

トリプレックス・デジタル PCR を用いたガンマレトロウイルスベクター産生細胞のクローン選択における正確で頑健なベクターコピー数測定法の開発

Development of accurate and robust vector copy number determination method in gammaretroviral vector producer cell clones using triplex digital PCR

2025 年

千葉大学大学院 医学薬学府 先端創薬科学専攻

飯田 友峰

目次

要旨	- 3 -
序論	- 5 -
実験の部	- 12 -
細胞および培地	- 12 -
試料の調製	- 12 -
2-1. ガンマレトロウイルスベクター産生細胞株の構築	- 12 -
評価方法	- 12 -
3-1. qPCR による VCN の測定	- 12 -
3-2. ddPCR による VCN の測定	- 13 -
3-3. サザンブロットによる VCN の測定	- 16 -
3-4. マルチカラー FISH による染色体の解析	- 16 -
結果	- 18 -
第一章 標的遺伝子のプライマー設計	- 18 -
1-1. ガンマレトロウイルスベクター産生細胞の VCN 測定のためのターゲット領域 の選定	- 19 -
1-2. パッケージングシグナル領域の配列比較	- 19 -
第二章 参照遺伝子の選定	- 22 -
2-1. FISH による PG13 細胞の染色体数の確認	- 22 -
2-2. NIH3T3 細胞と PG13 細胞の染色体数の比較	- 22 -

2-3. ddPCR による PG13 細胞と NIH3T3 細胞の参照遺伝子候補の比較	- 23 -
第三章 複数の参照遺伝子を用いた ddPCR による VCN 測定法の開発 - 28 -
3-1. 最適アニーリング温度の決定 - 28 -
3-2. 複数の参照遺伝子を用いた VCN 測定法の開発 - 28 -
第四章 qPCR およびサザンブロットとの比較 - 32 -
4-1. ウイルスベクター産生細胞のクローンを用いたサザンブロット、qPCR と ddPCR の比較 - 32 -
4-2. 実際のクローンセレクションにおける参照遺伝子数の変化に対する頑健性の 検証 - 33 -
考察 - 39 -
謝辞 - 42 -
参考文献 - 43 -
主論文目録 - 51 -
主査及び副査名 - 52 -

要旨

【目的】

ガンマレトロウイルスベクターは、ウイルスベクター安定産生細胞を構築して生産することが可能なことから、キメラ抗原受容体(CAR)-T 細胞療法を含む細胞治療や遺伝子治療製品に広く用いられている。安定産生細胞を構築する過程では、適切なクローンを選択するためにベクターコピー数(VCN)を評価することが不可欠である。なぜなら、VCN が過剰になると相同組換えのリスクが高まり、品質試験における変異検出が困難になるからである。従来法であるサザンブロットはスループットが低く、定量 polymerase chain reaction(PCR)は正確性に限界がある。本研究では、PCR 効率に影響されることなく、高い正確性とスループットを有するドロップレットデジタル PCR (ddPCR)を用いて、ガンマレトロウイルスベクター安定産生細胞における VCN を測定する方法を確立することを目的とした。

【方法】

代表的なガンマレトロウイルスベクターであるマウス白血病ウイルスベクターおよびマウス幹細胞ウイルスベクターに共通するパッケージングシグナル配列を標的としてユニバーサルなプライマー・プローブセットを設計した。ガンマレトロウイルスベクターのパッケージング細胞株として、PG13 を用いた。PG13 細胞の核型解析により安定していると考えられる染色体上に存在する遺伝子を VCN 測定のための参照遺伝子として選択し、標的遺伝子と2つの参照遺伝子を同時に測定可能なトリプレックス ddPCR 法を開発した。この分析法の正確性は、3つの異なる CAR 配列とベクターバックボーンをもつウイルスベクターで遺伝子導入したガンマレトロウイルスベクター安定産生細胞株を用いて検証した。

【結果】

安定な参照遺伝子として *Rpp25* と *Pgk1* を選定し、パッケージングシグナル配列を標的としてトリプレックス ddPCR 法を開発した。開発した ddPCR 法は複数のクローンが混ざっている場合を除き、サザンブロットの結果と高い一致を示すことから、VCN を正確に評価できることが示された。トリプレックス ddPCR は、2 つの参照遺伝子の濃度比を用いることで、細胞株の異数性によりクローン選択操作等で参照遺伝子コピー数が変化しても検出でき、頑健に VCN を決定することが可能であった。

【結論】

開発したトリプレックス ddPCR 法は、ガンマレトロウイルスベクター安定産生細胞株において正確性が高く頑健でハイスループットに VCN を決定することを可能とし、細胞治療や遺伝子治療への適用に最適なクローンの選択を容易とした。この研究では、特に染色体が不安定な細胞株において、正確な VCN 評価を確実にするために複数の参照遺伝子を用いることの重要性を示した。本手法は細胞治療や遺伝子治療の開発において、より迅速で効率的なガンマレトロウイルスベクター安定産生細胞株のクローン選択に有用であると考ええる。

序論

キメラ抗原受容体(Chimeric antigen receptor; CAR)-T 細胞療法は近年その高い効果から積極的に開発されており、注目を浴びている(June et al., 2018)。CAR-T 細胞療法は、患者の血液から分離した T 細胞に対し、CAR 遺伝子をウイルスベクター等の方法で遺伝子導入し、体外で増幅培養することで製造した細胞を投与する細胞療法であり、いわゆる *ex vivo* 遺伝子治療の一種である (Dabas and Danda, 2023)。CAR はがん細胞等を認識する抗原認識部位と細胞内シグナル伝達ドメインをつなげた人工的に作られた受容体であり(Sadelain, Brentjens, and Riviere, 2013)、CAR-T 細胞は投与されるとがん細胞を認識し攻撃する(Dabas and Danda, 2023)。CAR-T 細胞療法の遺伝子導入方法はさまざま検討されているが(Lukjanov, Koutna, and Simara, 2021)、現在承認済みの CAR-T 細胞療法は遺伝子導入にすべてウイルスベクターを利用している(Rossi and Breman, 2024)。

ウイルスベクターの中でも、ガンマレトロウイルスベクターは最も初期に開発されたウイルスベクターで、CAR-T 細胞療法を含む細胞療法や遺伝子治療製品に広く使用されている (Cornetta et al., 2018; Watanabe and McKenna, 2022)。臨床での豊富な使用実績があり、日米欧で承認されている YESCARTA 等の CAR-T 細胞療法で使われている (European Medicines Agency, 2018; Irving et al., 2021)。ガンマレトロウイルスベクターは主に 4 つの構成要素からなっており、ウイルスベクターのゲノム RNA と、ウイルスベクターの粒子構造を形成する Gag タンパク質、逆転写等の遺伝子複製に関わる酵素である Pol タンパク質、宿主への感染に関わるエンベロープを形成する Env タンパク質から構成される。ガンマレトロウイルスベクターを生産するには、この 4 つの要素を供給する必要があるが、これらの遺伝子を宿主細胞に組み込み、安定的に発現する安定産生細胞株を構築する

方法と、プラスミド DNA として遺伝子を宿主細胞に一時的に導入して発現させる一過性発現により生産する方法がある (Coroadinha et al., 2010; Maetzig et al., 2011)。ガンマレトロウイルスベクターは、安定産生細胞株の構築が可能であることに主な利点がある (Mekkaoui et al., 2023)。

一般に、ウイルスベクター安定産生細胞は、パッケージング細胞と呼ばれる細胞株にウイルスベクターゲノムを導入することで構築される。パッケージング細胞は *gag*、*pol*、*env* 遺伝子があらかじめゲノムに組み込まれた細胞株である。ウイルスベクターゲノムは、遺伝子発現や組み込みに関わる Long Terminal Repeat (LTR) と、ウイルスベクターゲノム RNA がウイルス粒子に取り込まれる際に必要な配列であるパッケージングシグナル (Ψ) を含んだウイルスベクターバックボーンに、目的遺伝子 (Gene-of-Interest; GOI) を挿入した配列からなる。安定産生細胞株ではこのように組み込まれたウイルスベクターゲノムと Gag、Pol、Env の 4 つの構成要素が発現してウイルスベクターが産生される (Coroadinha et al., 2010; Maetzig et al., 2011)。

安定産生細胞株は構築に時間がかかるが、遺伝的に均一な細胞集団としてクローン化した細胞株を構築することで、ロット間のばらつきが少なく、より一貫した品質のベクターを生産可能である。一方で、一過性発現は生産までの開発を比較的短期間で行うことができるが、プラスミド DNA の大量調製や複雑な遺伝子導入工程が必要でスケールアップが難しく、均一な品質のウイルスベクターを生産するのが難しい (Ghani et al., 2019; van der Loo and Wright, 2016)。このことから、Cornetta et al. (2023) で言及されているように、アメリカ食品医薬品局 (United States Food and Drug Administration; U.S. FDA) は適切かつ安定したウイルスベクターの供給を確保するために、ガイドライン (U.S. FDA, 2020) において安定産生細胞株を用いたウイルスベクター生産を推奨している。

ウイルスベクターの安定産生細胞を構築する過程で、適切なクローンを選択するこ

とは、そのウイルスベクターを使用する製品の品質と患者の安全性にとって極めて重要である。特に、宿主細胞に組み込まれたウイルスベクター遺伝子の数であるベクターコピー数 (Vector copy number; VCN) が過度に高いクローンはゲノム DNA の相同組換えのリスクが高い (Sheridan et al., 2000) ため、クローン選択の過程では VCN を考慮しなければならない。さらに、VCN が高いと、サンガーシーケンス解析を用いた品質管理試験において各コピーからのシグナルが重なり合うことで個々の変異を識別することが困難になり (Seroussi, 2021)、最終的に予期せぬ変異を含む細胞が患者へ投与されるリスクがある。また、細胞を用いた医薬品等の生産では、一般的に選択されたクローン細胞株から調製し、複数の容器に分注して保存したマスターセルバンクから製造されるが、医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation, ICH) ガイドライン Q5B においても、組換え DNA 由来の製品の生産におけるマスターセルバンクでのコピー数の測定が推奨されている (ICH, 1996) 。

VCN を測定する方法はいくつかあるが、定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction; qPCR) とサザンブロットが従来から広く用いられている (Yuan et al., 2007) 。qPCR では、コピー数が既知の内在性遺伝子 (参照遺伝子) と標的遺伝子の濃度比を求めることで、細胞内の特定遺伝子のコピー数を測定することができる。qPCR は迅速かつ高スループットの分析手法であるが、PCR の各サイクルは倍化反応であるため、qPCR では 1 コピーと 2 コピーの区別が難しい (Cai, Dudley, and Patron, 2021) 。さらに、正確な測定には参照遺伝子と標的遺伝子の PCR 効率の違いを考慮する必要があり、qPCR で必要なレベルの精度を達成する測定系の設計は困難である (Hindson et al., 2011) 。PCR 効率はサンプルの純度、周辺配列 (Nogva and Rudi, 2004) 、コンフォメーション (Lin, Chen, and Pan, 2011) など様々な要因に影響される。したがって、qPCR で大量のサンプルを扱う場合、クローン間のばらつきはクローン選択において避けられない。一方サザンブロットはクローンのコピー数を整数値で決定することができ

