

201438103A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

がん認識抗体と遺伝子導入 T 細胞による
がん治療を目指した前臨床開発研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 玉田 耕治

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人山口大学が実施した平成 26 年度「がん認識抗体と遺伝子導入 T 細胞によるがん治療を目指した前臨床開発研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
がん認識抗体と遺伝子導入T細胞によるがん治療を目指した前臨床開発研究	--- 1
玉田耕治	
II. 委託業務成果報告（FITC認識CAR-T細胞を利用したがん免疫療法の開発）	--- 6
1. 臨床応用可能なFITC認識CARベクターの構築、産生および遺伝子導入	
玉田耕治、吉村清、北野滋久、佐藤暁洋、渡邊協孝	
(資料1) 抗FITC一本鎖抗体のヒト化に関する資料	--- 10
(資料2) 抗FITC-CAR発現ベクタープラスミド構築に関する資料	--- 12
(資料3) 抗FITC-CAR発現ベクター産生細胞の調整に関する資料	--- 14
(資料4) 抗FITC-CARの発現効率および自己活性に関する資料	--- 24
(資料5) ヒト活性化T細胞における抗FITC-CAR遺伝子導入SOPに関する資料	--- 29
III. 委託業務成果報告（肝細胞がんに対する標的抗体の開発）	--- 30
1. 肝細胞がんに対する標的抗体である抗glypican-3 (GPC3) 抗体の開発	
中面哲也、植村靖史	
IV. 学会等発表実績	--- 34
V. 研究成果の刊行物・別刷	--- 38

業務主任者

玉田耕治
国立大学法人山口大学
大学院医学系研究科・免疫学分野教授

研究要旨

難治性がんに対する先進医療として、遺伝子改変により腫瘍反応性を付与したT細胞による免疫療法が進展しており、欧米では積極的に臨床試験が実施され、優れた臨床効果が報告されている。特に、がん細胞表面抗原を認識する一本鎖抗体（single chain Fv: scFv）とT細胞活性化に必要な細胞内シグナル伝達ドメインを融合して作製されたキメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor: CAR）を遺伝子導入したCAR-T細胞による免疫療法は、造血器悪性腫瘍に対して優れた治療効果を示している。しかし一方で、CAR-T細胞療法では、①標的分子に応じてCAR構造を一つ一つ作製し、最適化する必要がある事、②単一の標的分子しか認識できないため、標的分子の発現が低下・欠失した場合には効果を失うこと、③輸注したCAR-T細胞の機能制御が困難であることなど、問題点も多く存在しており、我が国ではこれまでにごく少数の臨床研究がおこなわれているのみである。そこで我々は、fluorescein isothiocyanate (FITC) にて標識したがん認識抗体と、FITCを認識するCAR遺伝子導入T細胞の組み合わせにより、現在のCAR-T細胞療法の問題点を克服できる新規免疫細胞療法を開発し、その有効性を動物モデルにて実証してきた。本研究課題では、この新規治療法のfirst in human医師主導第I相臨床試験に向けた前臨床研究を実施することを目標としている。また本研究では、日本人に多く発症し、進行した症例では有効な治療法が存在しない肝細胞がんを対象とし、肝細胞がん中で特異的に高発現しているglypican-3 (GPC3) を治療標的分子としてプロジェクトを推進する。

業務項目の担当責任者氏名・所属機関名・職名

1. FITC 認識 CAR-T 細胞を利用したがん免疫療法の開発
 - 玉田耕治 山口大学大学院医学系研究科免疫学分野、教授
 - 吉村清 国立がん研究センター、早期・探索臨床研究センター免疫療法開発、分野長
 - 北野滋久 国立がん研究センター中央病院先端医療科、医員
 - 佐藤暁洋 国立がん研究センター研究支援センター・研究企画部、部長
 - 尾崎雅彦 国立がん研究センター東病院・治験管理室、治験事務局長
2. 肝細胞がんに対する標的抗体の開発
 - 中面哲也 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター、免疫療法開発分野、分野長
 - 植村靖史、国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター免疫療法開発分野、ユニット長

