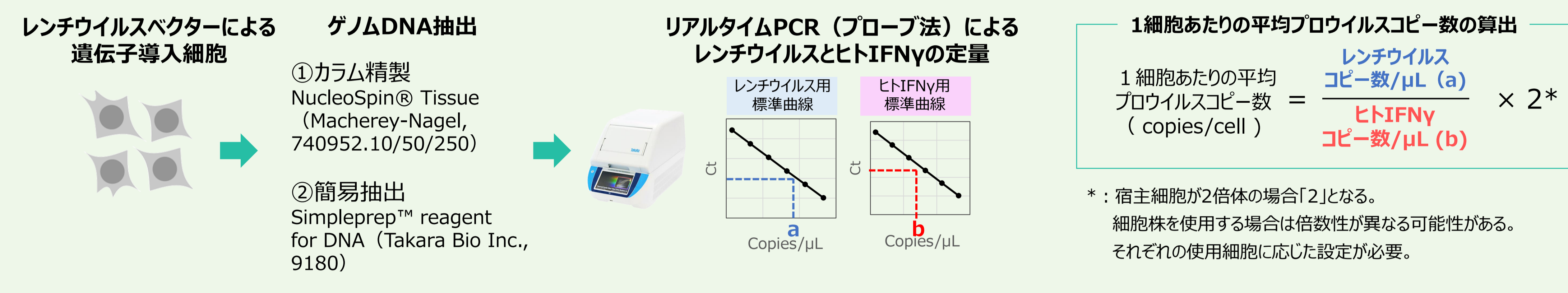


Abstract

レンチウイルス (LV) ベクターは、CAR-T細胞療法をはじめとする遺伝子治療に広く利用されている。しかし、ゲノムへの過剰な組み込みは腫瘍形成のリスクを伴うため、FDAはゲノムに挿入されたベクターコピー数 (プロウイルスコピー数) の測定を推奨している。本研究では、プロウイルスコピー数を堅牢かつ正確に測定するため、プローブ法を用いたデュプレックスqPCR法を開発した。まず、全ゲノムシーケンス (WGS) 解析によりプロウイルスコピー数を確認した細胞クローン (2、5、9 copies/cell) からDNAを抽出し、各種条件を検討したところ、WGSと同等の精度で測定可能なqPCR法を確立した。次に、LVベクター感染細胞の平均プロウイルスコピー数を測定したところ、多重感染度 (MOI) との強い相関が認められた。さらに、簡便性向上を目的として、ゲノムDNA簡易抽出法を用いた少量サンプルからの測定系を構築し、精製ゲノムDNAと同等の結果が得られることを確認した。本測定系は、細胞製造工程の管理や品質試験に有用であり、標準化された品質評価の実施を支援できると考えられる。

