

主論文の要旨

**Integration Mapping of *piggyBac*-Mediated CD19  
Chimeric Antigen Receptor T Cells Analyzed by  
Novel Tagmentation-Assisted PCR**

新規 Tagmentation-Assisted PCR 法を用いた *piggyBac* トランスポゾン媒介CD19 キメラ抗原受容体遺伝子導入 T 細胞の遺伝子挿入部位解析

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

濱田 太立

## 【緒言】

遺伝子改変細胞療法においては、挿入変異の潜在的リスクを評価するために、遺伝子挿入部位を解析することが重要である。遺伝子挿入部位の解析には、古典的に inverse PCR 法などの制限酵素を用いる方法が利用されてきたが、選択する制限酵素によって検出される遺伝子挿入部位に偏りが生じることが問題であった。Non-restrictive linear amplification-mediated PCR (nrLAM-PCR) 法や target capture sequencing 法は制限酵素を用いないため、偏りなく正確に遺伝子挿入部位を解析できる一方で、サンプルの調製に要する手間や時間が膨大であることが問題である。我々は、簡便かつ短時間にサンプル調製ができ、さらに遺伝子挿入部位を偏りなく正確に評価できる新たな方法として tagmentation-assisted PCR (tag-PCR) 法を開発した。

CD19 キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) T 細胞療法は CD19 陽性急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) や悪性リンパ腫に対する新規の免疫療法である。ウイルスベクターを用いて遺伝子導入した CAR-T 細胞が広く臨床研究で用いられているが、非ウイルスベクターの応用も進んでおり、今後の臨床応用が期待されている。

本研究は、tag-PCR 法を用いて、非ウイルスベクターである *piggyBac* トランスポゾンで遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞の遺伝子挿入部位を解析し、ウイルスベクターで遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞と比較することを目的とした。

## 【対象及び方法】

3人の健常成人ドナーの末梢血単核球を用いて、*piggyBac* トランスポゾン (PB)、レトロウイルスベクター (RV)、レンチウイルスベクター (LV) によって遺伝子導入を行い CD19 CAR-T 細胞を作成した。CAR-T 細胞から抽出した DNA を用いて tag-PCR 法によって遺伝子挿入部位を解析した (図 1)。Tag-PCR 法は、タグメンテーション反応、1<sup>st</sup> PCR、2<sup>nd</sup> PCR の3つのステップから構成される。タグメンテーション反応によって、ゲノム DNA をランダムに 400~500 塩基長に断片化すると同時に、断片の両端に次世代シーケンサーに必要なアダプタ配列の一部を付加した。断片化した DNA のうち、ヒトゲノムと CD19 CAR 遺伝子の接続点を含む断片を選択的に増幅するために、一方のアダプタ配列と CD19 CAR 遺伝子に特異的なプライマーを用いて 1<sup>st</sup> PCR を行った。最後に、1<sup>st</sup> PCR で付加したアダプタ配列に特異的なプライマーを用いた 2<sup>nd</sup> PCR でアダプタ配列を完成させた。完成したライブラリの塩基配列を次世代シーケンサーで決定し、CAR 遺伝子とヒトゲノムの接続点を含むリードの塩基配列から CD19 CAR 遺伝子のヒトゲノム上の挿入部位を同定した。PB CAR-T 細胞の遺伝子挿入部位を tag-PCR 法と target capture sequencing 法で決定して、tag-PCR 法の性能を評価した。

## 【結果】

Tag-PCR 法は、既存の主流な方法である linear amplification PCR (LAM-PCR) 法と

nrLAM-PCR 法よりも少ない手順で短時間にサンプル調整を行うことができた (図 1)。Tag-PCR 法により PB、RV、LV CD19 CAR-T 細胞それぞれで 602、815、1,609 か所の遺伝子挿入部を同定した。転写開始領域 (transcriptional start site; TSS) 周辺 5 kb への挿入頻度は PB 27.1 %、RV 35.7 %、LV 15.9 %、CpG アイランド近傍 5 kb への挿入頻度は PB 26.6 %、RV 32.8 %、LV 17.7 %であり、RV と比較して PB の転写開始領域周辺 ( $P = 6.7 \times 10^{-4}$ ) と CpG アイランド近傍 ( $P = 0.014$ ) への挿入頻度は有意に低かった (図 2、図 3)。がん原遺伝子の転写開始領域周辺 50 kb への挿入頻度は PB 3.8 %、RV 3.9 %、LV 4.5 %であり、三者に有意差はなかった (図 4)。また、ゲノム中に外来遺伝子が挿入される場合に安全であるとされる genomic safe harbor への挿入頻度は PB で 8.3 %であり、RV (7.3 %)と同等である一方、LV (2.9 %)と比較して有意に高かった ( $P = 2.6 \times 10^{-7}$ ) (図 4)。また、tag-PCR 法と target capture sequencing 法で決定した PB CAR-T 細胞の遺伝子挿入プロファイルは両者で同様であった (図 5)。

### 【考察】

Tag-PCR 法は制限酵素を用いる既存の方法よりも正確に、より包括的に遺伝子挿入部位を解析することが可能であると考えられた。さらに、tag-PCR 法は制限酵素を用いない既存の方法と比較して簡便かつ短時間に解析を行うことができた。Inverse PCR や LAM-PCR では、制限酵素でゲノム DNA を切断するため、各制限酵素の特定の切断点に近い遺伝子挿入部位が選択的に同定される。一方、tag-PCR 法では、タグメンテーション反応によりゲノム DNA をランダムに断片化するため、特定の挿入部位に偏らず、包括的に遺伝子挿入部位を同定することが可能である。nrLAM-PCR や target capture sequencing 法は制限酵素を用いない方法であり、包括的に遺伝子挿入部位を解析することが可能であるが、これらの方法では次世代シーケンサーのライブラリを完成させるまでに 6~10 ステップ以上の実験操作と、2~3 日の時間を要し、煩雑で時間が掛かることが問題である。これに対して、tag-PCR 法は 3 ステップの実験操作で、およそ 7 時間で次世代シーケンサーのライブラリを完成させることができた。簡単かつ短時間で解析を行うことが可能にもかかわらず、tag-PCR 法は target capture sequencing 法と同様のパフォーマンスを示した。こうした tag-PCR 法の簡便性と迅速性は、遺伝子改変細胞の各製剤の遺伝子挿入部位解析のみでなく、遺伝子改変細胞療法後の定期的なクローナリティ解析も可能にし、臨床現場における遺伝子改変細胞療法の安全性を高めることに繋がると期待される。

本研究において我々は、tag-PCR 法を用いて PB、RV、LV で遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞の遺伝子挿入部位の解析を行った。TSS と CpG アイランド近傍への遺伝子挿入頻度に関して、PB は RV よりも低く、LV よりも高かった。緑色蛍光タンパク遺伝子を用いて本研究と同様に遺伝子挿入部位解析を行っている既報と異なり、実際の CD19 CAR-T 細胞製剤での遺伝子解析を行っている点において、本結果はより有用な結果であると考えられる。遺伝子挿入部位のみで遺伝子改変細胞の安全性を評価できるわけではないが、少なくともこの点において、PB CAR-T 細胞の安全性は、現在

までに長期的な安全性が示されている RV CAR-T 細胞と同等以上であると考えられる。

**【結論】**

Tag-PCR 法を用いて実際の CD19 CAR-T 細胞産物の遺伝子挿入部位を評価できた。Tag-PCR 法は遺伝子改変細胞の挿入変異のリスク評価とクローナリティ解析に有用な方法であると考えられる。