るが、大量の DNA を必要とし、電気泳動と転写の工程があるためスループットが低い (Yuan et al., 2007)。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization; FISH) も細胞調製やハイブリダイゼーションに時間を要するなどスループットの低い方法であり (Hu et al., 2014)、3-5 Mb 以下の小さな挿入は検出できない (He et al., 2023)。大量の DNA 配列を高速かつ並列的に解読する次世代シーケンス解析もコピー数の評価に使用できるが、前処理とデータ解析の技術の複雑さと高コストにより、その応用は限定的である (Cai et al., 2021)。

これに対して、デジタル PCR (digital PCR; dPCR) は VCN の測定に適したハイスループットの方法である。dPCR は測定対象となる DNA を含むサンプルを微小な領域に区画化し、PCR 反応により DNA を増幅した後、エンドポイントでシグナルが増幅された陽性区画の数を数えることで、サンプル中の遺伝子の絶対定量が可能な方法である。この手法では微小区画への DNA の分配がポアソン分布に従うことを利用した統計学的モデルにより、陽性区画の数から元のサンプル中の DNA 分子数を算出する (Vogelstein and Kinzler, 1999)。コピー数の測定には qPCR と同様に参照遺伝子との比較が必要であるが、エンドポイントでの測定であるため、参照遺伝子と標的遺伝子の PCR 効率の違いによる影響は排除できる。したがって、dPCR はハイスループットかつ正確にコピー数を調べる最適な方法である。ドロップレットデジタル PCR (droplet digital PCR; ddPCR) とは、マイクロ流路を用いてエマルジョンに封入することで区画化を容易にした手法であり (Hindson et al., 2011)、代表的な dPCR 手法である。ほかに微細なウェルを持つプレートやチップを用いて区画化する方式の dPCR がある (Quan, Sauzade, and Brouzes, 2018)。

本研究では、ddPCR を用いてレトロウイルスベクター産生細胞クローンの VCN を測定する方法を開発した。広く適用可能な分析法を開発するために、我々はガンマレトロウイルスベクターの作製に広く用いられているパッケージング細胞株である PG13

(Miller et al., 1991) を用いた。PG13 について、ガンマレトロウイルスベクターの安全性を調査した Cornetta et al. (2018) の論文で、臨床試験で使用されたベクター産物の大部分は PG13 パッケージング細胞株で構築されたことを言及している。PG13 はマウス細胞株 NIH3T3 に由来し、そのゲノムにはマウス白血病ウイルス (Murine leukemia virus; MLV) 由来の *gag-pol* 遺伝子とテナガザル白血病ウイルス (Gibbon-ape leukemia virus; Galv) 由来の *env* 遺伝子が別々に組み込まれている (図 1)。MLV ベースのベクターとその変異株であるマウス幹細胞ウイルス (Murine stem cell virus; MSCV) ベースのベクターは、いずれもレトロウイルスベクターのバックボーンとして広く用いられている。例えば、上市されている CAR-T 細胞製品である YESCARTA は、MSCV 由来の MSGV1 ベクターを用いて製造されており、その安定産生細胞のパッケージング細胞株として PG13 細胞が用いられている (European Medicines Agency, 2018; Irving et al., 2021)。MLV 由来の SFG ベクター (Bueler and Mulligan, 1996) も、T 細胞の遺伝子改変に広く用いられており、Bear et al. (2012) では臨床グレードのマスターセルバンクのほとんどが PG13 を使用して作成され、臨床試験の 30 件中 10 件が SFG ベクターを使用し、20 件中 15 件が MSGV1 ベクターを使用していたと報告している。特に CAR-T 細胞療法の開発初期段階においては、様々な CAR 配列が開発候補となる可能性がある。したがって、臨床試験で使用されるレトロウイルスガンマベクターのほとんどをカバーするためには、PG13 由来の MSCV および MLV ベースのガンマレトロウイルスベクターの両方に適用可能な VCN 測定法を設計する必要がある。

VCN 測定法を設計する際のもう一つの重要な要素は、参照遺伝子の数である。VCN を測定するには、コピー数既知の内在性遺伝子を参照遺伝子として使用する必要がある。正常な二倍体細胞では、参照遺伝子のコピー数は 2 であると仮定できる。実際、CAR-T 細胞の VCN 測定に dPCR を用いた報告は多いが、通常は 2 コピーに

設定されている (Kandell et al., 2023; Murphy et al., 2023; Phuphanitcharoenkun et al., 2024)。しかし、がん細胞 (Ma et al., 2023) や PG13 を含むほとんどの細胞株 (Didion et al., 2014) では、染色体数が変化する異数性が一般的に観察される。染色体数は、遺伝子導入、継代、クローン選択の際に変化する (He et al., 2023)。したがって、特に細胞株において、正確な VCN 測定のために参照遺伝子の数を調べることは重要である。さらに、分析法の頑健性を確保するためには、クローン選択時の参照遺伝子の変化に対応する必要がある。この問題を克服するために、我々は PG13 細胞の核型解析により安定な参照遺伝子を選択した後、2 つの参照遺伝子と 1 つの標的遺伝子を同時に測定するトリプレックス ddPCR 法を開発した。

このように、本研究では ddPCR を用いて正確で頑健な VCN 測定法を開発するために、標的遺伝子と参照遺伝子の両面からの検出方法を検討し、従来法である qPCR およびサザンブロットと比較した。本手法を用いることで、細胞・遺伝子治療用製品開発のためのウイルスベクター安定産生細胞のクローン選択において、迅速かつ信頼性の高い意思決定が可能となり、新規治療法を患者に迅速に提供するのにも有用であると考えている。

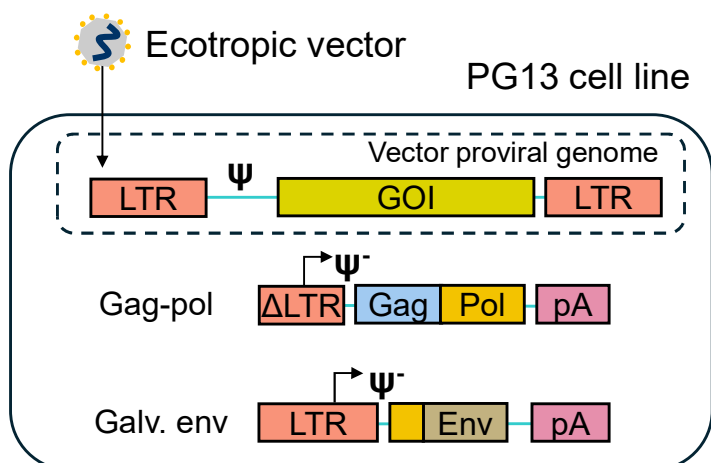


図 1 PG13 パッケージング細胞株とベクター産生細胞の構築

ガンマレトロウイルスベクター安定産生細胞を構築するためには、マウス細胞に感染可能なエクトロピックウイルスベクターを用いて、目的の遺伝子 (GOI) を保有するベクタープロウイルスゲノムをマウス由来パッケージング細胞である PG13 に導入する。このプロウイルスゲノムには LTR とパッケージングシグナル (Ψ) 領域を含み、ウイルスベクター生成の際に LTR 内部のプロモーターから転写されたベクターゲノムがベクター粒子の内部に取り込まれる。一方、PG13 細胞のゲノムに組み込まれた *gag-pol* と *Galv env* 遺伝子は、LTR プロモーターまたは 5'切断 (Δ) LTR プロモーターから転写されるが、下流の Ψ 領域は除去されている (Ψ^-)。ベクタープロウイルスゲノムのみが Ψ 領域を持つため、 Ψ 領域を標的としてプライマー・プローブを設計することにより、組み込まれた GOI のコピー数を測定することができる。

実験の部

細胞および培地

本研究では、以下の細胞株を使用した。293T (ATCC CRL-3216)、NIH3T3 (ECACC 93061524)、PG13 (ATCC CRL-10686) および PG13 由来の細胞はすべてダルベッコ改変イーグル培地 (シグマアルドリッチ社) に 10% のウシ胎児血清 (シグマアルドリッチ社) を添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で維持した。

試料の調製

2-1. ガンマレトロウイルスベクター産生細胞株の構築

ガンマレトロウイルスベクター産生細胞は、PG13 パッケージング細胞株 (Miller et al., 1991) から作成した。GOI を含むプラスミド (pGOI) は、CAR 配列を MSGV1 ベクター (MSGV1-CAR1 および MSGV1-CAR2 プラスミド) または SFG ベクター (SFG-CAR3 プラスミド) に挿入することにより作製した。Retrovirus Packaging Kit Eco (タカラバイオ株式会社) に含まれる pE-Eco および pGP プラスミドを、pGOI プラスミドとともに 293T 細胞に共導入した。得られた上清中のエコトロピックレトロウイルスを用いて PG13 細胞にウイルスベクターゲノム配列を遺伝子導入した。遺伝子導入した PG13 細胞は、シングルセルプリンター (Cytena 社) を用いてクローニングし、増殖培養した後、STEM-CELLBANKER GMP Grade (ゼノアックリソース株式会社) を用いて凍結保存した。

評価方法

3-1. qPCR による VCN の測定

ガンマレトロウイルスベクター産生細胞から抽出したゲノム DNA 100 ng を鋳型として、サイクリングプローブ法を用いたリアルタイム PCR を行った。装置は 7500 Fast リ

アルタイム PCR システム(Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。反応液は Cycleave PCR Reaction Mix(タカラバイオ株式会社)を用いて調製した。MSGV1-CAR1 および MSGV1-CAR2 を検出するためのターゲットとして MSCV のパッケージングシグナルを使用した。SFG-CAR3 を検出するためのターゲットとして MLV パッケージングシグナルを使用した。参照遺伝子としてマウス β アクチン(*Actb*) 遺伝子を用いた。

検量線は、1 コピーのウイルスパッケージングシグナルと 1 コピーの *Actb* を含む DNA コントロールテンプレートのコピー数を用いて作成した。この検量線を用いて各検体の DNA コピー数を算出した。VCN は、反応あたりのプロウイルス遺伝子コピー数を反応あたりの *Actb* コピー数で割り、ゲノム中の *Actb* のコピー数(3 コピー)を掛けることで算出した。

