞で高いdTTP, 癌細胞で活性化しているEGFR 経路

癌細胞だけを破壊して、
さらに癌に対する免疫を活性化する

遺伝子治療の方法

人工制限酵素：
- 染色体上の任意の狙った配列を切断する酵素
- 自由なデザインが可能

遺伝子の変異

従来の遺伝子治療

ウイルス
ベクター
cDNA

本来の遺伝子とは異なる場所
cDNA

遺伝子挿入部位の制御不能
cDNA

- 遺伝子を加える（変異はそのまま）
- 細胞の機能を補充
- すでに多くの成功例
- 遺伝子挿入部位の制御不能
- 遺伝子発現の制御不能

ゲノム編集

遺伝子挿入部位の制御可能
cDNA

目的部位に遺伝子を挿入して安全で高い遺伝子発現を促す（ex. AAV-S1領域）

ゲノム編集を用いた治療研究で見出された新たな可能性

遺伝子修復

正常なDNA断片

DNA配列の置換
（遺伝子を修復）

- 変異を直す
- 安全で正確な遺伝子発現
- 優性遺伝病の治療
- 効率が低い

正常なDNA断片がないと、
遺伝子を破壊

- 特定の遺伝子を破壊
- すでに成功例が報告
- 遺伝子修復よりも効率が高い

ゲノム編集技術を用いて行われている遺伝子治療の非臨床研究の代表例

Target	Strategy
Viral infections（ウイルス感染症）	
HIV	Inactivating HIV receptors (CCR5, CXCR4)
	Knocking out essential host factors (LEDGF/p75)
	Excising viral genomes
	Targeted integration of antiviral factors
Hepatitis B virus	Inhibiting viral replication
Herpes simplex virus	Inhibiting viral replication
Human papilloma virus	Inactivating essential viral genes
T-cell immunotherapy（癌）	
	Knocking out endogenous T-cell receptors
	Knocking out self antigens
	Knocking out glucocorticoid receptor
	Knocking out checkpoint inhibitors
Hematologic disorders（血液疾患）	
X-SCID	Gene correction in T cells and CD34+ HSCs
ADA-SCID	Gene modification in cell lines
RS-SCID	Gene correction in patient iPSCs
Sickle cell disease and β-thalessemia	Correction of β-globin mutations in iPSCs
	Correction of β-globin mutations in CD34+ HSCs
	Inactivation of the enhancer of BCL11A

Target	Strategy
Liver-targeted gene editing（肝疾患）	
Hemophilia	Targeted cDNA addition to endogenous gene
Enzyme replacement	Targeted gene addition to albumin locus for hemophi and lysosomal storage disorders
Tyrosinemia type I	Gene correction in mouse liver
PCSK9	Gene disruption in mouse liver to lower cholesterol
α-1-antitrypsin deficiency	Gene correction in human iPSCs and differentiation into liver cells
Neuromuscular disorders（神経・筋疾患）	
Duchenne muscular dystrophy	
	Ex vivo targeted insertion of missing exons
	Ex vivo targeted insertion of a therapeutic minigene
	Ex vivo frameshift correction by NHEJ
	Ex vivo reading frame restoration by exon deletion
	In vivo reading frame restoration by exon deletion
Skin disorders（皮膚疾患）	
Epidermolysis bullosa	Gene correction in fibroblasts and iPSCs
Ocular disorders（眼疾患）	
Leber's Congenital Amaurosis type 10	Deletion of an aberrant splice site
Respiratory disorders（呼吸器疾患）	
Cystic fibrosis	Gene correction in stem cells
	Gene correction in mouse lung epithelium
Antimicrobials（細菌感染症）	
Bacterial infection	Reduction of bacteria in infection models
	Removal of bacteria using type I CRISPR systems

(Mol. Ther. 24, 430-446, 2016)

PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

RS-SCID: Radiosensitive SCID (RAG mutation)

体細胞のゲノム編集実験　（in vivo法）

遺伝性高チロシン血症Ⅰ型(hereditary hypertyrosinemia type I; HTI)モデルマウスの治療

Nature Biotech. 32, 531-553, 2014.

