

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）遺伝子治療用製品の品質及び安全管理に有用な新規評価手法の開発
（英 語）A novel analytical method for quality and safety control of gene and cell therapy products.

研究開発実施期間：令和 5 年 7 月 20 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）佐藤 洋平
（英 語）Yohei Sato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人福井大学 学術研究院医学系部門耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野
（免疫・アレルギー研究ユニット）特命教授
（英 語）University of Fukui, Faculty of Medical Sciences, Department of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery, Immunology and Allergy Research Unit, Specially appointed professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：遺伝子治療用製品の代表的な品質管理（QC）項目である「ベクターコピー数（VCN 値）」については、現在、リアルタイム PCR（qPCR）を用いた測定法が最も広く普及している。遺伝子治療用製品の品質および安全性を確保するため、米国食品医薬品局（FDA）は、VCN 値を一定基準以内（5 copy/cell 以下）に抑えることを推奨している。しかしながら、VCN 値は qPCR による相対定量値から算出されるため、その詳細な生物学的意義については十分に明らかとなっていない。ポアソン分布による簡易的な推定では、VCN 値が 5 copy/cell（上限値）であった場合、理論上は 1.8% の確率で 10 copy/cell、0.02% の確率で 15 copy/cell という高 VCN 細胞が存在することになる。これらの確率自体は極めて低いものの、 10^8 個を超える造血幹細胞を調製する際には、わずかながら高 VCN 値（ >10 copy/cell）を有する細胞（高 VCN クローン）が残存する可能性がある。欧州医薬品庁（EMA）では、10 copy/cell を超えるクローンへの注意喚起がなされているものの、どの時点で、どのような方法により高 VCN クローンを評価すべきかについては詳細な指針が示されていない。また、動物モデルを用いた非臨床試験や First-in-human 試験においても、VCN 値測定による遺伝子治療用製品の生体内分布評価が求められている。そのため、施設や実験者の影響を受けにくい、普遍的かつ再現性の高い VCN モニタリング手法の確立が重要な課題となっている。

そこで本研究では、研究期間内にデジタルドロップレット PCR (ddPCR) を用いた、施設間および実験者間差の影響を受けにくい核酸定量法の確立を目標とした。具体的には、細胞株を用いたリファレンスセルラインを作製し、ddPCR による VCN 測定法を構築するとともに、複数実験者間でも同等の測定結果が得られる標準化プロトコルの作成を目指した。さらに、造血幹細胞を対象とした 1 細胞 VCN 解析系を構築し、従来の bulk 解析で得られる VCN 値との整合性を検証した。また、これまで平均値として評価されてきた VCN 値を、標準偏差を含む記述統計量として評価し、数理モデル解析を通じて新たな遺伝子治療製品評価法の確立を試みた。

本研究では、遺伝子細胞治療製品における安全性評価の高度化を目的として、VCN を高感度かつ高精度に解析するための測定系および 1 細胞 VCN 解析法の確立を行った。特に、従来の bulk 解析では検出が困難であった高 VCN クローンの同定や、生体内におけるクローン動態の評価を可能にすることを目的として研究を進めた。

まず研究開発項目 1 では、qPCR および ddPCR を用いた VCN 測定系の基盤構築を行った。リファレンスクローン化した Jurkat 細胞および標的配列を含むプラスミドを用いて検出感度を評価した結果、qPCR では約 10^2 コピー付近が検出限界であることが示され、これは一般的な qPCR の性能と一致していた。また、実際のゲノム DNA を用いた解析では、低濃度域でわずかな感度低下が認められたものの、通常の遺伝子細胞治療製品の解析に必要な DNA 量では十分な精度で VCN 評価が可能であることが示された。さらに、ddPCR を用いた解析では、絶対定量法として高い感度と再現性を有することが確認された一方、PCR 増幅効率の差異によるわずかな誤差が生じる可能性も明らかとなった。加えて、複数の実験者による測定結果を比較したところ、qPCR/ddPCR のいずれにおいても誤差 10% 以内の高い室内再現性が確認され、標準化可能なアッセイ系を構築することができた。