3-2. ddPCR による VCN の測定

ddPCR は、1 反応あたり 25 ng の抽出ゲノム DNA を鋳型として用いた。反応は ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA)を用いて行った。参照遺伝子のプライマー・プローブミックスは Bio-Rad 社から入手した。アッセイ ID を表 1 に示す。MLV/MSCV パッケージングシグナルをターゲットとするプライマー・プローブミックスは、Integrated DNA Technologies 社から入手した。フォワードプライマーおよびリバースプライマーの配列は 5'-TAGCTCTGTATCTGGCGGAC-3'および 5'-TAGCTCTGTATCTGGCGGAC-3'であり、プローブは 5'-[FAM]ACCCGGCCG [ZEN]CAACCCTGGGA[IBFQ]-3'である。プライマーとプローブは、それぞれ最終濃度 900 nmol/L と 250 nmol/L で使用した。

ドロップレット生成には Automated Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を使用した。すべての ddPCR 実験のサーマルサイクリングは、Bio-Rad C1000 Touch を用いた。増幅は 95°C で 10 分間、94°C で 30 秒間、56°C で 1 分間のサイクルを 40 サ

イクル繰り返した後、98°C で 10 分間酵素を不活性化する条件で行い、使用するまで 4°C に保持した。サーマルサイクリング後、ドロップレットを QX200 装置 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で測定した。QX200 の生データファイルは、QX Manager 1.2 Standard Edition (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用して解析した。コピー数は Droplet Digital PCR Applications Guide (Bio-Rad bulletin 6407) に従って計算した。各ターゲットの濃度は以下の式で計算した:

$$[\text{Concentration} = -\ln(N_{\text{neg}} / N) / V_{\text{droplet}}].$$

コピー数は以下の式によって求めた:

$$[\text{Copy Number} = A / B \cdot N_b]$$

N_{neg} は陰性のドロップレット数、 N はドロップレットの総数、 V_{droplet} はドロップレットの体積 (0.85 nL)、 A は標的遺伝子の濃度、 B は参照遺伝子の濃度、 N_b は分析者が設定するゲノム中の参照遺伝子座のコピー数を表す。2 つの参照遺伝子を使用する場合、コピー数は 2 つの参照遺伝子のコピー数の幾何平均として計算した。すべての ddPCR 解析は $n=4$ で行った。QX Manager 1.2 Standard Edition から出力された Total error bar の値 (TotalConfMax と TotalConfMin) を 95% 信頼区間として使用した。この値は、標準誤差の 2 倍か、ポアソン分布に由来する理論分散から計算されるポアソン信頼区間 (PoissonConfMax と PoissonConfMin) のどちらか広い方が信頼区間の値となっている。

表 1 参照遺伝子の検出に用いたプライマー・プローブセット

Gene Symbol	Gene Name	Assay ID	Probe Fluorophore	MIQE Context
<i>Pgk1</i>	phosphoglycerate kinase 1	dMmuCNS915992703	HEX	mm10 chrX:106187123-106187245:+
<i>Pgk1</i>	phosphoglycerate kinase 1	dMmuCNS141211640	FAM	mm10 chrX:106187123-106187245:+
<i>Mbp</i>	myelin basic protein	dMmuCNS393153733	HEX	mm10 chr18:82474984-82475106:+
<i>Rpp25</i>	ribonuclease P/MRP 25 subunit	dMmuCNS851683235	HEX	mm10 chr9:57504001-57504123:+
<i>Apob</i>	apolipoprotein B	dMmuCNS407594696	HEX	mm10 chr12:7977782-7977904:+
<i>B2m</i>	beta-2 microglobulin	dMmuCNS576316288	HEX	mm10 chr2:122147587-122147709:+

3-3. サザンブロットによる VCN の測定

ガンマレトロウイルスベクター産生細胞から抽出した 10 μ g のゲノム DNA を用いてサザンブロットを行った。GOI 内の特定の部位と宿主ゲノム内のランダムな部位を切断する制限酵素 (MSGV1-CAR1 と MSGV1-CAR2 は *FbaI*、SFG-CAR3 は *EcoRI*) を用いてゲノム DNA を切断した。サンプルを DNA Molecular Weight Marker VII (DIG 標識; Roche Diagnostics 社) と共に 0.8% アガロースゲル上に添加し、100V の定電圧で約 4 時間電気泳動した。電気泳動後、DNA をアガロースゲルから正電荷を帯びたナイロンメンブレン (Roche Diagnostics 社) に移し、脱プリン化と中和を行った。ブロットイング後、メンブレンを DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics 社) 溶液中で 42°C、30 分間プレハイブリダイゼーションし、続いて PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて調製した DIG 標識プローブで 68°C、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを洗浄し、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics 社) でブロッキングし、10,000 倍に希釈した Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Diagnostics 社) と 30 分から 3 時間インキュベートし、その後洗浄した。CDP-Star, ready-to-use (Roche Diagnostics 社) をメンブレン上に滴下し、室温で 5 分間反応させた。その後、メンブレンを化学発光検出装置に入れ、露光、検出し、各サンプルのバンド数を確認した。

3-4. マルチカラー FISH による染色体の解析

マルチカラー FISH (multicolor FISH; mFISH) は、染色体メタフェーズ標本作製装置 (HANABI; ADSTEC, Funabashi, Japan) を用いて作製した標本を用いて行った。2 継代後の PG13 細胞をコルセミド処理 (0.025 μ g/mL、1 時間) で固定した後、低張処理 (0.075 M KCl 溶液、10 分間) し、カルノア溶液 (メタノール: 酢酸 = 3:1) を添加した。その後、標本を 72°C で 30 分間変性させ、氷上に置いた。21X Mouse Multicolor FISH Probe (Metasystems Probes 社) を変性させ、37°C で 40.5 時間標本とハイブリダイズさ

せ、洗浄し、DAPI で対比染色した。撮影は Zeiss Axio Imager Z2 顕微鏡を用いて行った。

結果

第一章

標的遺伝子のプライマー設計

本章では、広く臨床において使用されている MLV ベースのガンマレトロウイルスベクターと MSCV ベースのガンマレトロウイルスベクターの両方の安定産生細胞に適用可能なユニバーサルなプライマーを設計するために、ターゲットとする領域及び両ウイルスベクターに共通する配列について確認した。

MLV ベースのガンマレトロウイルスベクターは、レトロウイルスの中でも *gag*、*pol*、*env* という3つの主要な遺伝子のみをコードした比較的シンプルなゲノム構造をもつガンマレトロウイルスである MLV の一種、モロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus) に由来し、分裂細胞に効率的に遺伝子導入が可能である (Maetzig et al., 2011)。MSCV ベースのガンマレトロウイルスベクターはその改良版であり、マウス胚性幹細胞ウイルス (Murine embryonic stem cell virus; MESV) ベクターと MLV の変異株に由来する LN ベクターに由来している (Hawley et al., 1994)。LTR にマウス PCC4 細胞で継代して変異した骨髄増殖性肉腫ウイルス (PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus; PCMV) (Franz et al., 1986) 由来のエンハンサーが含まれ、LN ベクターの拡張パッケージングシグナルを持つ。MSCV は特に多能性幹細胞で遺伝子発現が向上している (Ramezani, Hawley, and Hawley, 2006)。なかでも MSGV1 (MSCV-based splice-gag) ベクター (Hughes et al., 2005) は MSCV ベクターの LTR と SFG ベクターに由来する SFGtcLuc+ITE4 ベクター (Lindemann et al., 1997) の拡張 *gag* 領域と *env* スプライシングサイトを持つベクターで、広く臨床応用されている。

1-1. ガンマレトロウイルスベクター産生細胞の VCN 測定のためのターゲット領域の選定

MSCV と MLV ベースの両方に適用可能なユニバーサルなプライマーを設計するために、両ウイルスベクターに共通する配列について確認した。PG13 細胞株にはガンマレトロウイルスベクターのパッケージングに必要な *gag-pol* や *env* 遺伝子が組み込まれており、その発現にガンマレトロウイルスの LTR 由来のプロモーターが使われている (Miller et al., 1991) (図 1)。従って、LTR や *gag-pol* 遺伝子をターゲットにした場合は目的とするプロウイルスベクター以外に PG13 細胞中のそれらの配列も増幅されるため、PG13細胞中のVCN を調べる際には使用することができない。PG13細胞中の VCN を調べるためにはプロウイルスベクター配列のみに含まれるパッケージングシグナル部分をターゲットとする必要がある。

この条件に基づき、新たに MLV と MSCV のパッケージングシグナルに共通している配列をターゲットにしたプライマー・プローブセットを探索した。

1-2. パッケージングシグナル領域の配列比較

パッケージングシグナル配列の共通領域を確認するため、公開されている配列を比較した(図 2)。野生型 MLV ゲノム (GenBank アクセッション番号: NC_001501) および pMSGV1 (GenBank アクセッション番号: LP884022) の配列は GenBank データベースから入手した。SFG ベクターの配列は、一般に入手可能な SFG-ICAS9-P2A-M28z (米国特許出願 US20230312706A1) から情報を得た。さらに、市販のベクターである pMSCVhyg (タカラバイオ社、カタログ No.634401) および pQCXIN (タカラバイオ社、カタログ No.631514) の配列は公開されており、比較のために用いた。これら 5 つの配列のパッケージングシグナル領域を SnapGene ソフトウェア (www.snapgene.com) を用いて比較した。図 2 の黄色部分に示す配列が MLV の配

列と一致している領域であり、パッケージングシグナルの高度に保存された領域として、MLV ゲノムの 1 番目から 143 番目までの配列を選択した。変異のある部位は混合塩基として表現し、PrimerBLAST (Ye et al., 2012) を用いて候補プライマーセットを検索した。プライマーおよびプローブ配列として BLAST 検索でマウスおよびヒト遺伝子との相同性が低い配列を選択した。