病態：チロシン代謝の最終段階に関与するfumarylacetoacetate hydrolase (FAH)遺伝子のexon 8のpoint mutation (G→A)によってexo8 skippingがおこりFAHが機能しなくなる。その結果、血中のチロシンレベルが上昇し急性の肝臓障害や体重減少がおこる。肝細胞の1万個に1個でも正常のFAHを発現すれば症状が改善する。

ゲノム編集による治療：point mutation部位に結合できるguide RNAとCas9をもつプラスミドを構築し、さらにpoint mutationを修復する鋳型となる正常のDNA断片(199塩基の一本鎖)を同時に、マウス肝臓にhydrodynamic gene delivery法で導入。

結果：

- 約250個の肝細胞に1個の割合で正常のFAHが発現
- 正常FAHをもつ肝細胞が選択的に増殖し、肝障害や体重減少の症状を改善。

オフターゲット効果：コンピューター上の検索では3～4か所が想定されたが、実際にCas9によって切断されず、シーケンス上も非標的部位の挿入欠失(indel)率は0.3%未満。

生殖細胞のゲノム編集実験

筋ジストロフィーのモデルマウスmdxの治療

Science 345, 1184-1188, 2014.

病態：ジストロフィンのexon 23のCAAがTAAになっているためにストップコドンが生じでジストロフィンが作られないため、筋力低下。

ゲノム編集による治療：
・mdxマウスの受精卵に、この変異部位を認識するguide RNAとCas9の mRNA、さらに鋳型となる正常塩基配列を含む一本鎖DNAを注入。
・これを鋳型として相同組換え修復(HDR)がおこると制限酵素Tse Iで切断されるようになるが、非相同末端結合修復(NHEJ)が起こるとこの切断サイトはなくなる。

結果：
・マウスのDNA解析により修復された11のマウスのうち、7匹はHDRが起こって修復されたが、4匹はNHEJにより変異部位が欠失して in-frameで連結しており、機能していた。 全胎仔の0～9%でHDRが認められた。
・DNAの解析では、修復されたDNAをもつ細胞の割合は、2～100%でありモザイク形成が起こっていた。
・成長したマウスの筋肉の状態を、creatine kinaseの筋肉から血中への漏出と前肢の握力による筋力測定で評価すると、修復されたマウスの場合は、HDR, NHEJによる修復のいずれでもmdxマウスよりも正常に近い測定値を示した。
・モザイク形成の場合、修復細胞の割合と筋肉の回復傾向が相関した。

オフターゲット効果：これによる有害事象は特になかった。32 potential siteを調べたが、controlと有意差なし。

米国で承認されているゲノム編集による臨床試験　（2015年10月時点）

Table 2 Representative ongoing and completed gene-editing clinical trials

Identifier	Phase	Title	Status as of October 2015
NCT00842634	Phase 1	Autologous T Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728 for HIV	Completed
NCT01044654	Phase 1	Phase 1 Dose Escalation Study of Autologous T Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Patients	Completed
NCT01082926	Phase 1	Phase I Study of Cellular Immunotherapy for Recurrent/Refractory Malignant Glioma Using Intratumoral Infusions of GRm13Z40-2, An Allogeneic CD8+ Cytolitic T Cell Line Genetically Modified to Express the IL 13-Zetakine and HyTK and to be Resistant to Glucocorticoids, in Combination With Interleukin-2	Completed
NCT01252641	Phase 1/2	Study of Autologous T Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Subjects	Completed
NCT02225665	Phase 1/2	Repeat Doses of SB-728mR-T After Cyclophosphamide Conditioning in HIV-Infected Subjects on HAART	Active
NCT01543152	Phase 1/2	Dose Escalation Study of Cyclophosphamide in HIV-Infected Subjects on HAART Receiving SB-728-T	Recruiting
NCT02500849	Phase 1	Safety Study of Zinc Finger Nuclease CCR5-modified Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in HIV-1 Infected Patients	Recruiting

すべて遺伝子のノックアウトによるHIVの臨床試験であり、遺伝子修復ではない。

(Mol. Ther. 24, 430-446, 2016)