A. 研究目的

本研究は、難治性がんである肝細胞がんに対する効果的治療法の開発を最終的な到達目標とし、「がん認識抗体と遺伝子導入 T 細胞を組み合わせた次世代がん免疫療法」の first in human 医師主導第 I 相臨床試験開始に向けた前臨床研究を実施することが目的である。本研究の基盤技術である FITC 認識 CAR-T 細胞システムは研究代表者の玉田らにより開発されたものであり、既に特許申請済である。また、標的蛋白となる glypican-3 (GPC3) は肝細胞がんにて特異的に発現する抗原として研究分担者の中面らによって同定されたものであり、がんワクチンを含む臨床研究が進められている。本研究では、FITC 標識した抗 GPC3 抗体と FITC 認識 CAR-T 細胞を作製し、その組み合わせによる画期的ながん免疫療法の臨床応用のために必要となる前臨床研究を実施する。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

上記研究目的の達成のため、平成 26 年度は以下の研究を実施した。業務項目 1 「FITC 認識 CAR-T 細胞を利用したがん免疫療法の

開発」に関わる事業として、①FITC 認識 CAR 配列における一本鎖抗体部分のヒト化、② FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター株の同定、③FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター 産生のマスターセルバンク候補株のスクリーニング、④ヒト T 細胞における FITC 認識 CAR ベクター導入プロトコルの最適化を実施した。また業務項目 2「肝細胞がんに対する標的抗体の開発」に関わる事業として、⑤膜型 GPC3 を認識する新規抗 GPC3 抗体の作製を実施した。また、各業務の進捗状況を管理し、効率的に推進することを目的とし、平成 26 年度中に 3 回の班会議を実施した。

(倫理面への配慮)

すべての研究内容は、前臨床研究において遵守すべき指針に従って実施し、実施施設である山口大学および国立がん研究センターに設置される各種委員会の承認のもとで実施された。すなわち、遺伝子組換え実験においては、遺伝子組換え実験委員会、健康人から供与されるヒト末梢血を用いる研究においては、倫理審査委員会、また動物を用いる実験においては、動物実験委員会の承認のもとで実施された。

C. 研究結果

① FITC 認識 CAR 配列における一本鎖抗体部分のヒト化 (一部外部委託)

CAR-T 細胞療法の臨床応用では、安全性および免疫原性の観点から、がん患者 T 細胞に遺伝子導入する CAR 配列をヒト化する必要がある。そこで、抗 FITC 一本鎖抗体部分について、FITC 認識に重要な CDR 領域のみを残し、それ以外のフレーム部分をヒト由来配列に置換した。様々なヒト由来フレームの組み合わせにより、計 25 種類のヒト化配列候補を合成し、その発現および FITC 結合性を測定した。発現率および結合活性の高い上位 3 つのヒト化抗 FITC-CAR 配列を同定した。

② FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター株の同定 (一部外部委託)

ヒト化した FITC 認識 CAR 配列をレトロウイルス発現ベクターに組み込み、遺伝子導入用レトロウイルスを作製した。これをヒト末梢血 T 細胞に感染させ、その発現を確認した。また、誘導した FITC 認識 CAR-T 細胞を FITC 付加した抗体にて刺激し、その反応性を確認するとともに、未刺激時の自己活性について検討した。その結果、T 細胞での発現効率が高く、自己活性を持たない FITC 認識 CAR 発

現レトロウイルスベクターを同定した。

③ FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター産生のマスターセルバンク候補株のスクリーニング (外部委託)

同定された FITC 認識 CAR 発現レトロウイルスベクターについて、それを産生するプロデューサー細胞から、限界希釈法にてクローンを作製した。各クローンからのウイルス産生量を測定し、3 つの FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター産生のマスターセルバンク候補株を樹立した。

④ ヒト T 細胞における FITC 認識 CAR ベクター導入プロトコルの最適化

山口大学および国立がん研究センターの研究室において、臨床応用において重要となるヒト T 細胞を用いた CAR-T 細胞の導入および発現の確認実験を実施した。それぞれの施設で再現性のある発現データが得られ、最適な SOP (standard operating procedure) を確立した。