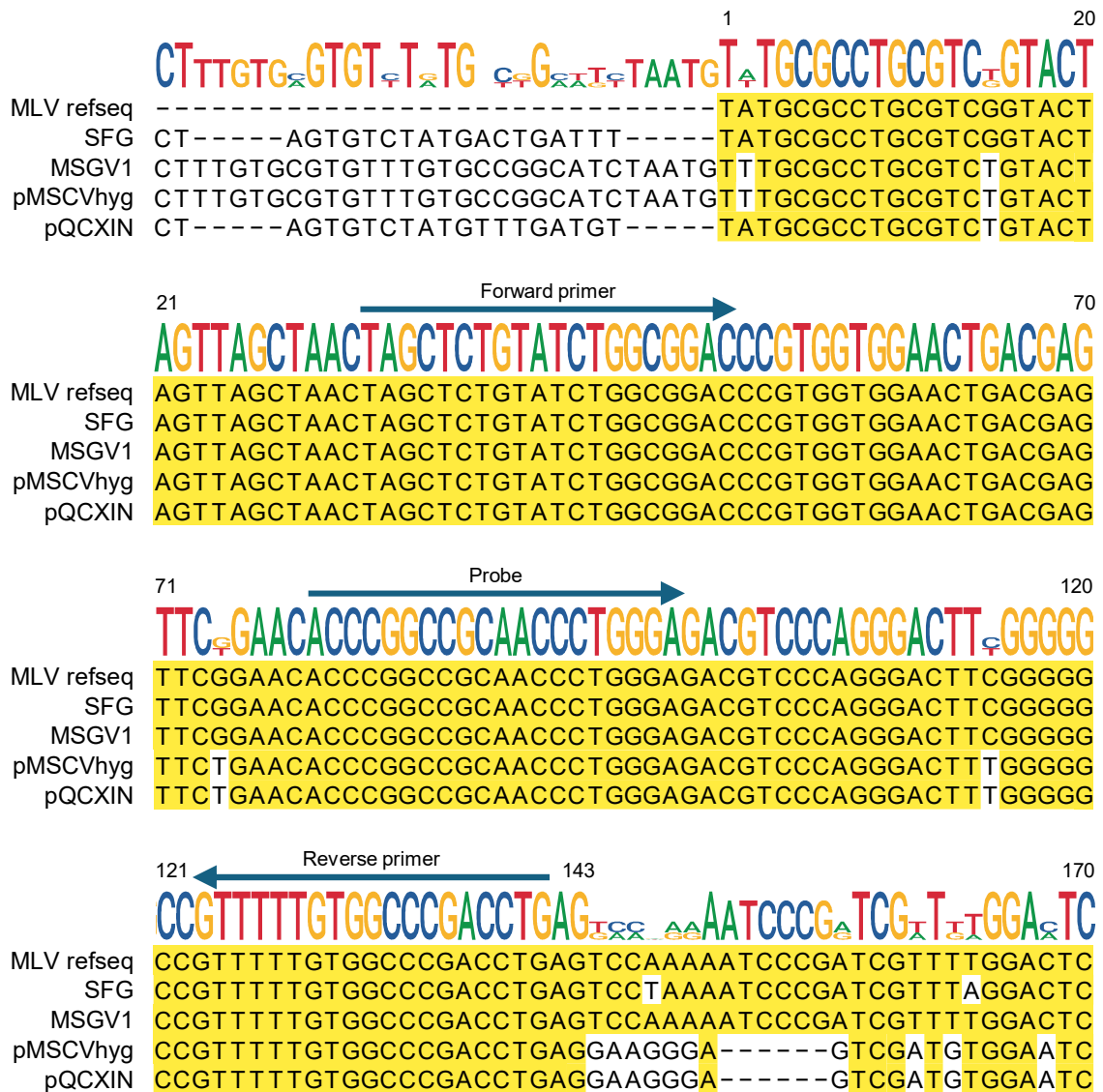


図 2 ガンマレトロウイルスベクターと MLV のパッケージングシグナル配列の比較

黄色部分は野生型 MLV の塩基配列およびその配列に一致するガンマレトロウイルスベクターの塩基配列を示す。PrimerBLAST で選択したフォワードプライマー、リバープライマーおよびプローブの位置はそれぞれ矢印で示した。

第二章

参照遺伝子の選定

本章では VCN 分析法を設計する際の重要な要素である参照遺伝子を選定した。VCN を測定するには、既知の内部遺伝子のコピー数を参照する必要がある。本研究で用いた PG13 を含むほとんどの細胞株では、染色体数が変化する異数性が一般的に観察される。そのため、PG13 中の染色体数を確認し、安定していると考えられる染色体上の遺伝子を参照遺伝子として選定した。

2-1. FISH による PG13 細胞の染色体数の確認

参照遺伝子候補が存在している染色体の数を調べるために、各染色体に特異的に結合する蛍光プローブを用いることで、全染色体を 1 度のハイブリダイゼーションで識別可能な手法である mFISH を用いて PG13 細胞の核型解析を行った(図 3)。正常なマウスの染色体数は 2 倍体(2n)で 40 本であるが、20 細胞の染色体の本数を調べたところ、3 倍体(3n)が優勢で、最頻染色体数は 65 本であった(図 4)。このうち 8 つの細胞で核型を調査した。8 細胞全てに一貫して 9 番染色体、12 番染色体、16 番染色体、18 番染色体は 3 本存在し、X 染色体は 2 本存在しており、構造異常は 4 番染色体、5 番染色体、13 番染色体、14 番染色体、15 番染色体、17 番染色体で観察された。

2-2. NIH3T3 細胞と PG13 細胞の染色体数の比較

安定した染色体をさらに探索するために、先行文献 (Leibiger et al., 2013) の核型情報を用いて、PG13 細胞の核型を親 NIH3T3 細胞の核型と比較した。PG13 細胞と

NIH3T3 細胞の両方で、9 番染色体、18 番染色体、X 染色体の本数はそれぞれ同じであった。従って、これらの染色体は比較的安定していると考え、その染色体に位置する遺伝子で市販のプライマー・プローブセットが入手可能なものを参照遺伝子の候補として選択した。以上から、PG13 細胞、NIH3T3 細胞ともに 3 コピー存在すると推定される *Rpp25* (9 番染色体) と *Mbp* (18 番染色体)、X 染色体上に 2 コピー存在すると推定される *Pgk1* を選択した。

2-3. ddPCR による PG13 細胞と NIH3T3 細胞の参照遺伝子候補の比較

核型解析でみられた PG13 と NIH3T3 のコピー数の違いが ddPCR でも検出できるか比較した。選択した *Rpp25*、*Mbp*、*Pgk1* の他、核型解析からはコピー数が異なると考えられる *B2m* (2 番染色体) と *Apob* (12 番染色体) についても ddPCR を行った。X 染色体上に存在する *Pgk1* のコピー数を 2 コピーとしたときの PG13 細胞と NIH3T3 細胞における常染色体遺伝子のコピー数を比較した (図 5)。

その結果、PG13 の常染色体遺伝子はすべて約 3 コピーであり、これは mFISH の結果と一致した (図 6)。NIH3T3 細胞では、*Rpp25* と *Mbp* はともに約 3 コピーで PG13 と一致したが、*B2m* と *Apob* は約 4 コピーで PG13 とは異なった。この結果は文献 (Leibiger et al., 2013) 上の NIH3T3 細胞の染色体数と一致した。さらに、遺伝子によって増幅効率が異なるため、エンドポイントの蛍光の絶対値は異なっていた。特に *Mbp* はプライマー設計が最適化されていないため増幅効率が悪く、バックグラウンドとの識別性が低いことから、参照遺伝子としては不適當であることが示唆された (図 5)。そこで、*Pgk1* と *Rpp25* を適切な参照遺伝子として選択した。

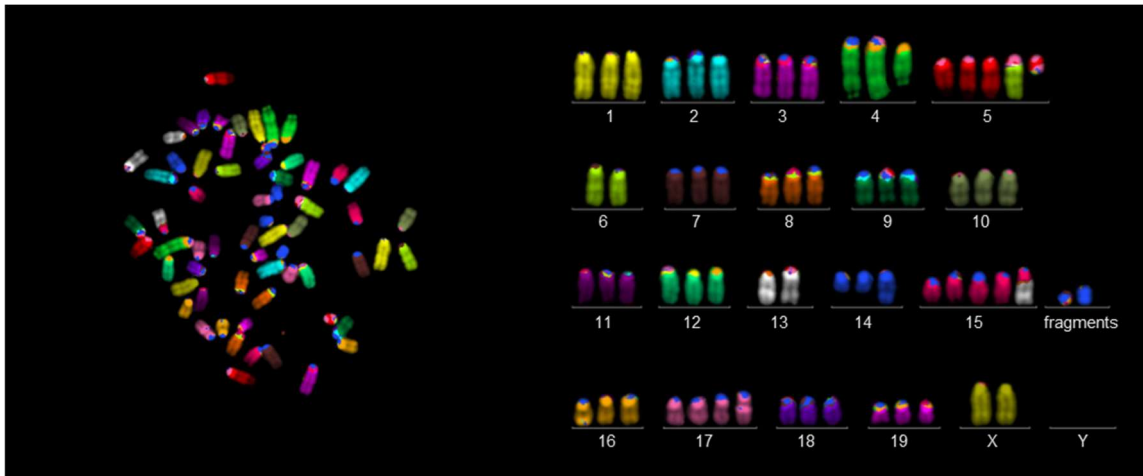


図 3 mFISH による PG13 細胞の核型解析

PG13 細胞の展開像(左)と核型画像(右)の代表画像を示す。例えば 5 番染色体は 5 本あり、そのうち 2 本には 6 番染色体の転座やセントロメアが 2 つあるなどの構造異常がみられる。染色体小断片(fragments)は mFISH プローブで染まらず DAPI のみで染まり、セントロメア領域に見られる特徴を示す。

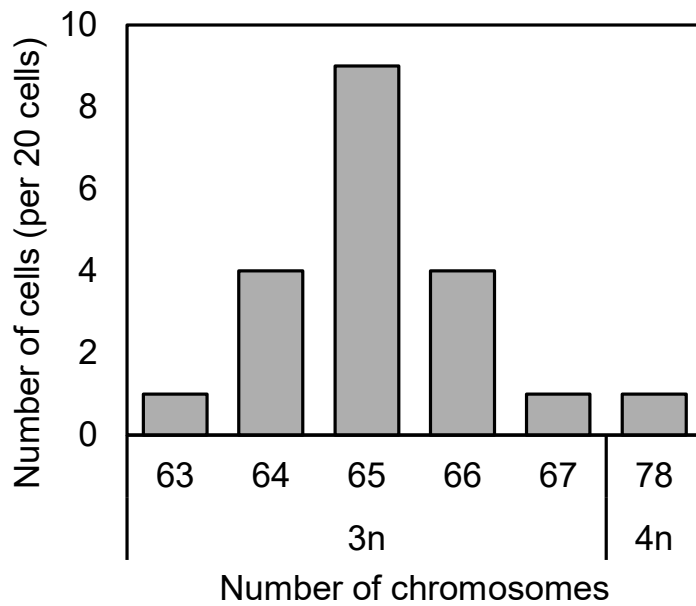


図 4 PG13 細胞の染色体本数解析

調べた 20 細胞の PG13 細胞の核型のうち、主要倍数体は 3n で、最頻染色体数は 65 であった。染色体小断片は 1 本の染色体としてカウントした。倍数性の分類は正常なマウスの染色体数を $2n=40$ として染色体本数が最も近い倍数体に分類した。