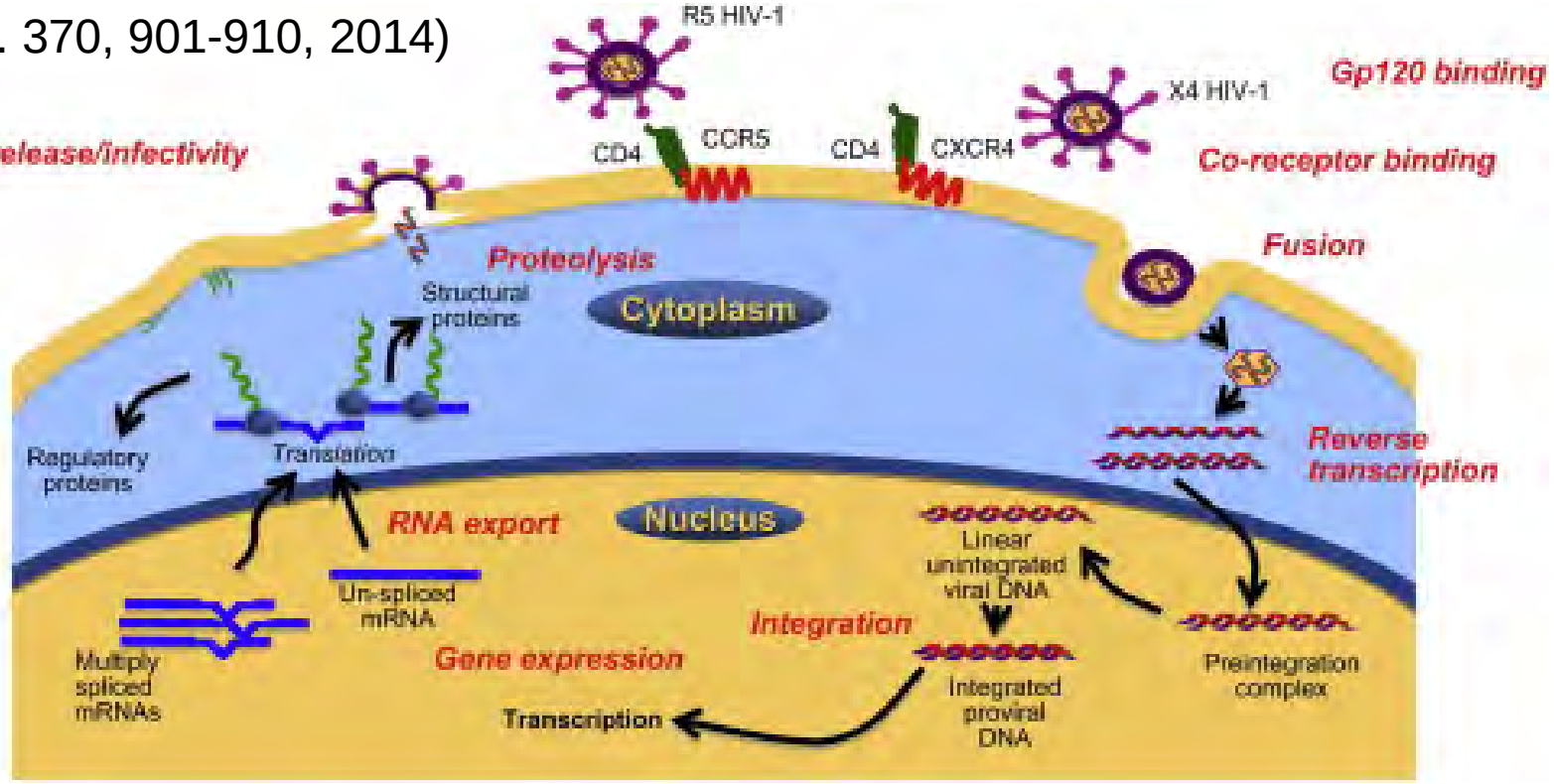
ゲノム編集（遺伝子破壊）の臨床応用：AIDSの遺伝子治療

(N. Eng. J. Med. 370, 901-910, 2014)

非臨床研究におけるゲノム切断の特異性

（ZFN-224によるCD4⁺T cellの修飾実験）
15 putative siteをultra-deep pyrosequencingで解析(Nat. Biotech. 26, 808-16, 2008)

1. CCR5: 36%
2. CCR2: 5.39%
3. ABLIM2: appr.0.005%
4. Others: not detected



CD4⁺T cellのCCR5をZFNで破壊してCCR5 delta32（変異を持つ患者の解析から安全な変異であることが証明されている）の自己のCD4⁺T cellが構築された。ZFNのCD4⁺T cellへの導入にはアデノウイルスベクターが用いられ、11～28%の細胞のCCR5が編集を受けた。

12名のHIV慢性感染患者が投与を受けた。1週間後、CCR5が破壊されたCD4⁺T cellは約250/mm³で全CD4⁺T cellの13.9%であり、ゲノム編集されたCD4⁺T cellは、非修飾のCD4⁺T cellよりも約4倍安定に血中に存在した。

ほとんどの患者でHIVのDNAは減少し、4人のうち1名でHIV RNAが検出限界以下。有害事象は1名で発熱や疼痛などがあった。投与28~112日間は無治療。その後症状に応じてHAART（抗ウイルス療法）施行。

末梢のCD4⁺T cellではなく、自己の造血幹細胞でのCCR5を同様に破壊してHIV感染を抑制する臨床試験も実施されている。

HIV感染者の治療を目指したZFNによるゲノム編集技術の臨床応用

Table 1. Clinical trials of HIV-infected individuals using ZFN-modified autologous T cells and HSPCs