⑤ 膜型 GPC3 を認識する新規抗 GPC3 抗体の作製 (一部外部委託)

抗 GPC3 抗体の樹立とそのヒト化、FITC 標識した抗体の GMP 産生に向けて、1) ヒト膜型 GPC3 蛋白質を免疫したマウスから細胞融合法によりハイブリドーマを樹立する方法、2) 抗体遺伝子ライブラリーを用いたファージディスプレイ法、さらに、3) ナイーブ抗体ライブラリーを含む RNA ディスプレイ法の 3 種類の方法により、膜型 GPC3 に特異的に結合する抗体作製を試みた。ヒト GPC3 はマウス GPC3 に高い相同性を有しているため、1) の方法では膜型 GPC3 に対する抗体は得られなかった。現在、2)、3) の方法で膜型 GPC3 特異的抗体の作製を実施中である。

上記①-⑤の研究結果は 6 ページ以降の各委託業務成果報告に詳しく記載する。

また、実施された研究成果を共有し、事業の進捗状況を管理すると同時に、今後の研究計画を確認することを目的として、平成 26 年 9 月 22 日、平成 27 年 1 月 13 日、3 月 23 日に合計 3 回の班会議を実施した。

D. 考察

FITC 認識 CAR-T 細胞の誘導および臨床応用に必要となる、抗 FITC 一本鎖抗体部分のヒト化、FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター株の同定、ウイルスベクター産生マスターセルバンク候補株の樹立、ヒト活性化 T 細胞での遺伝子導入の SOP 確立に関しては、当初

の予定通りに進捗している。抗 GPC3 抗体の樹立については、通常の免疫方法にて得られた抗体が膜型 GPC3 を認識しなかったため、その問題点を解決するような手法に変更して抗体作製を目指す。

E. 結論

FITC 認識 CAR-T 細胞と FITC 標識した抗 GPC3 抗体の組み合わせによる、肝細胞がんに対する画期的ながん免疫療法の臨床応用を目指して、FITC 認識 CAR ベクターのヒト化、発現ウイルスベクター株の同定、発現ウイルスベクター産生候補株の樹立、ヒト T 細胞への遺伝子導入法 SOP の確立をおこなった。また、膜型 GPC3 に対する抗体の作製に取り組んだ。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 玉田耕治. キメラ抗原レセプター (CAR) 遺伝子導入T細胞によるがん治療. 臨床免疫・アレルギー科. 62(3):344-348, 2014.
2. Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors. Eur J Pediatr Surg. 25(1):138-144, 2015.

2. 学会発表

1. Checkpoint blockade-based combination therapies against cancer.、玉田耕治、第 52 回日本癌治療学会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム (横浜) 2014 年 8 月 30 日
2. Immune checkpoint mechanisms mediated by PD-L1/CD80 interaction in mouse model.、玉田耕治、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日
3. 遺伝子改変 T 細胞療法の次世代技術開発: CAR-T 細胞療法の改良を目指して、玉田耕治、第 27 回日本バイオセラピー学会シンポジウム (大阪) 2014 年 12 月 4 日
4. Novel strategies of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for cancer immunotherapy.、玉田耕治、第 19 回がん研究会—国際癌化学療法シンポジウム (東京) 2014 年 12 月 11 日
5. CAR-T 細胞による免疫療法の将来展望、玉