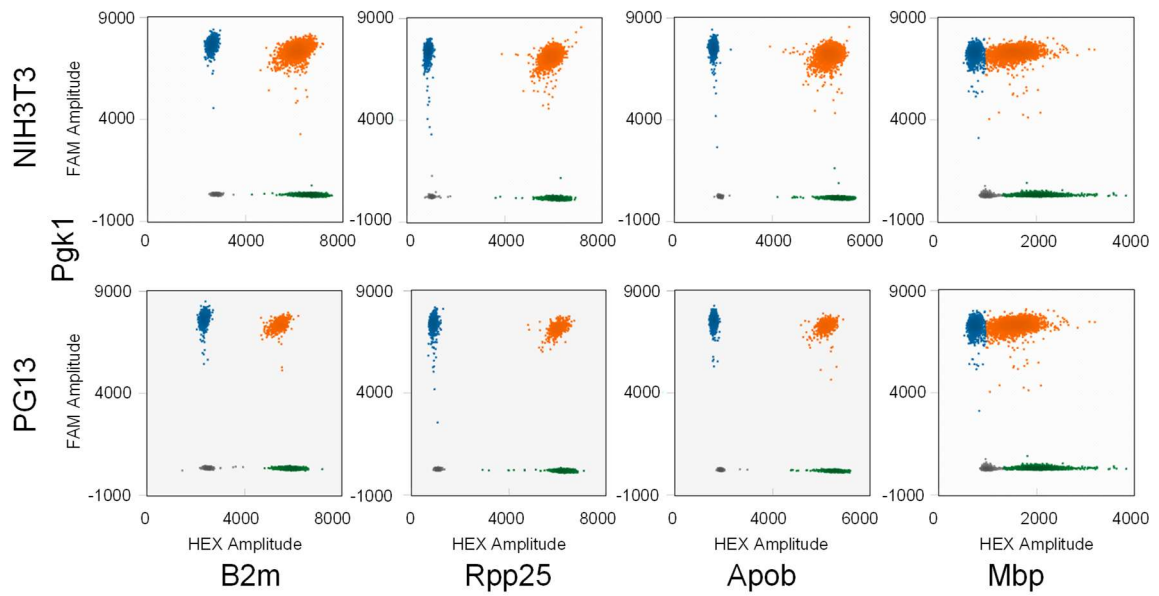


図 5 ddPCR による NIH3T3 細胞と PG13 細胞の参照遺伝子の検出

各参照遺伝子の 2D プロットにおける ddPCR の代表画像。X 軸に常染色体上に存在する *B2m*, *Rpp25*, *Apob*, *Mbp* を HEX で検出した値を示す。Y 軸に X 染色体上に存在する *Pgk1* を FAM で検出した値を示す。*Mbp* ではバックグラウンドの集団と分布が重なっており、区別が難しい。

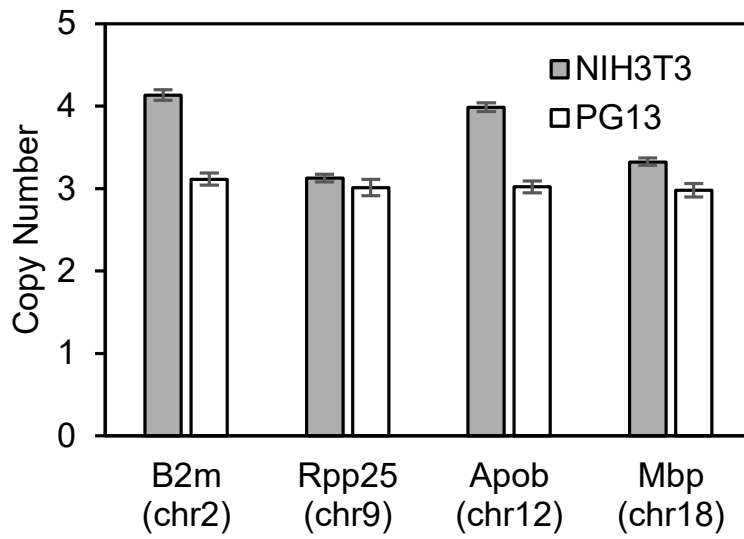


図 6 ddPCR による NIH3T3 細胞と PG13 細胞の参照遺伝子のコピー数の比較

X 染色体に存在する *Pgk1* のコピー数を 2 コピーに設定した場合の PG13 と NIH3T3 の常染色体上に存在する各参照遺伝子のコピー数。

第三章

複数の参照遺伝子を用いた ddPCR による VCN 測定法の開発

第一章ではターゲットとなる遺伝子を検出するプライマー・プローブセットを設計した。第二章では参照遺伝子候補を選定した。本章ではこれらの要素を組み合わせて、VCN 測定法の開発を行った。

3-1. 最適アニーリング温度の決定

標的遺伝子と選択した参照遺伝子に対するプライマー・プローブセットが正しく機能することを確認するため、サザンブロット法で測定し VCN が 1 コピーであることがあらかじめわかっているウイルスベクター産生細胞を用いた (MSGV1-CAR2 クローン No. 66)。まず、MLV/MSCV のパッケージングシグナルをターゲットとしたプライマー・プローブセットの最適なアニーリング温度を検討した (図 7)。その結果、53.7~64.3°C で良好な分離が得られ、56.0°C で最適な分離が得られたため、アニーリング温度を 56°C に決定した。

3-2. 複数の参照遺伝子を用いた VCN 測定法の開発

次に、3 つの遺伝子を同時検出するトリプレックス ddPCR を行う方法として amplitude multiplexing 法を用いた。amplitude multiplexing 法では、PCR 反応のエンドポイントの蛍光強度の差に基づいて、同じ蛍光チャンネルで 2 種類の遺伝子を同時に測定することが可能である (Whale, Huggett, and Tzonev, 2016)。ddPCR の結果から、*Rpp25* はバックグラウンドの蛍光と比較して明確な分離を示したため、参照遺伝子として用いた。また、常染色体上の遺伝子とはコピー数が異なると考えられる、X

染色体上に存在する *Pgk1* を参照遺伝子とした。これら2つの参照遺伝子を用いて、MLV/MSCV のパッケージングシグナル(Ψ)を標的とした ddPCR を行った(図 8)。amplitude multiplexing 法では、*Rpp25* と *Pgk1* の蛍光シグナルは強度の違いから明確に区別できた。

Ψ 、*Pgk1*、*Rpp25* の濃度はそれぞれ 94.9、211、284 コピー/ μ L であった。 Ψ のコピー数を 1 とした場合、その比率は 1:2.22:2.99 コピーとなり、*Pgk1* は 2 コピー、*Rpp25* は 3 コピーに近く、核型解析の結果と一致した。そこで、VCN の算出には *Pgk1* のコピー数を 2、*Rpp25* のコピー数を 3 とし、QX Manager 1.2 Standard Edition (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてコピー数を算出した。算出されたサンプルの VCN は 0.958 (95%CI: 0.936, 0.980) であり、1 に近い結果であった。このことから設計したトリプレックス ddPCR は、導入遺伝子のコピー数を正確に測定可能であると考えた。

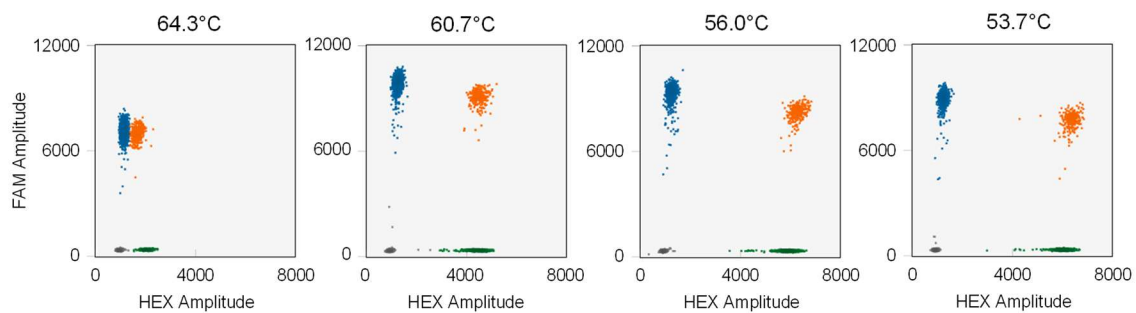


図 7 標的遺伝子に対するプライマー・プローブセットの最適アニーリング温度
 MLV/MSCV Ψ のプライマー・プローブセット(FAM; Y 軸)は 53.7-64.3°C で分離を示した。*Pgk1* (HEX; X 軸)は 56°C で最も良好な分離を示した。

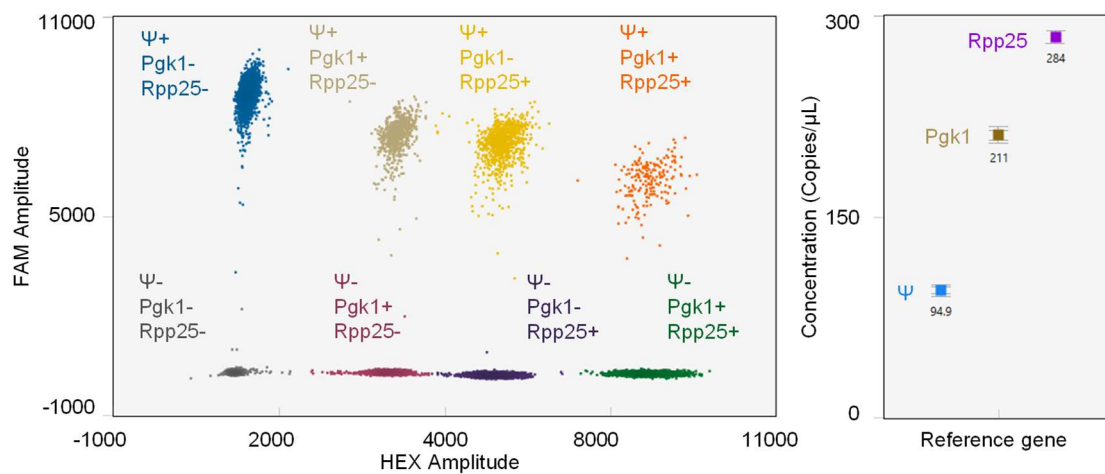


図 8 トリプレックス ddPCR によるガンマレトロウイルスベクター産生細胞の VCN 測定

標的遺伝子 (MLV/MSCV Ψ ; FAM; Y 軸) と 2 つの参照遺伝子 (*Pgk1*; HEX-low, *Rpp25*; HEX-high; X 軸) を用いたトリプレックス ddPCR。 Ψ 、*Pgk1*、*Rpp25* の濃度は 94.9、211、284 コピー/ μ L で、比率は 1:2.22:2.99 であった。

第四章

qPCR およびサザンブロットとの比較

本章では、第三章で開発したトリプレックス ddPCR による VCN 測定法を用いて、実際のクローンセレクションの過程で得られたウイルスベクター産生細胞のクローン中の VCN を測定した。