Clinical trial	Status	Cohorts/study populations	Cell type	ZFN delivery method	Conditioning regimen
NCT00842634 phase 1	2009-2013 Completed[41]	On ART, aviremic, CD4 counts >450 On ART, aviremic, CD4 counts 200-500, ATI	CD4 T cells	Adenovirus	None
NCT01044654 phase 1	2009-2014 Completed	On ART, aviremic, CD4 counts 200-500 On ART, aviremic, CD4 counts >500, and *CCR5Δ32* heterozygotes, ATI	CD4 T cells	Adenovirus	None
NCT01252641 phase 1/2	2010-2015 Completed	Not on ART, CD4 counts >500	CD4 T cells	Adenovirus	None
NCT01543152 phase 1	2011-2016 Recruiting	On ART, aviremic, CD4 counts >500, ATI	CD4 T cells, and CD4/CD8 T cells	Adenovirus	Cytoxan (dose escalation)
NCT02225665 phase 1/2	2014-2018 Active, not recruiting	On ART, aviremic, CD4 counts >500, ATI	CD4/CD8 T cells	mRNA	Cytoxan (1 g/m^2)
NCT02388594 phase 1	2015-2017 Recruiting	On ART, aviremic, CD4 counts >450, ATI	CD4 T cells	mRNA	Cytoxan (1 g/m^2)
NCT02500849 phase 1	2015-2018 Recruiting	On ART, aviremic, CD4 counts 200-500, ATI	CD34 HSPC	mRNA	Busulfan (dose escalation)

Information obtained from website Clinicaltrials.gov and publically reported by sponsors.

- 末梢のT細胞から骨髄の造血幹細胞、前駆細胞へと移行
- ウイルスベクターから電気穿孔法へ移行
- 単剤から前処置（コンディショニング）療法との併用へ移行

(Blood, 127, 2546-52, 2016)

TALEN　を用いたゲノム編集による白血病治療

TALエフェクターは2つのアミノ酸で1つの塩基を認識する。これに制限酵素を結合させ特異的な配列を切断する。

急性リンパ性白血病の11ヶ月の女児に遺伝子改変キラーT細胞療法（CAR-T cell therapy）を施行しようとしたが、本人の免疫機能が悪くT細胞を集められない。

白血病治療用抗体の攻撃を受けない

免疫細胞抗原（CD52)

白血病治療用抗体

免疫細胞抗原（CD52)