田耕治、日本がん分子標的治療学会 第 10 回 TR ワークショップ (東京) 2015 年 1 月 20 日

6. がんに対する次世代型 CAR-T 細胞療法の開発、玉田耕治、第 12 回日本免疫治療学研究会シンポジウム (東京) 2015 年 2 月 28 日
7. ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞が豊富な細胞集団の誘導、吉村清、渡邊裕策、松隈聰、恒富亮一、前田祥成、山本 滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗、第 52 回日本癌治療学会学術集会 (横浜)、2014 年 8 月 28 日
8. Induction of cancer stem cells enriched population derived from human colon cancer cell line (SW480) by culture、Kiyoshi Yoshimura, Yusaku Watanabe, Satoshi Matsukuma, Ryouichi Tsunedomi, Yoshitaro Shindo, Yoshinari Maeda, Noriko Maeda, Shigeru Yamamoto, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Masaaki Oka、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日
9. Development of Cancer Immunotherapy by Blocking PD-1/PD-L1 interaction、吉村清、7th Annual Autumn Meeting for Clinical Oncology Association, International session (MOGA/KACO/JSMO) (韓国ソウル) 2014 年 10 月 24 日、
10. 免疫調整因子阻害剤の臨床開発、米国での経緯と現状、吉村清、第 4 回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して: 今取り組むべき課題 (東京) 2014 年 11 月 28 日
11. Emerging immunotherapy -免疫チェックポイント阻害剤について-、吉村清、金沢大学附属病院 第 13 回 消化器外科カンファレンス (金沢) 2015 年 2 月 2 日
12. インテグリンと癌肝転移、吉村清、国立がん研究センター 第 55 回 Monthly Progress Report (東京) 2015 年 2 月 24 日
13. がん免疫、吉村清、国立がん研究センター 2014 年度 NCC 若手会企画 第 5 回がん研究入門セミナー (東京) 2015 年 2 月 25 日
14. Immunomonitoring in clinical trials of immunomodulatory antibodies.、北野滋久、第 18 回日本がん免疫学会総会 日本バイオセラピー学会と日本がん免疫学会合同シンポジウム (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日

15. 進行メラノーマ患者における抗 CTLA-4 抗体療法後のがん抗原特異的細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞反応の増強、北野滋久、第 73 回日本癌学会学術総会 International session: Antibody therapy 国際シンポジウム (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
 16. Fine T cell analysis of patients treated with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Suicide Gene System in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.、Hashimoto H, Kitano S, Ueda R, Itoh A, Tada K, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Heike Y.、21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium. CANCER IMMUNOTHERAPY 2014 (New York, USA.) 2014 年 10 月 6 日～8 日
 17. がん免疫細胞療法の新しい展開、中面哲也、北野滋久、第 4 回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して:今取り組むべき課題 (東京) 2014 年 11 月 28 日
 18. がんに対する免疫療法の基本、中面哲也、教育セミナー「がん専門 CRC のためのアドバンストセミナー」、第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (福岡) 2014 年 7 月 17 日～19 日
 19. Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也、第 18 回日本がん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日
 20. Glypican-3 由来エピトープペプチド結合リポソームの CTL 誘導能の評価、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第 18 回日本がん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日
 21. Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide. (Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析)、吉川聡明、下村真菜美、澤田 雄、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
 22. Establishment of three-dimensional primary tumor cell culture method and novel drug sensitivity test. (肺がん初代培養細胞を用いた抗がん剤感受性試験の構築と検討)、下村真菜美、五字弘、伊藤学、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
 23. Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. (Glypican-3 由来ペプチドを結合したリポソームワクチンのペプチド特異的 CTL 誘導能評価)、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
 24. The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody. (抗 CD4 抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法の CTL プライミング効率を高める)、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
 25. Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也、第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会 (東京) 2015 年 2 月 28 日
 26. BCR-ABL - specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation. 上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新、第 76 回日本血液学会学術集会 (大阪) 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日
 27. Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.、上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新、第 43 回日本免疫学会学術集会 (京都) 2014 年 12 月 10 日～12 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

3. その他

特許出願 : Universal anti-tag chimeric antigen receptor-expressing T cells and methods of treating cancer (物質特許、用途特許)、Koji Tamada, Eduardo Davila、出願番号 PCT/US2011/064808、公開番号 W0/2012/082841.

