

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 濱田 太立

論 文 題 目

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)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

木 村 宏 

名古屋大学教授

委員

西 川 尚 嘉 

名古屋大学教授

委員

内 田 広 夫 

名古屋大学教授

指導教授

高 橋 義 行 

論文審査の結果の要旨

今回、遺伝子改変細胞の遺伝子挿入部位を評価する新たな方法として、tagmentation-assisted PCR (tag-PCR)法を開発し、これを用いて *piggyBac* トランスポゾンで遺伝子導入した CD19 キメラ抗原受容体 T (CAR-T)細胞の遺伝子挿入部位を解析した。Tag-PCR 法は既存の方法よりも簡便かつ短時間で、かつ正確に遺伝子挿入部位を解析できた。*PiggyBac* トランスポゾンで遺伝子導入した CAR-T 細胞はレトロウイルスベクターで遺伝子導入した場合と比較して転写開始領域と CpG アイランド近傍への挿入頻度は低く、がん原遺伝子内や genomic safe harbor への挿入頻度は同等であった。この結果、tag-PCR 法は遺伝子挿入部位を解析する有用な方法であることに加えて、*piggyBac* CD19 CAR-T 細胞の安全性はレトロウイルスベクターで作成した CAR-T 細胞と同等であることが示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. ヒト T 細胞に GFP 蛋白を遺伝子導入したモデルの解析において、*piggyBac* トランスポゾンの挿入部位が転写開始領域上の BRD4 関連部位であることと、*piggyBac* トランスポサージェとプロモドメイン蛋白との相互作用が示されている。レトロウイルスベクターはプロモドメイン蛋白との相互作用によって転写開始領域へ遺伝子を挿入することが報告されており、これらのことから *piggyBac* とレトロウイルスベクターはプロモドメインタンパクを介した同様の機構によって遺伝子挿入を行うものと考えられる。
2. 遺伝子改変細胞の安全性評価方法は定まっていない。ヒトにおける insertional mutagenesis は、レトロウイルスベクターで造血幹細胞に遺伝子導入した細胞を用いた遺伝子治療のみで報告されており、これらの報告でレトロウイルスベクターの遺伝子挿入部位プロファイルと insertional mutagenesis との関連が確認された。Insertional mutagenesis の報告は限られているため、現在は、過去の報告と遺伝子挿入プロファイルを比較することで安全性を判断することに止まるが、今後は遺伝子挿入部位と安全性との関連を検討していくことが重要である。
3. *PiggyBac* トランスポゾンで遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞が実際に白血病患者に投与されたことはなく、その臨床効果は未確認であるが、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターで遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞と同等の抗腫瘍効果が *in vitro* と *in vivo* で確認されている。このことから、既に臨床上の抗腫瘍効果が実証されているレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターを用いた CD19 CAR-T 細胞と同様に、*piggyBac* トランスポゾンで遺伝子導入した CD19 CAR-T 細胞にも臨床効果があることが期待される。

本研究は、安全な遺伝子改変細胞療法を確立する上で、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	濱田 太立
試験担当者	主査	木村 宏	副査:	西川 尚嘉
	副査:	内田 広夫	指導教授	高橋 義行
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 転写開始領域とCpGアイランドへの挿入頻度が遺伝子導入方法によって異なった理由について2. 遺伝子挿入部位と安全性評価との関連について3. <i>PiggyBac</i>トランスポゾン法で遺伝子導入したCAR-T細胞の臨床的効果の展望について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、小児科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				