HLA

腫瘍抗原

T細胞受容体

腫瘍抗原を認識できる抗体分子を持つT細胞受容体

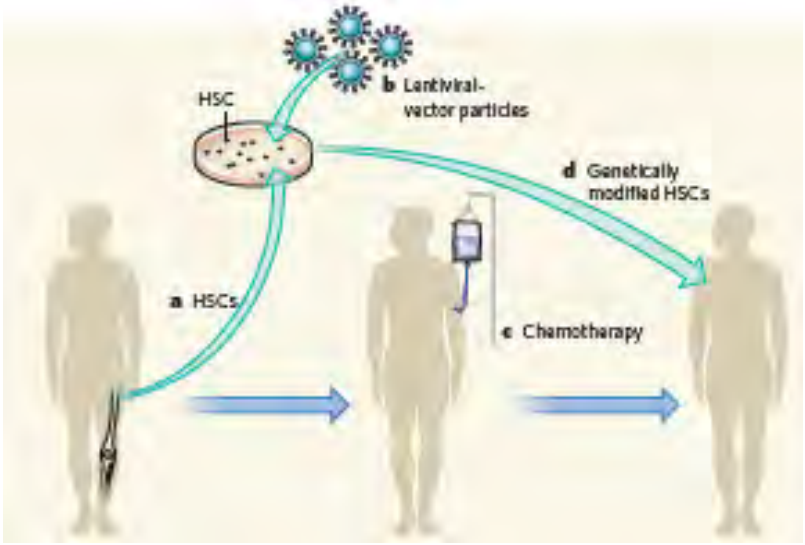
導入した他人の遺伝子改変T細胞は患者の細胞を異物として認識せず、攻撃しない

抗原提示細胞

癌細胞

遺伝子改変キラーT細胞
（この場合は、他人のT細胞を応用）

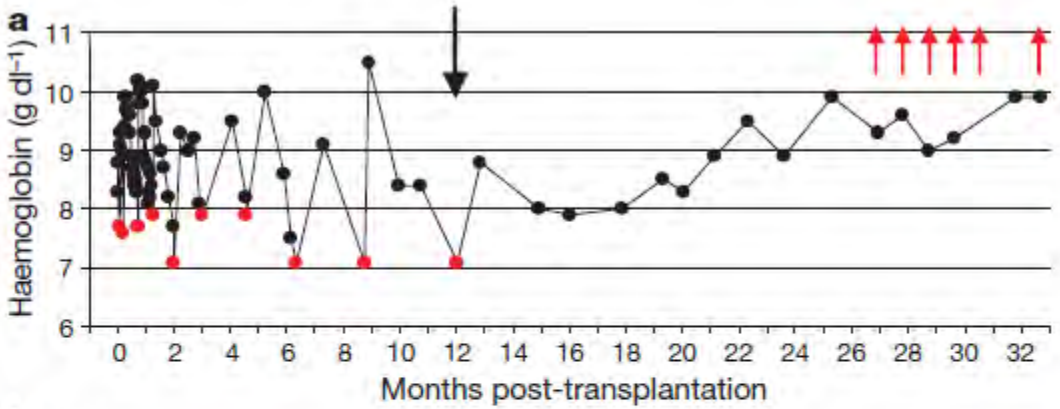
レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