4-1. ウイルスベクター産生細胞のクローンを用いたサザンブロット、qPCR と ddPCR の比較

ウイルスベクター産生細胞候補のクローン選択の過程で得られたクローンの VCN について、開発したトリプレックス ddPCR 法とサザンブロットおよび qPCR で比較した。ウイルスベクター産生細胞の作製に必要な GOI プラスミドは MSGV1-CAR1、MSGV1-CAR2、SFG-CAR3 の 3 種類を用いた。Retrovirus Packaging Kit Eco(タカラバイオ株式会社)を用いて、一過性のエコトロピックウイルスベクターを調製し、PG13 細胞に感染させた。感染した PG13 細胞をシングルセルプリンターでクローニングし、増殖させた細胞をサンプルとした。産生されたウイルスゲノム RNA の量、増殖速度、細胞形態に基づき、約 100 クローンから 3 株を最終候補として選択した。MSGV1-CAR1 と MSGV1-CAR2 のサザンブロット結果を図 9 に例として示す。MSGV1-CAR1、MSGV1-CAR2、SFG-CAR3 クローンのサザンブロット、ddPCR、並びに qPCR による VCN の測定結果を図 10 に示す。ddPCR の値は、各参照遺伝子から算出したコピー数の幾何平均値である。その結果、MSGV1-CAR1 クローン 30 を除くすべてのクローンについて、ddPCR における VCN はサザンブロットと一致した結果を示し、MSGV1 および SFG ベクターの両方について正確なコピー数が測定されたことが示唆された。

一方、qPCR の結果は、MSGV1-CAR1 クローン 41 や SFG-CAR3 クローン 40、70 のように 1 コピー数以上の差がある場合もあり、1.5 や 2.5 のように整数とするのが難しい結果もあった。MSGV1-CAR1 のクローン No. 30 については、ddPCR と qPCR ではコピー数がおよそ 3~4 であったが、サザンブロットでは 7 コピーであった。サザンブロットではゲノム上の挿入部位の違いを検出できるため、3 コピーと 4 コピーのクローンが混在している場合は 7 コピーの結果となる可能性があるが、ddPCR と qPCR では参照遺伝子とプロウイルスベクター遺伝子の濃度の比率から VCN を算出するため、3 コピーと 4 コピーのクローンが混在している場合はその平均数が得られ、およそ 3~4 コピーの値が得られたと考えられる。したがって、MSGV1-CAR1 クローン No. 30 は複数のクローンの混合物となっており、そのことでサザンブロットと ddPCR での値に違いが表れた可能性が示唆された。

4-2. 実際のクローンセレクションにおける参照遺伝子数の変化に対する頑健性の検証

実際のクローン選択を考慮して、MSGV1-CAR2 の他の候補クローンについて ddPCR を行った(図 11)。結果は VCN に応じて整数値に近い値を示し、コピー数の推定は容易であった。しかし qPCR では、測定値のばらつきのため、コピー数は連続的な数値としてしか得られず、整数として割り当てることは困難であった。さらに、2 つの参照遺伝子の安定性を評価するために、*Pgk1* と *Rpp25* の比率を調べた。

ほとんどのクローンにおいて、*Rpp25* / *Pgk1* の比はおよそ 1.5 であったが、MSGV1-CAR2 クローン 62 では、その比は 3 に近かった(2.88)。MSGV1-CAR2 クローン 62 の VCN を *Pgk1* 単独で計算すると 1.91 であったのに対し、*Rpp25* 単独で計算すると 1.00 となり、VCN の決定に矛盾があることが示された。クローン 62 の参照遺伝子コピー数をさらに解析したところ(図 12)、*Pgk1* を 2 コピーと仮定したときに *B2m*、*Apob*、*Mbp* が

3コピー存在するのに対し、*Rpp25*は6コピーを示した。これは、シングルセルクローニングと拡大培養の過程で、*Rpp25*を含む9番染色体の数が増加したことを示唆していた。*Pgk1*と*Rpp25*の両方を参照遺伝子として用いれば、参照遺伝子のコピー数のばらつきを、その比率を調べることで検出することができ、遺伝子コピー数の計算が不正確になるリスクを最小限に抑えることが可能である。

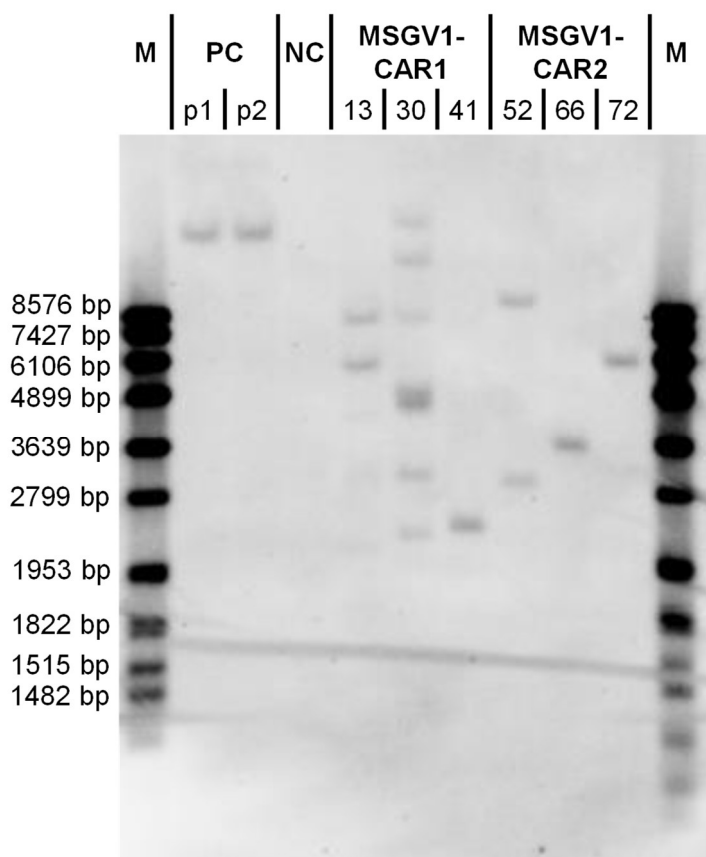


図 9 サザンブロットによる VCN 評価

サザンブロットの代表画像。M: マーカー、PC: ポジティブコントロール p1:MSGV1-CAR1 プラスミド p2:MSGV1-CAR2 プラスミド、NC: ネガティブコントロール。MSGV1-CAR1 と MSGV1-CAR2 の下の数字はクローン番号を示す。

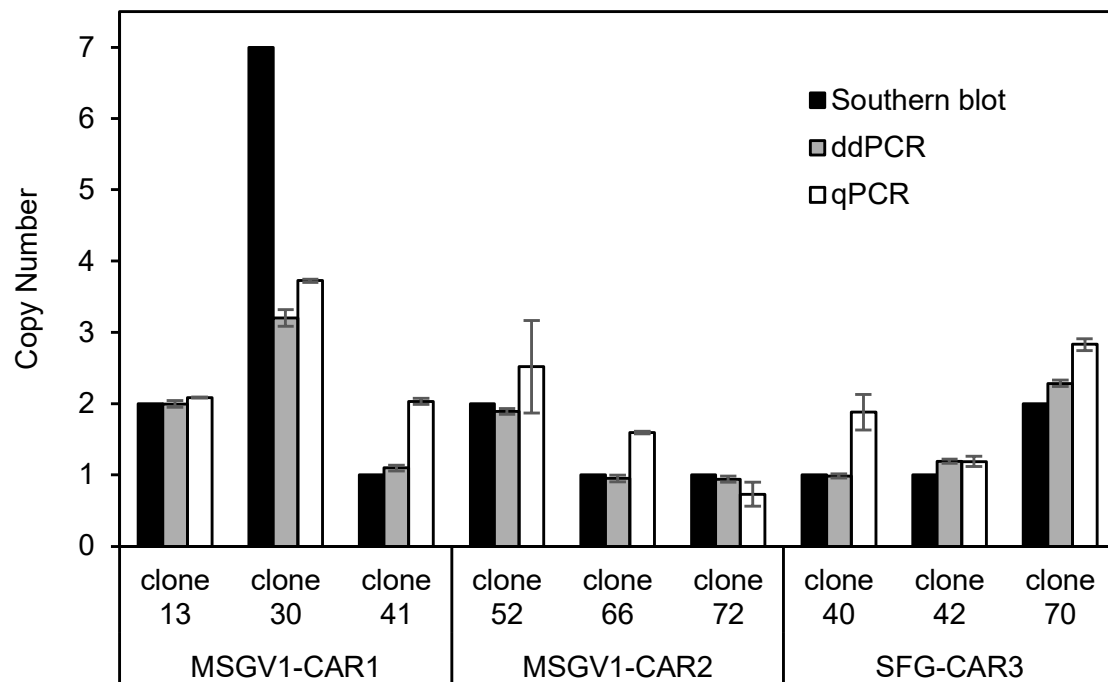


図 10 サザンブロット、ddPCR、qPCR によるベクター産生細胞の各クローンの VCN の比較

ddPCR では MSGV1-CAR1 clone 30 以外、サザンブロットと近い値となった。一方 qPCR では、MSGV1-CAR1 clone 41 や SFG-CAR3 clone 40 など、サザンブロットで 1 コピーとされたクローンが約 2 コピーの値となった。

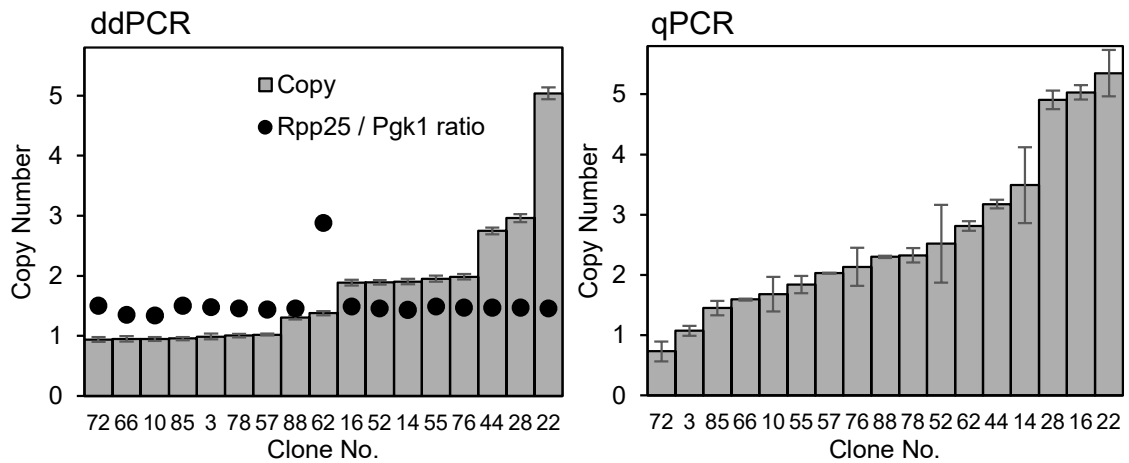


図 11 ddPCR と qPCR によるクローン選択における VCN 測定値の比較

ddPCR と qPCR によるクローン選択における VCN の測定値の比較。各クローンはコピー数の小さい順に並んでいる。ddPCR (左図) は整数値に近い離散的なパターンを示したのに対し、qPCR (右図) は連続的なパターンを示した。また、ddPCR で用いた 2 つの参照遺伝子の比率も示した。Clone 62 以外は 1.5 付近であるが、Clone 62 では 3 付近となった。