研究開発項目 2 では、遺伝子導入ヒト造血幹細胞に対する 1 細胞 VCN 解析法の確立を試みた。当初は全ゲノム増幅を用いる方法と用いない方法の双方を検討したが、単一細胞から十分量の核酸を回収できる全ゲノム増幅法を優先的に検討した。その結果、シングルセルソーティング後の細胞から 50-100 ng 程度の核酸回収が可能であり、VCN 解析に十分な量であることが確認された。しかしながら、全ゲノム増幅の段階で PCR バイアスが生じる可能性があり、得られる結果は絶対定量というより相対定量に近いことが示唆された。一方で、高コピークローンの検出には十分有用であることが示され、実際に長期骨髄再建能を有するヒト造血幹細胞を解析したところ、bulk 解析で高 VCN を示す試料では高コピークローンの出現頻度が高いことが確認された。特に VCN が高い試料では、VCN >5 あるいは VCN >10 を示すクローンが一定割合で検出され、bulk 解析のみでは捉えることのできないクローン不均一性が明らかとなった。

研究開発項目 3 では、得られた 1 細胞 VCN 解析データを統合し、高 VCN クローン出現リスクを推定する数理モデルの作成を試みた。複数ドナー由来の造血幹細胞データを解析した結果、高 VCN 試料では約 20% 程度の高 VCN クローンが存在する一方、低 VCN 試料ではその頻度が低いことが示された。しかしながら、高 VCN クローンを統計学的に十分評価するためには、より多くのドナー数および解析細胞数が必要であることが明らかとなった。特に、100 細胞程度の解析では高 VCN クローン出現頻度の推定に限界があり、将来的には 10 ドナー以上、さらに 1000 細胞単位での解析が必要であると考えられた。そのため、数理モデルの構築については基礎的知見を得る段階に留まり、今後の課題として残された。

研究開発項目 4 では、ヒト化免疫不全マウスモデルを用いた生体内 VCN モニタリング法の検討を行った。遺伝子導入したヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植した結果、末梢血中には 5-10% 程度のヒト CD45 陽性細胞が確認されたものの、末梢血を用いた 1 細胞 VCN 解析は細胞数が少なく困難であった。一方、脾臓からは比較的多くのヒト細胞を回収することが可能であり、1 細胞 VCN 解析によるクローン分布評価に成功した。その結果、同一ロット由来細胞を移植したマウス間でも VCN 分布にばらつきが存在し、

生着効率や優勢クローン形成に何らかのレシピエント側要因が影響する可能性が示唆された。

以上より、本研究では qPCR/ddPCR を用いた高再現性 VCN 測定法を確立するとともに、ヒト造血幹細胞を対象とした 1 細胞 VCN 解析法を開発し、高 VCN クローンの検出や生体内クローン分布評価の可能性を示した。一方で、全ゲノム増幅や qPCR 過程における PCR バイアス、解析ドナー数不足、in vivo での低生着率などの課題も明らかとなった。今後は、全ゲノム増幅技術や ddPCR 装置の改良、多検体同時解析系の構築に加え、大規模データ解析による数理モデル構築を進めることで、遺伝子細胞治療製品における高 VCN クローン出現リスクをより正確に評価できる技術基盤の確立が期待される。

英文：Vector copy number (VCN) is one of the most important quality control (QC) parameters for gene therapy products, and quantitative real-time PCR (qPCR) is currently the most widely used method for its assessment. To ensure the quality and safety of gene therapy products, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) recommends maintaining VCN values below a defined threshold (5 copies/cell). However, because VCN values are calculated from relative quantification by qPCR, their precise biological significance has not been fully clarified. Based on a simplified Poisson distribution model, when the average VCN is 5 copies/cell (the recommended upper limit), cells harboring high VCN values theoretically remain within the population, including approximately 1.8% of cells with 10 copies/cell and 0.02% with 15 copies/cell. Although these probabilities are extremely low, when more than 10^8 hematopoietic stem cells are prepared, a small number of cells with high VCN values (>10 copies/cell; high-VCN clones) may still persist. The European Medicines Agency (EMA) has highlighted the importance of monitoring clones exceeding 10 copies/cell; however, there is no clear guidance regarding when and how such high-VCN clones should be evaluated. Furthermore, in both nonclinical studies using animal models and first-in-human clinical trials, VCN monitoring is required to evaluate the biodistribution of gene therapy products. Therefore, establishing a universal and reproducible VCN monitoring method that is minimally affected by differences among facilities or operators is an important unmet need.