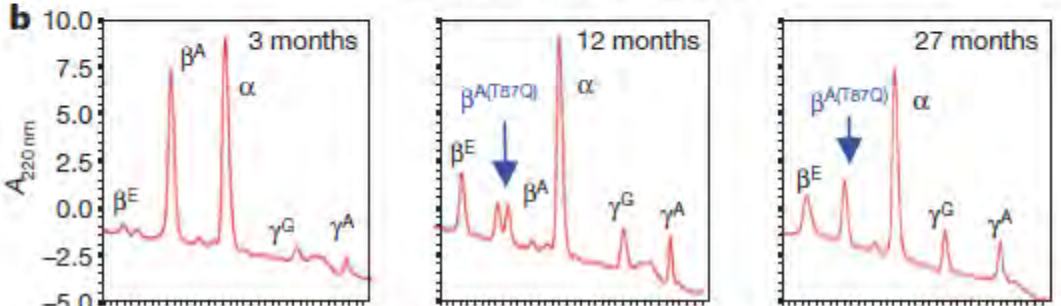


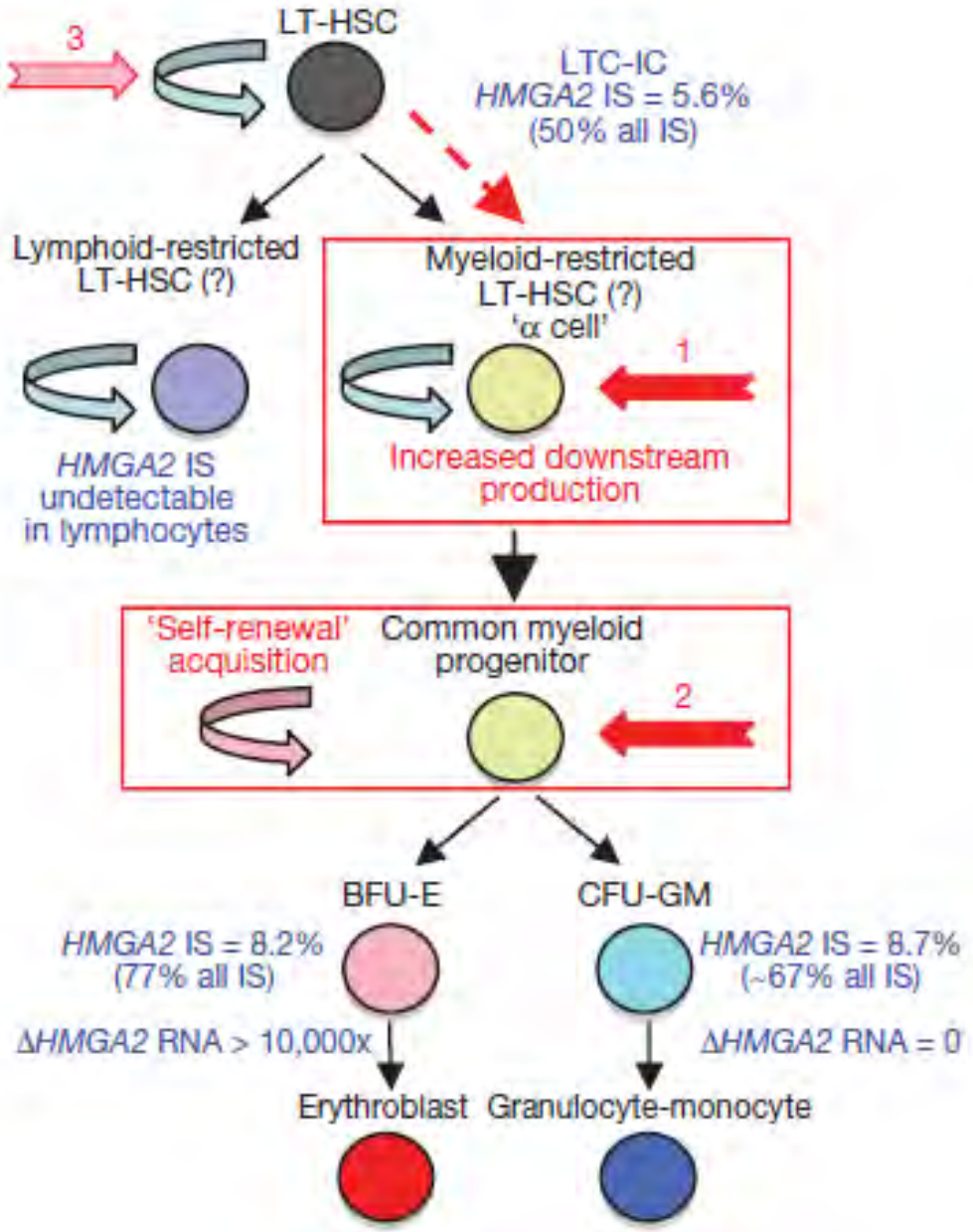
βサラセミアの遺伝子治療

遺伝子挿入によるHMGA2の高発現が赤芽球特異的に認められ、細胞クローンの増殖の危険性がある

(Nature 467, 318-322, 2010)







BCL11Aのエンハンサーノックアウトによるサラセミアの遺伝子治療

・A recent study employed TALENs to introduce a single point mutation within the β-globin locus to increase the expression of γ-globin.

・Interference with the expression of BCL11A, a major regulator of β-globin gene expression, has also been shown to promote the expression of γ-globin.

・An erythroid-specific enhancer for BCL11A expression was recently identified by Bauer *et al*.

・Targeted elimination of this enhancer in patient-derived HSCs could allow the induction of γ-globin expression in erythroid cells without affecting BCL11A-dependent processes in other lineages.

・This could be achieved through an NHEJ approach, unimpeded by the low frequency that currently limits strategies depending on HDR.

・However, in the future, the latter could be applied to the correction of patient-derived iPSCs, thus circumventing the issue of HDR efficiency, since a large number of cells can be generated from a few corrected clones.

(F1000Research 2015, 4(F1000 Faculty Rev):1431 Last updated: 25 MAY 2016)

体細胞でのゲノム編集を用いた遺伝子修復によって治療が期待される疾患の選択

• 修復効率はそれほど高くなくても遺伝子修復細胞が変異細胞の中で選択的増殖を期待できる疾患
X-SCID, 遺伝性高チロシン血症Ⅰ型、ファンコニ貧血　など？

• 現在の遺伝子治療で有害事象が認められる、あるいは、その可能性がある疾患
X-SCID, β-thalassemia　など？

・部位特異的挿入法(たとえばAAV-S1領域に挿入して強発現）を用いるのなら、多くの疾患を対象とできる（現在の遺伝子治療法に取って代わることが可能）

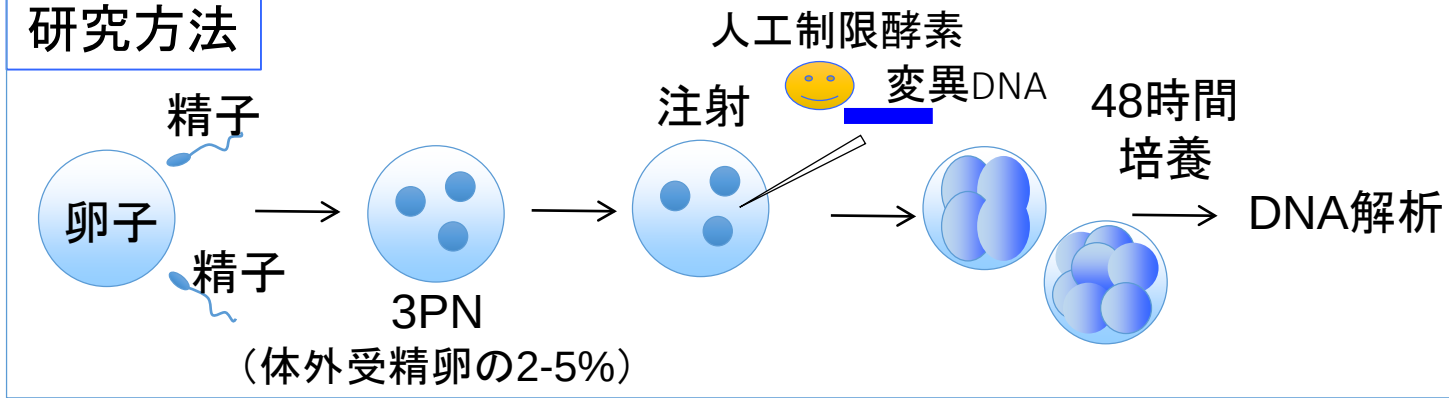
問題点；オフターゲット効果に加えて以下のような問題点が考えられる。
• *ex vivo*の場合（細胞を培養状態で修復して移植）
正確に修復された細胞をクローニング可能か？
遺伝子修復後の細胞を移植可能な数量まで培養可能か？