プロウイルスコピー数の測定方法



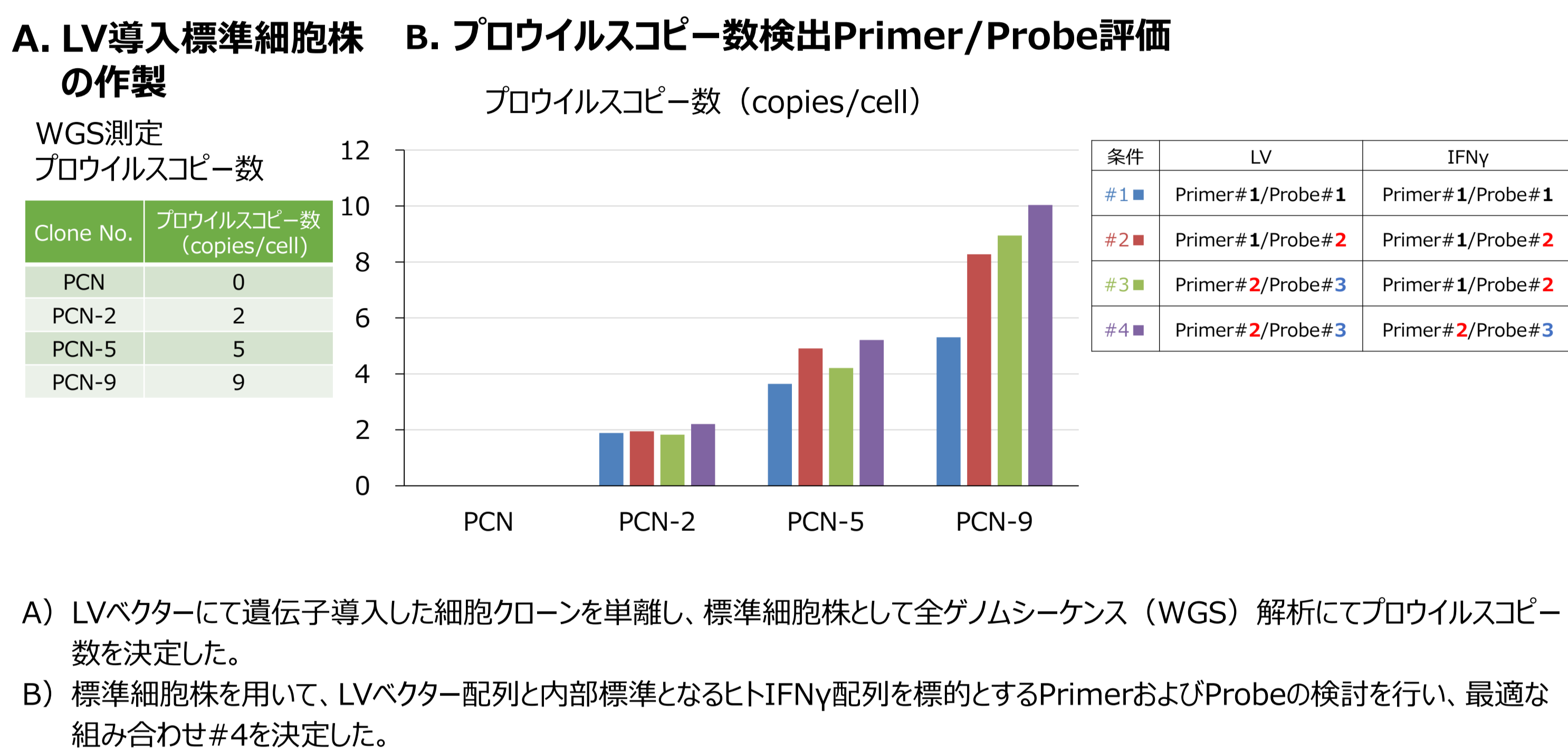
LVpro™ Provirus qPCR Quantitation Kit