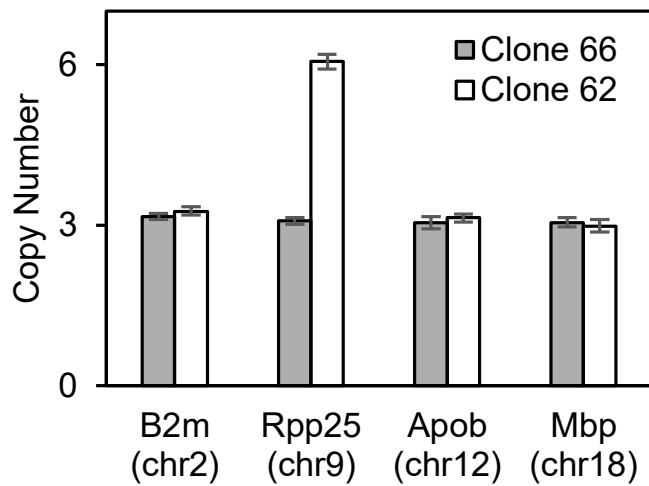


図 12 クローン間の参照遺伝子数の差異

Pgk1 のコピー数を 2 コピーとした場合の MSGV1-CAR2 クローン No. 62 とクローン No. 66 の参照遺伝子のコピー数を ddPCR で測定した。

考察

ddPCR はコピー数を正確に測定できることから、CAR-T 細胞のような遺伝子導入細胞における VCN の測定への利用が多く報告されている (Kandell et al., 2023; Ma et al., 2023; Murphy et al., 2023; Phuphanitcharoenkun et al., 2024)。正常 2 倍体細胞の常染色体上の各参照遺伝子のコピー数は 2 であると仮定できるが、がん細胞や細胞株は異数性を示すことがあり、参照遺伝子について特別な考慮が必要である (Ma et al., 2023)。多くの幹細胞のような正常 2 倍体細胞では、シングルセルクローニングにより、得られる細胞集団の均質性が保証されるが、HEK293 や CHO 細胞のような異数体細胞株は、染色体数の分布が広く (Bandyopadhyay et al., 2019)、細胞株は一般に高い遺伝的多様性とゲノムの流動性を示す。Wurm (2013) では、このゲノム構造の継続的な変化について説明し、シングルセルクローニングした細胞でも遺伝的に多様な細胞を急速に生み出すことから、従来 RNA ウイルスなどゲノムに変異が入りやすい生物種に用いられていた、多様な遺伝子変異を持つ集団の形成と環境変化への適応に関する「Quasispecies」(Eigen and Schuster, 1977) の概念を細胞株に拡張した。ddPCR は、ベクター産生細胞などの細胞株における導入遺伝子のコピー数を測定するのに有用であると考えられるが、細胞株における導入遺伝子のコピー数を決定するのに使用したという報告はほとんどなかった。これは、クローニングと培養操作で多様化した個々の細胞クローンにおける参照遺伝子数の流動性を考慮する必要があるためと考えられる。

本研究では、mFISH を用いて、コピー数が安定して一定である参照遺伝子を決定した。加えて、性染色体上の遺伝子である *Pgk1* と常染色体上の遺伝子の濃度を比較することで、参照遺伝子のコピー数の違いが適切に評価されているかを確認した。細胞株は核型が不安定で、培養中に変化することが知られており、ヒトの細胞株では、性

染色体と常染色体の比(X/A 比)が 2:3 に収束することが観察されている (Xu et al., 2017)。マウスの細胞である PG13 細胞も由来する NIH3T3 と比較し、X/A 比が 2:3 に近くなっていることが観察された。

本研究では、遺伝子導入やシングルセルクローニング後のクローン選択に有用なトリプレックス ddPCR 法を開発した。PG13 細胞を用いて作製した安定産生細胞株の VCN 解析には、PG13 細胞のゲノム中には含まれず、プロウイルスベクター配列のみに含まれるパッケージングシグナル領域をターゲットとしたプライマー・プローブセットが必要であるため、新たに設計した。Volkwein et al. (2022) では MLV と MSCV の両方を検出するプライマー・プローブセットを設計したが、これらのプライマーは PG13 細胞で Gag-Pol と Galv Env の発現に使用される LTR 配列を標的としているため、この目的には使用できない。さらに、パッケージングシグナル領域を標的としたプライマー・プローブセット (Takara Bio Inc, Catalog No. 6166) が市販されているが、MSCV ベースのガンマレトロウイルスベクターには使用できないとされており、MSGV1 ベクターでは機能しない。本研究で設計したプライマー・プローブセットを用いて ddPCR を行ったところ、MSGV1 および SFG ベクターバックボーンの両方で適切に機能し、異なる CAR 配列およびベクターバックボーンを用いたウイルスベクター産生細胞の 3 つの独立したクローン選択について、コピー数はサザンブロットの結果とよく一致した。参照遺伝子に関しては、性染色体と常染色体上の 2 つの異なる参照遺伝子を用いることで、コピー数の変化に対応した。ほとんどのクローンにおいて、*Pgk1* と *Rpp25* 遺伝子は 2:3 の比率で維持されていたことから、PG13 細胞のクローンの選択での測定に用いる参照遺伝子として適していると考えられた。さらに、参照遺伝子自体のコピー数が変化しても、各染色体数の増減は独立している (Xu et al., 2017) ため、2 つの遺伝子の比から参照遺伝子の変化が検出することができる。これにより、クローン選択時に誤ったコピー数を計算するリスクが減少した。この方法は簡便で信頼性が高く、MSCV または MLV

ベースのベクターのどちらを使用しても、ガンマレトロウイルスベクター産生細胞のクローン選択に有用である。さらに、複数の参照遺伝子を使用するこの ddPCR の開発アプローチは、将来、他のウイルスベクターやタンパク質の生産に使用される異数体細胞株やがん細胞における導入遺伝子コピー数を測定するために適用できる可能性を示した。

一方、ddPCR の限界もこの研究で示された。ddPCR で得られたデータは平均コピー数のみを表している。複数のクローンが混ざっている場合、コピー数を正確に決定できない可能性がある。従って、セルバンクを作製する前の産生細胞株の最終的なクローン決定などの状況では、サザンブロットは依然として正確な VCN の検証のための技術として有効である。このような ddPCR 法の限界から、選択したクローンのコピー数を確認するためには異なる原理を持つ他の方法と組み合わせることが望ましいと考えられる。

結論として、この研究により、ddPCR がガンマレトロウイルスベクター産生細胞における VCN 測定に適した方法であることが明らかになり、正確さにおいて従来の方法である qPCR よりも優れていることが示された。特に CAR-T 細胞製品の臨床試験において、ウイルスベクターの開発は時間がかかるプロセスであり、中でもウイルスベクター安定産生細胞株の構築は、細胞治療や遺伝子治療製品の臨床試験を開始するまでの開発期間に大きな影響を与える。本研究で開発したトリプレックス ddPCR 法は、細胞治療や遺伝子治療製品の開発で使用するウイルスベクター安定産生細胞株の構築において、より迅速で効率的なクローン選択に有用であり、これまであまり注目されてこなかった細胞株の異数性による参照遺伝子の変化にも対応できる方法であると考えられる。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 客員教授 池田幸弘博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数々の有益なる御指導ならびに御助言を賜りました千葉大学大学院 薬学研究院 客員准教授 山本克彦博士に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に関し、数々の有益なる御協力を賜りました武田薬品工業株式会社 セルセラピーサイエンス 中村嘉希博士並びに前田瑛起博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究設備の使用を援助頂きました、武田薬品工業株式会社 セルセラピーサイエンスとそのメンバーの皆様に心より感謝致します。

最後に、本研究の遂行を見守り、励ましてくれた家族に深く感謝します。

参考文献

- Bandyopadhyay, A.A., O'Brien, S.A., Zhao, L., Fu, H.Y., Vishwanathan, N. and Hu, W.S., 2019. Recurring genomic structural variation leads to clonal instability and loss of productivity. *Biotechnol Bioeng* 116, 41-53, 10.1002/bit.26823.
- Bear, A.S., Morgan, R.A., Cornetta, K., June, C.H., Binder-Scholl, G., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Rosenberg, S.A., Shurtleff, S.A., Rooney, C.M., Heslop, H.E. and Dotti, G., 2012. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol Ther* 20, 246-249, 10.1038/mt.2011.288.
- Bueler, H. and Mulligan, R.C., 1996. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. *Mol Med* 2, 545-555, 10.1007/BF03401639.
- Cai, Y.M., Dudley, Q.M. and Patron, N.J., 2021. Measurement of Transgene Copy Number in Plants Using Droplet Digital PCR. *Bio Protoc* 11, e4075, 10.21769/BioProtoc.4075.
- Cornetta, K., Duffy, L., Feldman, S.A., Mackall, C.L., Davila, M.L., Curran, K.J., Junghans, R.P., Tang, J.Y., Kochenderfer, J.N., O'Cearbhaill, R., Archer, G., Kiem, H.P., Shah, N.N., Delbrook, C., Kaplan, R., Brentjens, R.J., Riviere, I., Sadelain, M. and Rosenberg, S.A., 2018. Screening Clinical Cell Products for Replication Competent Retrovirus: The National Gene Vector Biorepository Experience. *Mol Ther Methods Clin Dev* 10, 371-378, 10.1016/j.omtm.2018.08.006.
- Cornetta, K., Yao, J., House, K., Duffy, L., Adusumilli, P.S., Beyer, R., Booth, C., Brenner, M., Curran, K., Grilley, B., Heslop, H., Hinrichs, C.S., Kaplan, R.N., Kiem, H.P., Kochenderfer, J., Kohn, D.B., Mailankody, S.,

- Norberg, S.M., O'Cearbhaill, R.E., Pappas, J., Park, J., Ramos, C., Ribas, A., Riviere, I., Rosenberg, S.A., Sauter, C., Shah, N.N., Slovin, S.F., Thrasher, A., Williams, D.A. and Lin, T.Y., 2023. Replication competent retrovirus testing (RCR) in the National Gene Vector Biorepository: No evidence of RCR in 1,595 post-treatment peripheral blood samples obtained from 60 clinical trials. *Mol Ther* 31, 801-809, 10.1016/j.ymthe.2022.12.006.
- Coroadinha, A.S., Gama-Norton, L., Amaral, A.I., Hauser, H., Alves, P.M. and Cruz, P.E., 2010. Production of retroviral vectors: review. *Curr Gene Ther* 10, 456-473, 10.2174/156652310793797739.
- Dabas, P. and Danda, A., 2023. Revolutionizing cancer treatment: a comprehensive review of CAR-T cell therapy. *Med Oncol* 40, 275, 10.1007/s12032-023-02146-y.
- Didion, J.P., Buus, R.J., Naghashfar, Z., Threadgill, D.W., Morse, H.C., 3rd and de Villena, F.P., 2014. SNP array profiling of mouse cell lines identifies their strains of origin and reveals cross-contamination and widespread aneuploidy. *BMC Genomics* 15, 847, 10.1186/1471-2164-15-847.
- Eigen, M. and Schuster, P., 1977. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* 64, 541-565, 10.1007/BF00450633.
- European Medicines Agency, Assessment report YESCARTA International non-proprietary name: axicabtagene ciloleucel Procedure No. EMEA/H/C/004480/0000, https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf; 2018. [accessed 12 July 2024].
- Franz, T., Hilberg, F., Seliger, B., Stocking, C. and Ostertag, W., 1986. Retroviral mutants efficiently expressed in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3292-3296, 10.1073/pnas.83.10.3292.