• *in vivo*の場合（直接体内で修復）
人工制限酵素とウイルスベクターの免疫原性

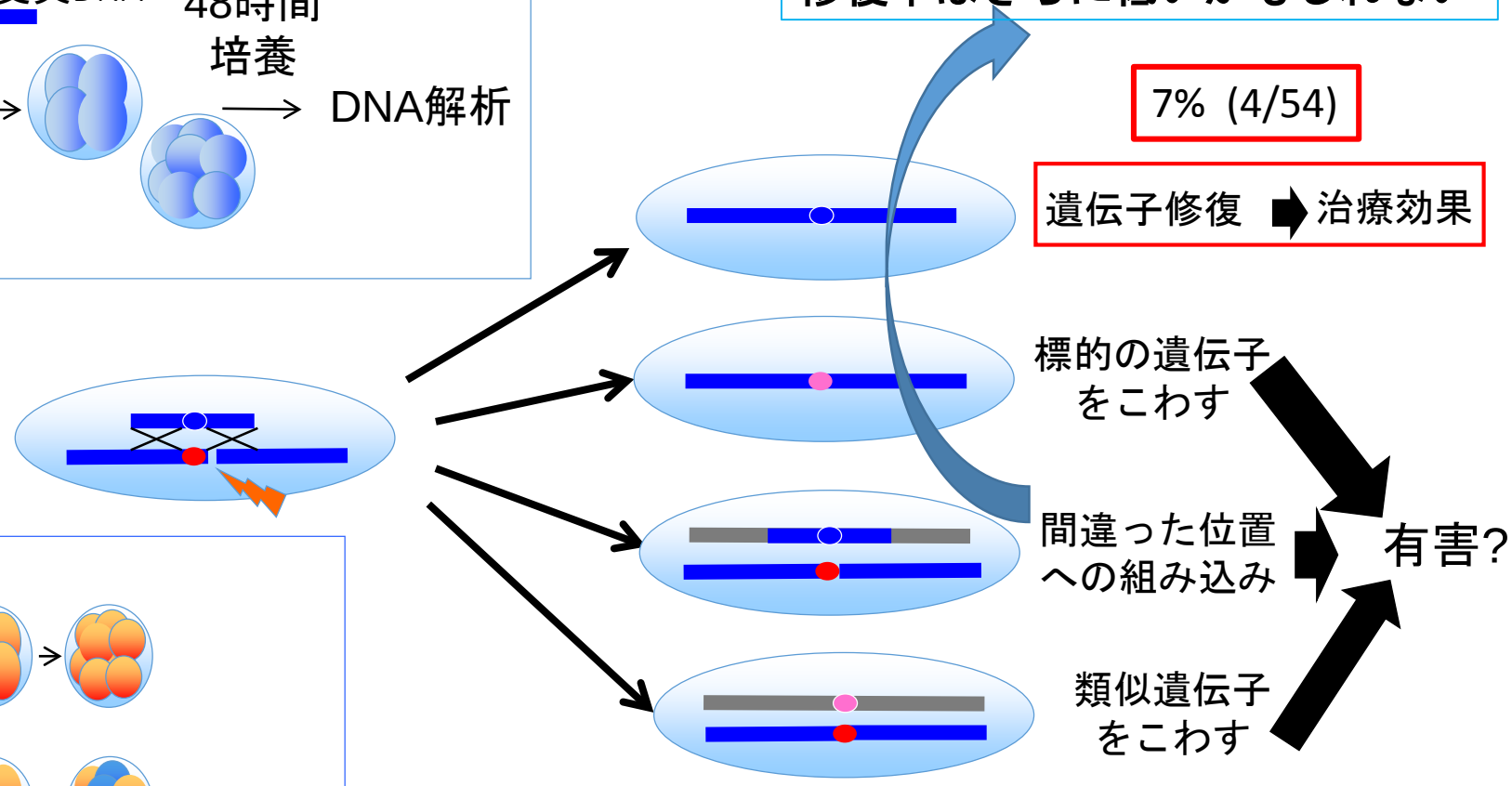
CRISPR/Cas9によるヒト3前核受精卵のゲノム編集

中国の研究者が重症貧血のβサラセミアの治療を目指し、3核を持つヒト受精卵(正常の発生は不可）のβグロビン遺伝子のゲノム編集を行った(2015年4月発表）（*Protein Cell.* 6: 363-72, 2015）