In this study, we aimed to establish a highly reproducible nucleic acid quantification method using droplet digital PCR (ddPCR) that would be less susceptible to inter-facility and inter-operator variability. Specifically, we generated reference cell lines and established ddPCR-based VCN measurement protocols that could provide comparable results across multiple facilities and operators. In addition, we developed single-cell VCN analysis methods for hematopoietic stem cells and T cells and evaluated their consistency with conventional bulk VCN measurements. Furthermore, instead of treating VCN merely as an average value, we sought to evaluate VCN distributions using descriptive statistics including standard deviation and to establish a novel evaluation strategy for gene therapy products through mathematical modeling.

The overall goal of this project was to improve the safety evaluation of gene and cell therapy products by establishing highly sensitive and accurate methods for VCN measurement and single-cell VCN analysis. In particular, we aimed to identify high-VCN clones that are difficult to detect by conventional bulk analysis and to evaluate clonal dynamics in vivo.

In Research and Development Project 1, we established the foundation for VCN measurement using qPCR and ddPCR. Using reference-cloned Jurkat cells and plasmids containing target sequences, we evaluated detection sensitivity and found that the detection limit of qPCR was approximately 10^2 copies, which was consistent with the known performance characteristics of conventional qPCR assays. Analyses using genomic DNA demonstrated a slight reduction in sensitivity in low-concentration samples; however, sufficient accuracy for VCN evaluation was maintained within the DNA concentration ranges typically required for gene therapy product analysis. ddPCR showed

high sensitivity and reproducibility as an absolute quantification method, although slight deviations caused by differences in PCR amplification efficiency were observed. Moreover, comparison of results among multiple operators demonstrated high inter-operator reproducibility, with variability remaining within 10% for both qPCR and ddPCR assays, indicating that standardized assay systems could be established.

In Research and Development Project 2, we attempted to establish a single-cell VCN analysis method for gene-modified human hematopoietic stem cells. Initially, we investigated both whole-genome amplification (WGA)-based and non-WGA-based approaches; however, we prioritized the WGA-based strategy because it enabled sufficient nucleic acid recovery from single cells. Approximately 50–100 ng of nucleic acids could be recovered from single-cell-sorted cells, which was sufficient for VCN analysis. Nevertheless, potential PCR bias during the WGA process suggested that the resulting measurements were closer to relative quantification rather than true absolute quantification. Despite this limitation, the method proved useful for identifying high-copy clones. Indeed, analysis of human hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity demonstrated that samples with high bulk VCN values showed increased frequencies of high-VCN clones. In particular, clones with VCN values greater than 5 or even 10 copies/cell were detected at measurable frequencies, revealing clonal heterogeneity that could not be identified by bulk analysis alone.

In Research and Development Project 3, we integrated the single-cell VCN datasets and attempted to construct a mathematical model to estimate the risk of high-VCN clone emergence. Analysis of hematopoietic stem cell samples derived from multiple donors showed that high-VCN samples contained approximately 20% high-VCN clones, whereas low-VCN samples exhibited substantially lower frequencies. However, it became evident that a larger number of donors and analyzed cells would be necessary for statistically robust evaluation of high-VCN clones. In particular, analysis of approximately 100 cells was insufficient to accurately estimate the frequency of rare high-VCN clones, and future studies will likely require analysis of at least 10 donors and approximately 1,000 cells per sample. Therefore, mathematical modeling remained at a preliminary stage and represents an important future challenge.

In Research and Development Project 4, we investigated *in vivo* VCN monitoring using a humanized immunodeficient mouse model. Human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells transduced with lentiviral vectors were transplanted into immunodeficient mice. Although 5–10% human CD45-positive cells were detected in peripheral blood, the number of recovered cells was insufficient for single-cell VCN analysis. In contrast, a larger number of human cells could be recovered from the spleen, enabling successful evaluation of clonal VCN distribution by single-cell analysis. Interestingly, variability in VCN distribution was observed even among mice transplanted with cells derived from the same donor lot, suggesting that recipient-related factors may influence engraftment efficiency and the emergence of dominant clones.

In conclusion, this study established highly reproducible VCN measurement systems using qPCR and ddPCR and developed single-cell VCN analysis methods for human hematopoietic stem cells, enabling the detection of high-VCN clones and evaluation of *in vivo* clonal distributions. At the same time, several limitations were identified, including PCR bias associated with whole-genome amplification and qPCR, insufficient donor numbers, and low engraftment efficiency *in vivo*. Future improvements in WGA technology, ddPCR instrumentation, and high-throughput multi-sample processing, combined with large-scale data analysis and mathematical modeling, are expected to provide a more accurate framework for evaluating the risk of high-VCN clone emergence in gene and cell therapy products.