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告

（FITC 認識 CAR-T 細胞を利用したがん免疫療法の開発）

業務担当責任者 玉田耕治

国立大学法人山口大学

大学院医学系研究科・免疫学分野教授

研究要旨

難治性がんに対する最先端の免疫療法として、fluorescein isothiocyanate (FITC) を認識するキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) を遺伝子導入したCAR-T細胞と、FITC標識したがん認識抗体の組み合わせによる治療法の医師主導第一相臨床試験開始を目指し、そのために必要となる前臨床研究として、1) FITC認識CAR配列における一本鎖抗体部分のヒト化、2) FITC認識CAR発現ウイルスベクター株の同定、3) FITC認識CAR発現ウイルスベクター産生のマスターセルバンク (master cell bank: MCB) 候補株のスクリーニング、4) ヒトT細胞におけるFITC認識CARベクター導入プロトコルの最適化を実施した。すべての研究計画は予定通りに実施され、臨床試験に使用可能なレベルでのFITC認識CAR-T細胞作製に向けて、そのGMP基準ベクター産生のためのMCBの用意が進むとともに、活性化T細胞への遺伝子導入法 (standard operating procedure: SOP) の確立がなされた。

A. 研究目的

本研究は、難治性がんに対する効果的治療法の開発を最終的な到達目標とし、「がん認識抗体と遺伝子導入 T 細胞を組み合わせた次世代がん免疫療法」の first in human 医師主導第 I 相臨床試験開始に向けた前臨床研究を実施することが目的である。本研究の基盤技術である FITC 認識 CAR-T 細胞システムは研究代表者の玉田らにより開発されたものであり、既に特許申請済であるが、本システムを利用した臨床試験のためには、FITC 認識 CAR コンストラクトをヒト化すると同時に、その発現ベクターを産生するプロデューサー細胞株を GMP 基準で樹立する必要がある。さらには、その細胞株から産生されるウイルスベクターを用い、最適化された SOP に従ってヒト T 細胞に遺伝子導入し、CAR-T 細胞の機能を誘導する必要がある。これらの必要性に適合するベクターや細胞株、SOP の構築を目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

上記研究目的の達成のため、①FITC 認識 CAR 配列における一本鎖抗体部分のヒト化、②FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター株の同定、③FITC 認識 CAR 発現ウイルスベクター産生のマスターセルバンク候補株のスクリーニング、④ヒト T 細胞における FITC 認識 CAR ベクター導入プロトコルの最適化を実施した。

（倫理面への配慮）

すべての研究内容は、前臨床研究において遵守すべき指針に従って実施し、実施施設である山口大学および国立がん研究センターに設置される各種委員会の承認のもとで実施された。すなわち、遺伝子組換え実験においては、遺伝子組換え実験委員会、健康人から供与されるヒト末梢血を用いる研究においては、倫理審査委員会、また動物を用いる実験においては、動物実験委員会の承認のもとで実施された。

C. 研究結果

① FITC 認識 CAR 配列における一本鎖抗体部分のヒト化（一部外部委託）

CAR-T 細胞療法の臨床応用では、安全性および免疫原性の観点から、がん患者 T 細胞に遺伝子導入する CAR 配列をヒト化する必要がある。我々の使用する CAR ベクター配列は、抗 FITC 一本鎖抗体部分以外はヒト遺伝子由来の配列であるため、残る抗 FITC 一本鎖抗体部分についてヒト化を試みた。最初に、抗 FITC 一本鎖抗体配列の L 鎖および H 鎖に関して、データベースとの相同性検索や論文検索などにより、FITC 認識に重要である CDR 領域のアミノ酸を同定した。次に、L 鎖および H 鎖のそれぞれについて、CDR 領域以外のフレーム部分について、ヒト免疫グロブリン遺伝子データベースの中から、最も相同性の

高い5つの配列を同定した。CDR領域のみを残し、それ以外のフレーム部分をヒト由来配列に置換したヒト化L鎖とH鎖を5種類ずつ作製し、その組み合わせにより、計25種類のヒト化抗FITC一本鎖抗体配列を合成した(資料1、ページ10-11)。これらを有するヒト化抗FITC-CARをT細胞に遺伝子導入し、その発現およびFITC結合性を測定した。発現率および結合活性の高い上位3つのヒト化抗FITC-CAR配列として、VL3VH1, VL4VH1, VL5VH1を同定した。

② FITC認識CAR発現ウイルスベクター株の同定(一部外部委託)

