

# 導入遺伝子のコピー数の定量に最適な Droplet Digital PCR

## 概要

2017年に臨床に登場して以来、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞は白血病やリンパ腫の治療を一変させました。米国食品医薬品局(FDA)はこれまでに5つのCAR-T細胞療法を承認しており、現在開発中の細胞免疫療法の大半がCAR-T細胞を用いていることから、治療の選択肢は増える一方と考えられます。ある予測では、CAR-T細胞療法市場は2030年までに61億ドルにまで成長するとされています。本稿では、CAR-T細胞療法がなぜこれほどまでに注目されているのか、開発や製造における一般的なハードルに注目した上で、これらの問題の一つの解決策としてDroplet Digital PCRを提案します。

## がん治療の新しいパラダイム

CAR-T細胞療法は、抗がん剤を体内に投与するのではなく、患者自身の免疫システムを操作してがん細胞を攻撃させるという、がん治療の新しいパラダイムを示すものです。まず、技術者が患者の血液からT細胞を抽出し、その細胞にCAR遺伝子を、多くの場合はウイルスを用いて導入します。CAR遺伝子はゲノムに組み込まれ、T細胞はCAR-T細胞へ改変されます。その後、バイオリアクターで増殖させた細胞を医療機関へ戻し、医師が患者に細胞を輸注します。細胞表面をCARタンパクで武装したCAR-T細胞は、特定の腫瘍関連抗原を発現しているがん細胞を探し出し、腫瘍を死滅させます。

しかし、CAR-T細胞は期待されているものの、製造上の問題を解決する必要があります。CAR-T細胞は生細胞を用いた治療法であるため、開発者は治療が安全で効果的であることを保証するために特別なステップを踏む必要があります。CAR-T細胞は、自然との協力のもとに行われます。技術者はウイルスとT細胞の助けを借りてCAR-T細胞を作製し、医師はCARの発現が成功し、望ましい治療効果が得られるよう、患者ごとに異なる生理学的な条件を考慮する必要があります。

## 標準化されたCAR-T細胞を開発する必要性

CAR-T細胞の開発は標準化されていません。開発者は多くの細胞ソースやバイオプロセスから選択することができるため、結果的にCAR-T細胞の挙動はバッチごとに大きく異なる可能性があります。そのため、CAR-T細胞の開発者は、臨床試験を成功させ市場に送り出すために、製造中の細胞をモニタリングする厳格な品質管理手段を導入する必要があります。

大きな課題として、T細胞に適切な数のCAR遺伝子を導入することが挙げられます。導入遺伝子はアデノ随伴ウイルスやレンチウイルスなどのウイルスを介して細胞に導入されますが、ウイルスの導入効率は様々で、細胞によって導入遺伝子のコピー数が異なる場合があります。

FDAは、CAR-T細胞が1~4コピーの導入遺伝子を含むことを推奨しています。細胞が1つもコピーを含んでいない場合は効果がなく、5つ以上含んでいる場合は治療の安全性を確保できない可能性があります。5コピー以上の導入遺伝子を含むCAR-T細胞は、全身性の炎症反応を誘発し、治療に対する有害事象を引き起こす可能性があります。したがって、開発者はCAR-T細胞中の導入遺伝子のコピー数を正確に定量化する必要があります。

この目的のために最も一般的に使用されている定量PCR (qPCR) 法は、残念ながら製造中のCAR-T細胞の導入遺伝子コピー数をモニターするには、精度や正確さが十分ではありません。qPCRでは標準曲線に基づいてコピー数を推定する必要があります。標準曲線を作製するためには、技術者は時間のかかる連続希釈を行う必要があります、このプロセスはしばしば人為的なエラーに繋がります。このエラーはばらつきを生み、qPCRの感度を低下させます。

このため、qPCRはウイルス導入の成否やCAR-T細胞の安全性の判定に用いることができません。これに対し、Droplet Digital PCR (ddPCR)は導入遺伝子のコピー数を定量するのに適しています。ddPCRは標準曲線を用いずに核酸の絶対定量が可能のため、CAR-T細胞の開発に必要となる課題に対処するための精度と感度を備えています。

### 導入遺伝子の定量化のために理想的なソリューション

ddPCRテクノロジーは、DNA標準物質をもとに核酸濃度を推定するのではなく、核酸分子の絶対数が測定可能である高感度な技術です。技術者はCAR導入遺伝子を含むサンプル20  $\mu$ lをカートリッジに入れ、核酸を1本または数本含む約2万個のナノリットルサイズのドロップレットへ効率的に分割します。次に、CAR遺伝子をターゲットとしたプライマーを使用して、個々の独立したドロップレットにおいてPCRを実施します。

DNAのPCR増幅は、導入遺伝子のターゲット配列を含むドロップレットの中だけで生じます。このドロップレット内のDNAが増幅すると、プローブからレポーター分子が切断され、蛍光シグナルを発するようになります。QX200 Droplet ReaderまたはQX ONE ddPCR Systemを使用して、蛍光を発するドロップレット数を測定することで、CAR-T細胞バッチ中の導入遺伝子濃度を決定します。

中国武漢の华中科技大学のYaoyao Luo博士らは、DNA標準試料とCAR-T細胞療法患者の試料を用いてddPCRアッセイを試みました。一連のDNA標準物質のうち、ddPCRはqPCRよりもCAR導入遺伝子を高感度で検出することができました。具体的には、qPCRが検出できなかった3.2コピー/mlというわずかな量においても、ddPCRではCAR導入遺伝子を検出することができました。

ddPCRはqPCRに比べて、アッセイ内の変動係数 (CV)、アッセイ間のCVが小さく、再現性が高いことが示唆されました。また、臨床血液サンプルの検出限界は、qPCRでは20コピー/反応であるのに対し、ddPCRでは5コピー/反応でした。

### ddPCRテクノロジーによるCAR-T細胞の開発促進

ddPCRは、CAR導入遺伝子のコピー数を単に定量する以上の有用性があることが証明されています。また、増殖可能なレンチウイルスの検出、ウイルス導入プロトコルの最適化、体内でのCAR-T細胞の持続性の測定、その他多くの開発ステップで使用することが可能です。核酸を正確かつ高精度に定量化できるこの技術は、CAR-T細胞の開発者が規制当局のニーズを満たし、より多くの患者を救う治療法の創出をサポートします。

詳細はこちら [bio-rad.com/ddPCR-CART](https://www.bio-rad.com/ddPCR-CART)

BIO-RAD, DDPCR, DROPLET DIGITAL PCR, and QX ONE are trademarks of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions. All trademarks used herein are the property of their respective owner.

Purchase of Digital PCR and/or Single-Cell NGS Sample Preparation products (the "Products") from Bio-Rad Laboratories is subject to Bio-Rad Laboratories, Inc. Standard Terms and Conditions of Sale, which can be accessed at <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>. Unless we expressly state otherwise in additional Terms and Conditions, no rights are granted for you to distribute or resell the Products. Unless we expressly state otherwise in additional Terms and Conditions, no rights are granted for the development or commercialization of diagnostic assays for use with the Products without a license from Bio-Rad. The Products and/or their use are covered by U.S. and foreign patents and/or pending patent applications owned by or under license to Bio-Rad Laboratories, Inc. See <https://www.bio-rad.com/en-us/trademarks>.



バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社

取扱店

ライフサイエンス [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 天王洲セントラルタワー

TEL: 03-6361-7000 FAX: 03-5463-8480

※ 学術的お問い合わせは

TEL: 03-6404-0331 FAX: 03-6404-0334

※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

※掲載されている製品は研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。