- Ghani, K., Boivin-Welch, M., Roy, S., Dakiw-Piaceski, A., Barbier, M., Pope, E., Germain, L. and Caruso, M., 2019. Generation of High-Titer Self-Inactivated gamma-Retroviral Vector Producer Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 14, 90-99, 10.1016/j.omtm.2019.05.013.
- Hawley, R.G., Lieu, F.H., Fong, A.Z. and Hawley, T.S., 1994. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* 1, 136-138.
- He, Z., Wilson, A., Rich, F., Kenwright, D., Stevens, A., Low, Y.S. and Thunders, M., 2023. Chromosomal instability and its effect on cell lines. *Cancer Rep (Hoboken)* 6, e1822, 10.1002/cnr2.1822.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S. and Colston, B.W., 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83, 8604-8610, 10.1021/ac202028g.
- Hu, L., Ru, K., Zhang, L., Huang, Y., Zhu, X., Liu, H., Zetterberg, A., Cheng, T. and Miao, W., 2014. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res* 2, 3, 10.1186/2050-7771-2-3.
- Hughes, M.S., Yu, Y.Y., Dudley, M.E., Zheng, Z., Robbins, P.F., Li, Y., Wunderlich, J., Hawley, R.G., Moayeri, M., Rosenberg, S.A. and Morgan, R.A., 2005. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Hum Gene Ther* 16, 457-472, 10.1089/hum.2005.16.457.
- ICH, Q5B Analysis of the expression construct in cell lines used for production

of r-DNA derived protein products.,
https://database.ich.org/sites/default/files/Q5B_Guideline.pdf; 1996.
[accessed 12 July 2024].

- Irving, M., Lanitis, E., Migliorini, D., Ivics, Z. and Guedan, S., 2021. Choosing the Right Tool for Genetic Engineering: Clinical Lessons from Chimeric Antigen Receptor-T Cells. *Hum Gene Ther* 32, 1044-1058, 10.1089/hum.2021.173.
- June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S. and Milone, M.C., 2018. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 359, 1361-1365, 10.1126/science.aar6711.
- Kandell, J., Milian, S., Snyder, R. and Lakshmipathy, U., 2023. Universal ddPCR-based assay for the determination of lentivirus infectious titer and lenti-modified cell vector copy number. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 31, 10.1016/j.omtm.2023.101120.
- Leibiger, C., Kosyakova, N., Mkrtchyan, H., Gleib, M., Trifonov, V. and Liehr, T., 2013. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J Histochem Cytochem* 61, 306-312, 10.1369/0022155413476868.
- Lin, C.H., Chen, Y.C. and Pan, T.M., 2011. Quantification bias caused by plasmid DNA conformation in quantitative real-time PCR assay. *PLoS One* 6, e29101, 10.1371/journal.pone.0029101.
- Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S. and Mulligan, R.C., 1997. Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol Med* 3, 466-476.
- Lukjanov, V., Koutna, I. and Simara, P., 2021. CAR T-Cell Production Using Nonviral Approaches. *J Immunol Res* 2021, 6644685, 10.1155/2021/6644685.
- Ma, J., Shao, L., Fuksenko, T., Liu, H., Shi, R., Dinh, A., Highfill, S.L., Zhang,

- N., Panch, S.R., Somerville, R.P., Stroncek, D.F. and Jin, P., 2023. Reference gene selection for clinical chimeric antigen receptor T-cell product vector copy number assays. *Cytotherapy* 25, 598-604, 10.1016/j.jcyt.2023.02.010.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C. and Schambach, A., 2011. Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses* 3, 677-713, 10.3390/v3060677.
- Mekkaoui, L., Tejerizo, J.G., Abreu, S., Rubat, L., Nikoniuk, A., Macmorland, W., Horlock, C., Matsumoto, S., Williams, S., Smith, K., Price, J., Srivastava, S., Hussain, R., Banani, M.A., Day, W., Stevenson, E., Madigan, M., Chen, J., Khinder, R., Miah, S., Walker, S., Ade-Onojobi, M., Doming, S., Sillibourne, J., Sabatino, M., Slepishkin, V., Farzaneh, F. and Pule, M., 2023. Efficient clinical-grade gamma-retroviral vector purification by high-speed centrifugation for CAR T cell manufacturing. *Mol Ther Methods Clin Dev* 28, 116-128, 10.1016/j.omtm.2022.12.006.
- Miller, A.D., Garcia, J.V., von Suhr, N., Lynch, C.M., Wilson, C. and Eiden, M.V., 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65, 2220-2224, 10.1128/JVI.65.5.2220-2224.1991.
- Murphy, L.A., Mariani, R.C., Miller, K., Brenton, M.D., Mallo, R.L.V., Kohler, M.E., Fry, T.J. and Winters, A.C., 2023. Digital polymerase chain reaction strategies for accurate and precise detection of vector copy number in chimeric antigen receptor T-cell products. *Cytotherapy* 25, 94-102, 10.1016/j.jcyt.2022.09.004.
- Nogva, H.K. and Rudi, K., 2004. Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *Biotechniques* 37, 246-248, 250-243, 10.2144/04372RR01.
- Phuphanitcharoenkun, S., Bhukhai, K., Phanthong, P., Prasongtanakij, S., Linn, A.K., Sutjarit, N., Anurathapan, U., Leboulch, P., Payen, E.,

- Hongeng, S. and Borwornpinyo, S., 2024. Droplet digital polymerase chain reaction-based quantitation of therapeutic lentiviral vector copies in transduced hematopoietic stem cells. *Cytotherapy*, 10.1016/j.jcyt.2024.02.018.
- Quan, P.L., Sauzade, M. and Brouzes, E., 2018. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)* 18, 10.3390/s18041271.
- Ramezani, A., Hawley, T.S. and Hawley, R.G., 2006. Stable gammaretroviral vector expression during embryonic stem cell-derived in vitro hematopoietic development. *Mol Ther* 14, 245-254, 10.1016/j.ymthe.2006.04.005.
- Rossi, M. and Breman, E., 2024. Engineering strategies to safely drive CAR T-cells into the future. *Front Immunol* 15, 1411393, 10.3389/fimmu.2024.1411393.
- Sadelain, M., Brentjens, R. and Riviere, I., 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 3, 388-398, 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- Seroussi, E., 2021. Estimating Copy-Number Proportions: The Comeback of Sanger Sequencing. *Genes (Basel)* 12, 10.3390/genes12020283.
- Sheridan, P.L., Bodner, M., Lynn, A., Phuong, T.K., DePolo, N.J., de la Vega, D.J., Jr., O'Dea, J., Nguyen, K., McCormack, J.E., Driver, D.A., Townsend, K., Ibanez, C.E., Sajjadi, N.C., Greengard, J.S., Moore, M.D., Respass, J., Chang, S.M., Dubensky, T.W., Jr., Jolly, D.J. and Sauter, S.L., 2000. Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer. *Mol Ther* 2, 262-275, 10.1006/mthe.2000.0123.
- U.S. FDA, Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus during Product Manufacture and Patient Follow-Up., <https://www.fda.gov/media/113790/download>; 2020. [accessed 12 July 2024].

- van der Loo, J.C. and Wright, J.F., 2016. Progress and challenges in viral vector manufacturing. *Hum Mol Genet* 25, R42-52, 10.1093/hmg/ddv451.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9236-9241, 10.1073/pnas.96.16.9236.
- Volkwein, W., Pavlovic, M., Anton, M., Haase, M., Stellberger, T., Jarrar, A., Busch, U. and Baiker, A., 2022. Detection and differentiation of murine leukemia virus (MLV) and murine stem cell virus (MSCV) and therefrom derived nucleic acids. *J Virol Methods* 299, 114316, 10.1016/j.jviromet.2021.114316.
- Watanabe, N. and McKenna, M.K., 2022. Generation of CAR T-cells using gamma-retroviral vector. *Methods Cell Biol* 167, 171-183, 10.1016/bs.mcb.2021.06.014.
- Whale, A.S., Huggett, J.F. and Tzonev, S., 2016. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol Detect Quantif* 10, 15-23, 10.1016/j.bdq.2016.05.002.
- Wurm, F., 2013. CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes* 1, 296-311, 10.3390/pr1030296.
- Xu, J., Peng, X., Chen, Y., Zhang, Y., Ma, Q., Liang, L., Carter, A.C., Lu, X. and Wu, C.I., 2017. Free-living human cells reconfigure their chromosomes in the evolution back to uni-cellularity. *Elife* 6, 10.7554/eLife.28070.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134, 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yuan, J.S., Burris, J., Stewart, N.R., Mentewab, A. and Stewart, C.N., Jr., 2007. Statistical tools for transgene copy number estimation based on

real-time PCR. BMC Bioinformatics 8 Suppl 7, S6, 10.1186/1471-2105-8-S7-S6.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Tomomine Iida, Yoshiki Nakamura, Katsuhiko Yamamoto, Eiki Maeda, and Yukihiro Ikeda, Accurate vector copy number determination in vector producer cell clones using triplex digital droplet PCR, *Journal of Virological Methods* 332 **2025** 115075

DOI: 10.1016/j.viromet.2024.115075

主査及び副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授(薬学研究院)博士(薬学) 森部 久仁一

副査 千葉大学大学院教授(薬学研究院)博士(薬学) 畠山 浩人

副査 千葉大学大学院准教授(薬学研究院)博士(薬学) 山口 憲孝