100 test/kit

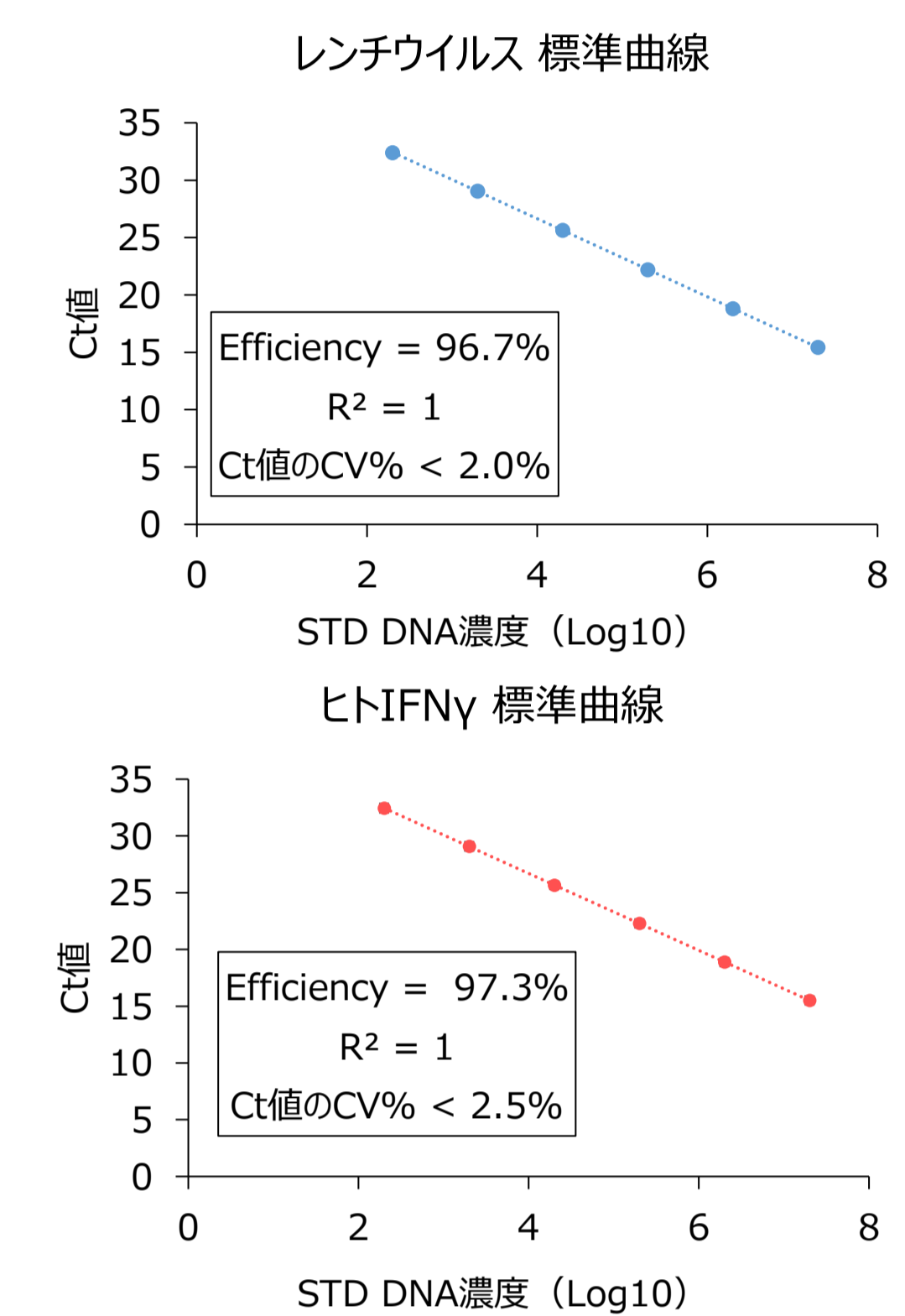
Cat#: 6196, Takara Bio Inc.