ヒト化FITC認識CAR配列VL3VH1, VL4VH1, VL5VH1のそれぞれをレトロウイルス発現ベクターpMS3に組み込み、プラスミドを精製した(資料2、ページ12-13)。これらのプラスミドをpGPベクターDNA、pE-ECOベクターDNAと共にG3T-hi細胞に一過性導入し、プロデューサー細胞調整用レトロウイルスベクターを作製した。このウイルスベクターのRNAコピー数を測定したところ、VL3/VH1; 1.35×10^{11} copies/mL、VL4/VH1; 1.83×10^{11} copies/mL、VL5/VH1; 1.59×10^{11} copies/mLであった(資料3、ページ15)。これらをPG13細胞に感染させ、ヒト化FITC認識CAR発現レトロウイルスを産生するプロデューサー細胞を作製した。これらの細胞により産生されたレトロウイルスベクターのRNAコピー数はVL3/VH1; 2.69×10^{10} copies/mL、VL4/VH1; 1.08×10^{10} copies/mL、VL5/VH1; 1.32×10^{10} copies/mLであった(資料3、ページ16)。

次に、上記プロデューサー細胞から得られたウイルスベクターをヒト末梢血T細胞に感染させ、その発現を確認したところ、VL3VH1, VL4VH1, VL5VH1のいずれにおいても良好な抗FITC-CARの発現が認められたが、特にVL4VH1の発現強度が高く、またT細胞中のプロウイルスコピー数に対するCAR発現率も最大であった(資料4、ページ24-26)。また、非特異的な自己活性について、遺伝子導入T細胞上のCD25およびCD69の発現にて検討したところ、いずれのウイルスベクターでも非特異的な自己活性は認められなかった(資料4、ページ27-28)。

③ FITC認識CAR発現ウイルスベクター産生のマスターセルバンク(MCB)候補株のスクリーニング(外部委託)

ヒト化抗FITC-CAR(VL4VH1)を産生するプロデューサー細胞を限界希釈法にてクロー

ン化し、MCB候補株の調整を試みた。1細胞から増殖したクローン35株を樹立し、各クローンの産生するRNAウイルスコピー数を測定したところ、クローン#10、#19、#24においてウイルス発現が認められ、FITC認識CAR発現ウイルスベクター産生のMCB候補株が調整できた(資料3、ページ22)。

④ ヒトT細胞におけるFITC認識CARベクター導入プロトコールの最適化

臨床試験の実施の際には、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入の標準的な作業手順が必要となることから、山口大学および国立がん研究センターそれぞれの研究室において、ヒトT細胞を用いたCAR-T細胞の導入および発現の確認実験を実施した。抗CD3抗体、抗CD28抗体、リコンビナントIL-2にて2日間刺激した末梢血T細胞に対して、プレートに固層化したレトロネクチン存在下で、ヒト化FITC認識CARレトロウイルスベクターを感染させた。感染3日後に抗FITC-CARの発現をフローサイトメトリーにて測定したところ、15-20%程度の発現率が認められた(資料5、ページ29)。若干の発現効率の低下はあるものの、国立がんセンター内の研究室でも同様のプロトコールにて、活性化ヒトT細胞への抗FITC-CARの遺伝子導入が認められた。

D. 考察

FITC認識CAR-T細胞の誘導および臨床応用に必要となる、抗FITC一本鎖抗体部分のヒト化、FITC認識CAR発現ウイルスベクター株の同定、ウイルスベクター産生MCB候補株の樹立、ヒト活性化T細胞での遺伝子導入のSOP確立に関して、当初の予定通りに実施できた。ヒト化した抗FITC-CARについては、プロウイルスコピー数当たりの発現レベルが高い点から、VL4VH1が最も適したベクター構造と考えられ、今後はVL4VH1から作製したMCB候補株からMCBの樹立を実施していく予定である。

E. 結論

FITC認識CAR-T細胞とFITC標識した抗GPC3抗体の組み合わせによる、進行がんに対する画期的ながん免疫療法の臨床試験開始に向けて、FITC認識CARベクターのヒト化、発現ウイルスベクター株の同定、発現ウイルスベクター産生MCB候補株の樹立、ヒトT細胞への遺伝子導入法SOPの確立について、当初の予定通りに実施された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 玉田耕治. キメラ抗原レセプター (CAR) 遺伝子導入T細胞によるがん治療. 臨床免疫・アレルギー科. 62(3):344-348, 2014.