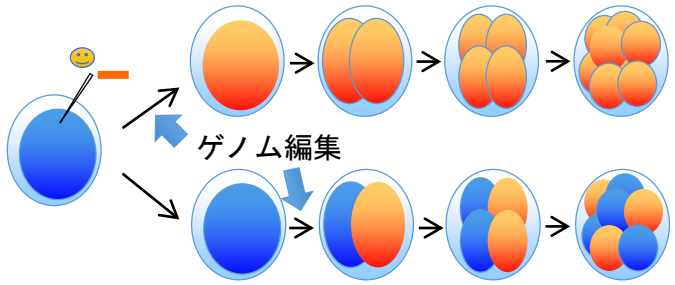
研究方法



全ゲノム配列を調べていないので修復率はさらに低いかもしれない



モザイクの問題



ヒト生殖細胞の遺伝子改変の禁止

１．遺伝子治療等臨床研究に関する指針　平成２７年８月１２日　厚生労働省

第一章　総則

第七　生殖細胞等の遺伝的改変の禁止

人の生殖細胞又は胚（一の細胞又は細胞群であって、そのまま人又は動物の胎内において発生の過程を経ることにより一の個体に成長する可能性のあるもののうち、胎盤の形成を開始する前のものをいう。以下同じ。）の遺伝的改変を目的とした遺伝子治療等臨床研究及び人の生殖細胞又は胚の遺伝的改変をもたらすおそれのある遺伝子治療等臨床研究は、行ってはならない。

２．日米遺伝子細胞治療学会からの共同声明　平成27年8月1日　Mol. Therapy 2015.

“our Societies support a strong ban on human germ-line gene editing or other germ-line genetic modification unless and until these technical and ethical problems can be solved, broadly and deeply discussed, and societal consensus reached.”

３．人のゲノム編集に関する関連4学会からの提言　（平成28年4月22日）

“人の生殖細胞や胚に対するゲノム編集の臨床応用については、全ての医療関係者やあらゆる分野の技術者、研究者に対し禁止する措置をとるよう国に要望する。”

体細胞を対象としたゲノム編集による遺伝子治療について

(Mol. Ther. 24, 430-446, 2016)

想定されるリスク

・現在のゲノム編集では基本的に、DNAの二重鎖切断(DSB)が避けられないが、DSBはゲノム不安定性(genomic instability)を引き起こすことはよく知られている。それによって染色体の転座、欠失、異数性などが誘発され、発がんや各種疾患の発症の危険性が増大する。
・オフターゲット効果による細胞機能の異常の可能性。

現状の認識

・ゲノム不安定性を直接評価する方法が、現時点では存在しないため、代わりに、ゲノム編集を受けた細胞の機能評価で、安全性や毒性を評価せざるを得ない、ことを認識する。
・一方で、DSBは、ゲノム編集を受けなくても、生体内で恒常的に起こっている。
・DSBの頻度が問題。

フォローアップのあり方

１．安全性や毒性を最小限に抑えるための技術革新

１）非標的部位でのDSBやその結果おこる挿入・欠損(indel)を最小限にとどめる技術改良

①　変異Cas9：4つの変異によってoff-target effectを抑えたhigh-fidelity Cas9 (Nature. 2016 Jan 28;529(7587):490-5）

②　Nickase：DNA二本鎖の片側のみを切断することにより特異性をあげる（Cell. 2013 Sep 12;154(6):1380-9）

③　Guide RNAの塩基配列や修飾による特異性増強

２）Off-targetの検索法の技術革新：

①　Biased method; Bioinformaticsを用いた予想配列を次世代シーケンサーによって検証する方法。
次世代シーケンサーのエラー頻度から判断して検出限界は約0.01%であるが、現在はシーケンス法の技術向上によりさらに精度が上がりつつある。しかし全off-target siteを網羅できている保証はない。

②　Unbiased method：Guide-seq, HTGTS, BLESS, Digenome-seqなど。
Guide-seqはDSBによりNHEJが起こる際にdsODNを取り込ませ，　全ゲノム上でその取り込み部位を検出。

２．Ex vivoあるいはin vivoでゲノム編集を受けた個体の長期のフォローアップ

・X-SCID遺伝子治療では、3年後に白血病が相次いで出現した。
・ADA欠損症の遺伝子治療では、遺伝子治療製品の承認まで患者を14年間追跡した。