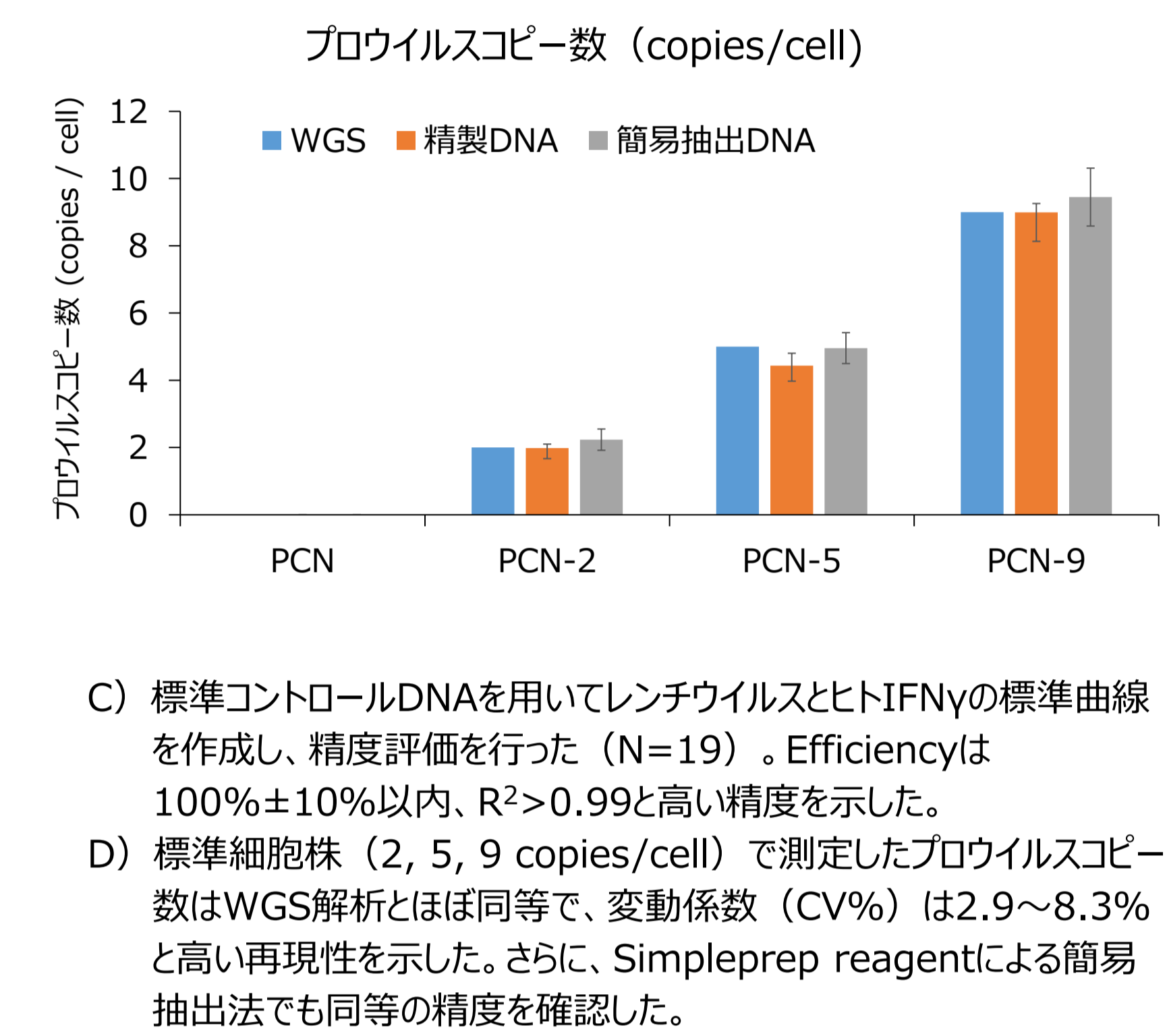
レンチウイルスプロウイルスコピー数測定系の構築



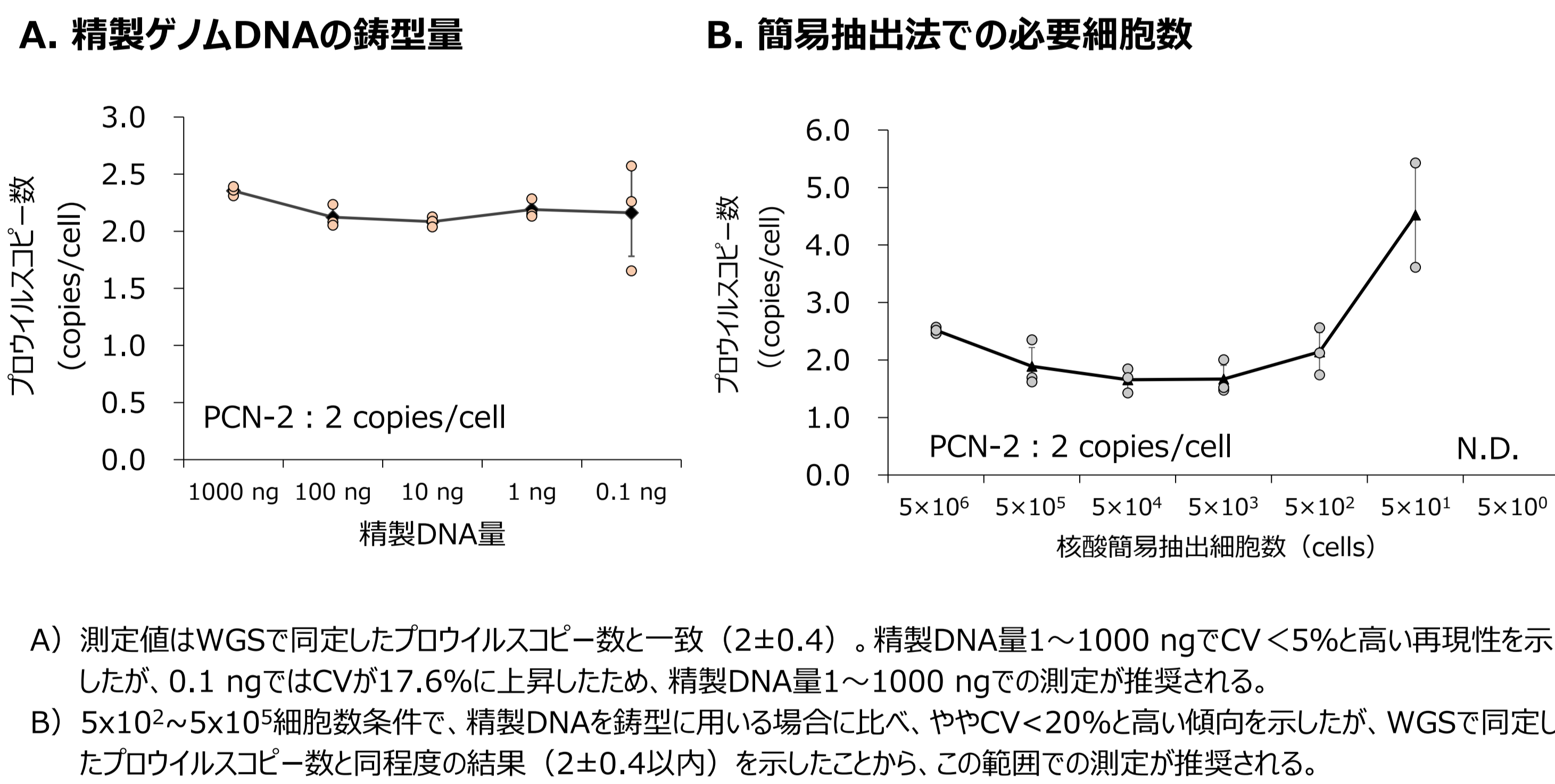
C. 標準DNAを用いた標準曲線評価