2. 学会発表

1. Checkpoint blockade-based combination therapies against cancer.、玉田耕治、第 52 回日本癌治療学会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム (横浜) 2014 年 8 月 30 日
2. Immune checkpoint mechanisms mediated by PD-L1/CD80 interaction in mouse model.、玉田耕治、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日
3. 遺伝子改変 T 細胞療法の次世代技術開発: CAR-T 細胞療法の改良を目指して、玉田耕治、第 27 回日本バイオセラピー学会シンポジウム (大阪) 2014 年 12 月 4 日
4. Novel strategies of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for cancer immunotherapy.、玉田耕治、第 19 回がん研究会—国際癌化学療法シンポジウム (東京) 2014 年 12 月 11 日
5. CAR-T 細胞による免疫療法の将来展望、玉田耕治、日本がん分子標的治療学会 第 10 回 T R ワークショップ (東京) 2015 年 1 月 20 日
6. がんに対する次世代型 CAR-T 細胞療法の開発、玉田耕治、第 12 回日本免疫治療学研究会シンポジウム (東京) 2015 年 2 月 28 日
7. ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞が豊富な細胞集団の誘導、吉村清、渡邊裕策、松隈聡、恒富亮一、前田祥成、山本 滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗、第 52 回日本癌治療学会学術集会 (横浜)、2014 年 8 月 28 日
8. Induction of cancer stem cells enriched population derived from human colon cancer cell line (SW480) by culture、Kiyoshi Yoshimura、Yusaku Watanabe、Satoshi Matsukuma、Ryouichi Tsunedomi、Yoshitaro Shindo、Yoshinari Maeda、Noriko Maeda、Shigeru Yamamoto、Shigefumi Yoshino、Shoichi Hazama、

Masaaki Oka、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日

9. Development of Cancer Immunotherapy by Blocking PD-1/PD-L1 interaction、吉村清、7th Annual Autumn Meeting for Clinical Oncology Association, International session (MOGA/KACO/JSMO) (韓国ソウル) 2014 年 10 月 24 日、
10. 免疫調整因子阻害剤の臨床開発、米国での経緯と現状、吉村清、第 4 回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して: 今取り組むべき課題 (東京) 2014 年 11 月 28 日
11. Emerging immunotherapy -免疫チェックポイント阻害剤について-、吉村清、金沢大学附属病院 第 13 回 消化器外科カンファレンス (金沢) 2015 年 2 月 2 日
12. インテグリンと癌肝転移、吉村清、国立がん研究センター 第 55 回 Monthly Progress Report (東京) 2015 年 2 月 24 日
13. がん免疫、吉村清、国立がん研究センター 2014 年度 NCC 若手会企画 第 5 回がん研究入門セミナー (東京) 2015 年 2 月 25 日
14. Immunomonitoring in clinical trials of immunomodulatory antibodies.、北野滋久、第 18 回日本がん免疫学会総会 日本バイオセラピー学会と日本がん免疫学会合同シンポジウム (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日
15. 進行メラノーマ患者における抗 CTLA-4 抗体療法後のがん抗原特異的細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞反応の増強、北野滋久、第 73 回日本癌学会学術総会 International session: Antibody therapy 国際シンポジウム (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
16. Fine T cell analysis of patients treated with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Suicide Gene System in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.、Hashimoto H、Kitano S、Ueda R、Itoh A、Tada K、Tomura D、Nukaya I、Mineno J、Heike Y、21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium. CANCER IMMUNOTHERAPY 2014 (New York, USA.) 2014 年 10 月 6 日～8 日
17. がん免疫細胞療法の新しい展開、中面哲也、北野滋久、第 4 回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して: 今取り組むべき課題 (東京) 2014 年 11 月 28 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

1 Objective

The aim of this project is to humanize the antibody provided by client using CDR grafting method. Briefly, five (5) light chain human acceptors and five (5) heavy chain human acceptors were selected based on their homologies with parental antibody. The sequences of five (5) humanized light chains and five (5) humanized heavy chains were obtained after directly grafting the CDRs of the parental antibody to the human acceptor frameworks. Codons of twenty-five (25) humanized scFvs were optimized for expression in human; and gene synthesis and sub-cloning were performed.