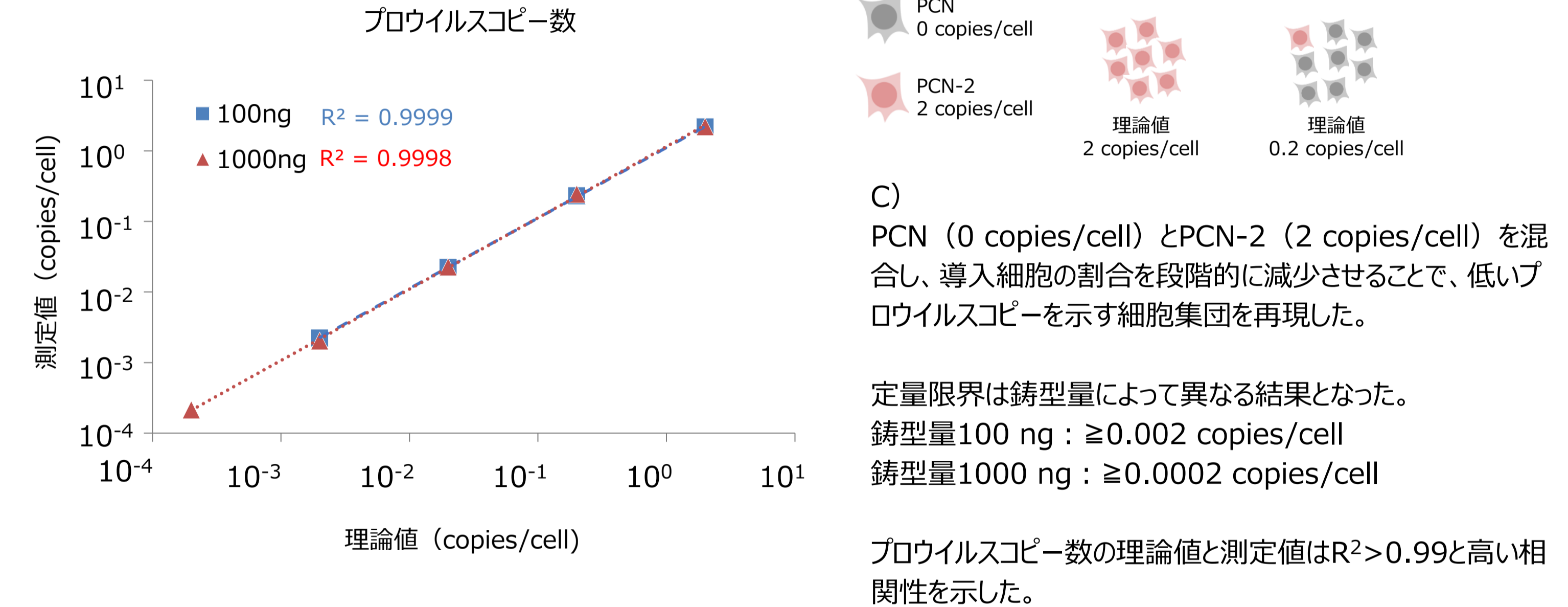
D. プロウイルスコピー数測定法の評価



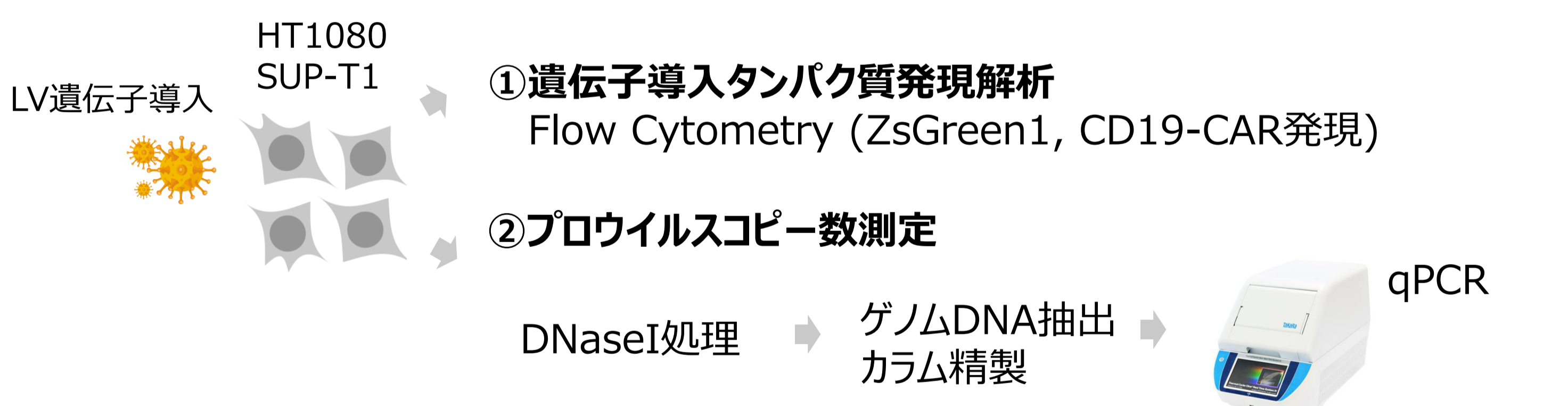
プロウイルスコピー数測定法の感度評価



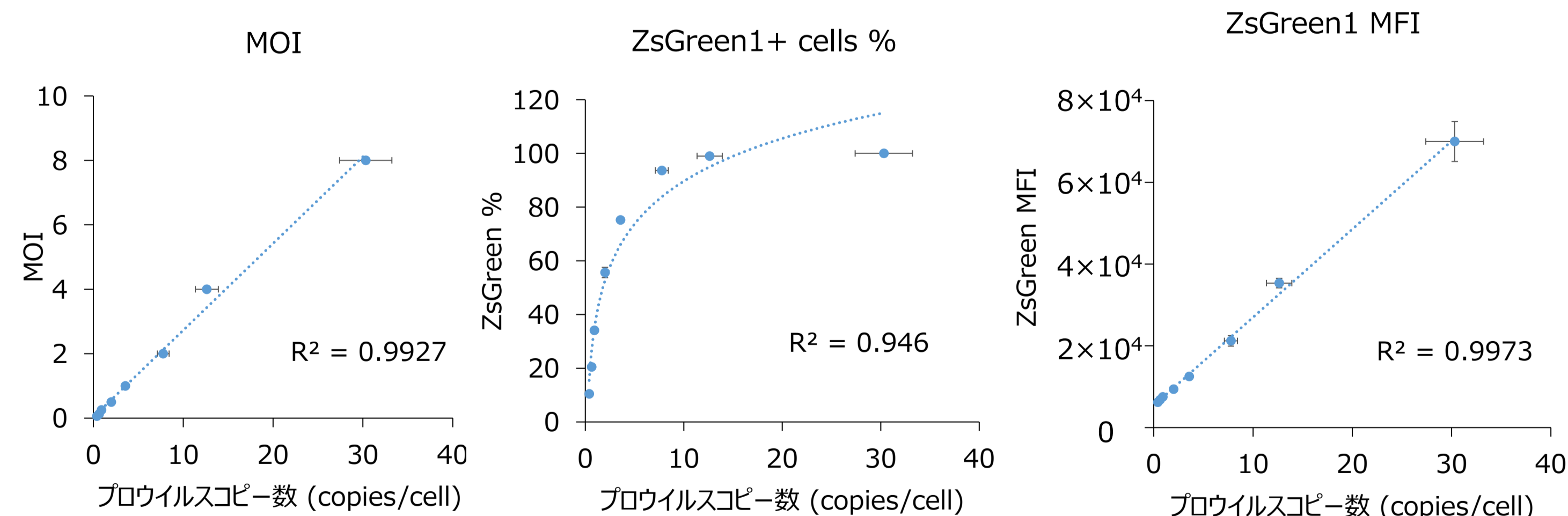
C. プロウイルスコピー数の定量限界



レンチウイルス感染細胞のプロウイルスコピー数測定

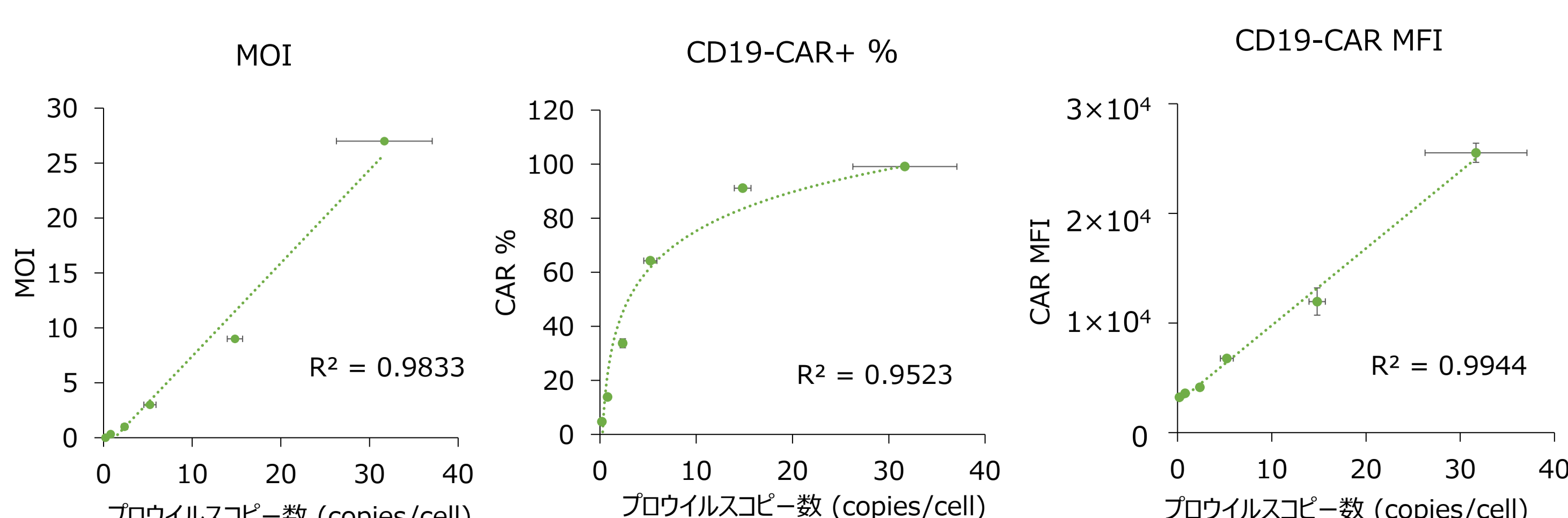


A. LV感染HT1080細胞におけるプロウイルスコピー数測定



A) MOI依存的にプロウイルスコピー数は増加し、プロウイルスコピー数とMOIおよびプロウイルスコピー数とZsGreen1 MFIの間にR²>0.99と強い相関関係が確認された。

B. LV感染SUP-T1細胞におけるプロウイルスコピー数測定

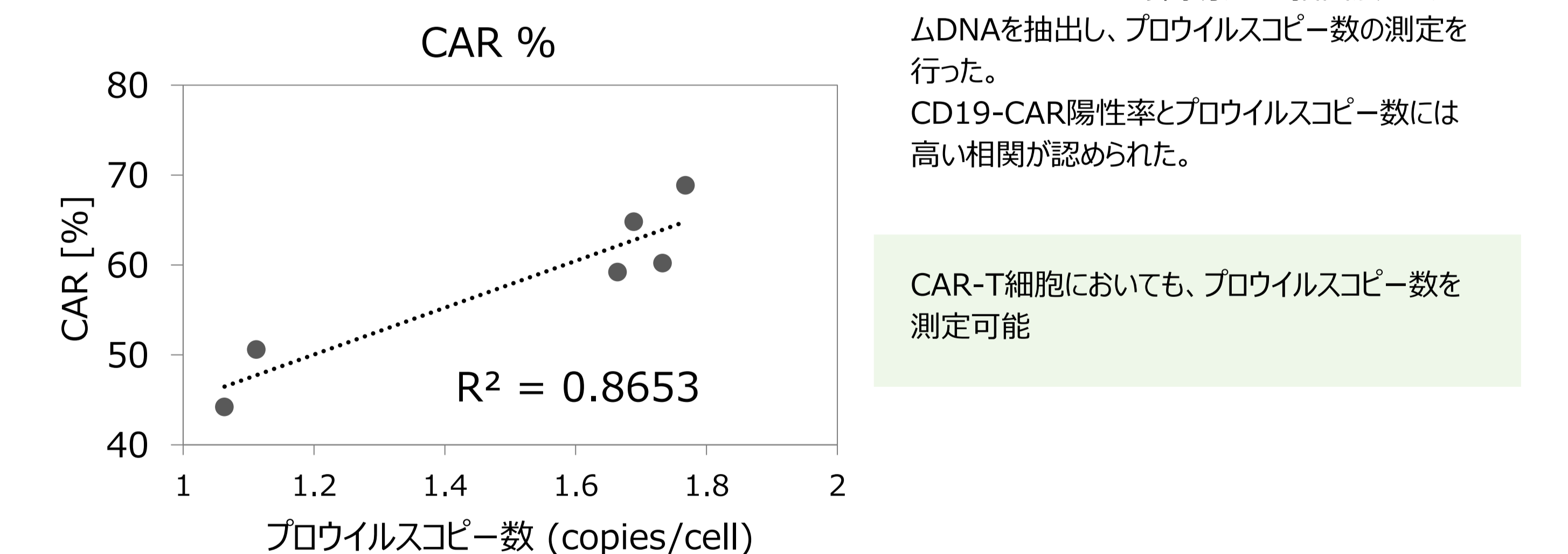


B) MOI依存的にプロウイルスコピー数とCARのMFIは増加し、プロウイルスコピー数とMOI、プロウイルスコピー数とCD19-CAR MFIの間にR²>0.98と強い相関関係が確認された。

CAR-T細胞におけるプロウイルスコピー数測定

ヒトPBMCからT細胞を分離後、複数の条件でLVベクターを用いて遺伝子導入し、CAR-T細胞を調製した。それぞれの方法で調整した細胞のCAR陽性率とプロウイルスコピー数を評価し、相関性を解析した。

CAR-T細胞におけるプロウイルスコピー数測定



Conclusion

ヒト細胞に導入されたレンチウイルスのプロウイルスコピー数を精度よく測定可能であった。

- ✓ **正確性** : 全ゲノムシーケンス解析と同等の結果
- ✓ **再現性** : 変動係数 (CV) 10%以下
- ✓ **感度** : 微量サンプルでも検出可能 (精製ヒトゲノムDNA ~1ng) 低い遺伝子導入効率の細胞でも検出可能 (≥0.0002 copies/cell)
- ✓ **汎用性** : ヒト細胞株やヒト初代培養細胞にも適用可能
- ✓ **簡便性** : 簡易DNA抽出法でも測定可能

COI開示

発表者は全てタカラバイオ株式会社の従業員である。