2 Materials

Amino acid sequences of parental antibody, from client;
Vector, from client.

3 Methods and results

3.1 Humanization by CDR grafting: selection of acceptor frameworks

The variable domain sequences of parental antibody were searched against the database of germline and rearranged Ig Variable region sequences using NCBI Ig-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>). Five sets of human framework sequences with high homology to parental antibody were chosen as human acceptors for both light and heavy chains. The humanized variable domains of five (5) light chains were denoted as VL1, VL2, VL3, VL4 and VL5 in this project; while the humanized variable domains of five (5) heavy chains were denoted as VH1, VH2, VH3, VH4 and VH5.

3.2 Humanized scFv expression vectors construction

DNA sequences of humanized scFvs were optimized for human and confirmed by client (Appendix II). After optimization, Nco I enzymatic sites were found within the optimized sequences of 16 scFv clones, i.e. VL1VH1, VL1VH2, VL1VH3, VL1VH5, VL2VH1, VL2VH2, VL2VH3, VL2VH5, VL4VH1, VL4VH2, VL4VH3, VL4VH5, VL5VH1, VL5VH2, VL5VH3, VL5VH5. Therefore, scFv gene was cloned into the vector supplied by client using GenScript's proprietary CloneEZ® Seamless cloning technology, instead of conventional enzymatic digestion and ligation. The sketch map of scFv expression plasmids was shown in Figure 1. The DNA sequences were verified by sequencing and miniprep plasmids were prepared.

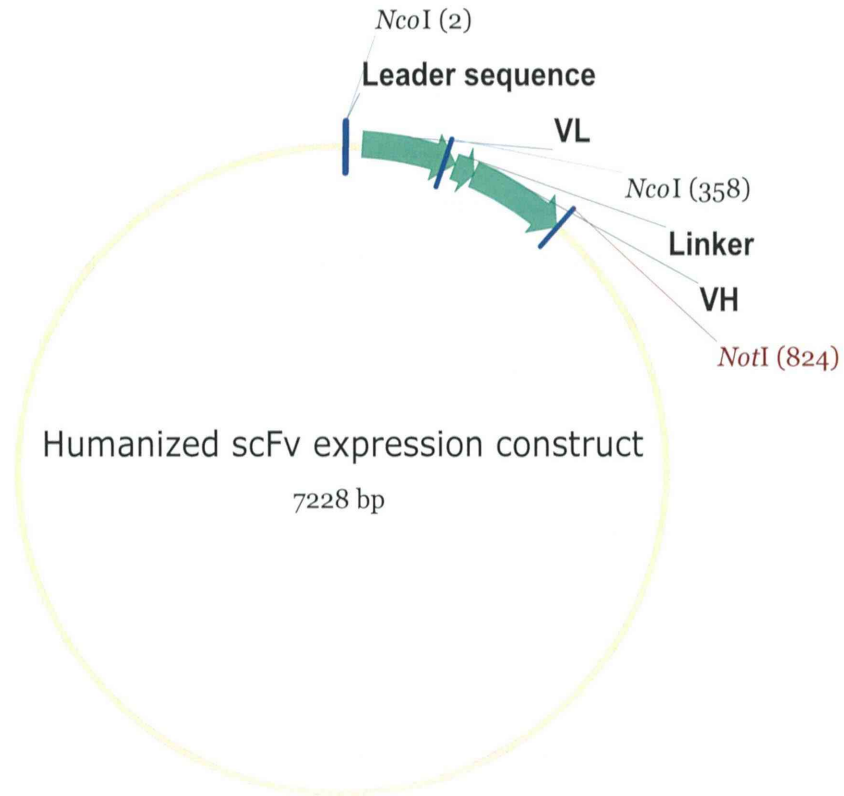


Figure 1. Sketch map of humanized scFv (VL-VH) expression construct.

4 Conclusion

In this project, parental antibody was humanized using CDR grafting. Twenty-five (25) scFvs were designed, synthesized and inserted into the vector that client provided.

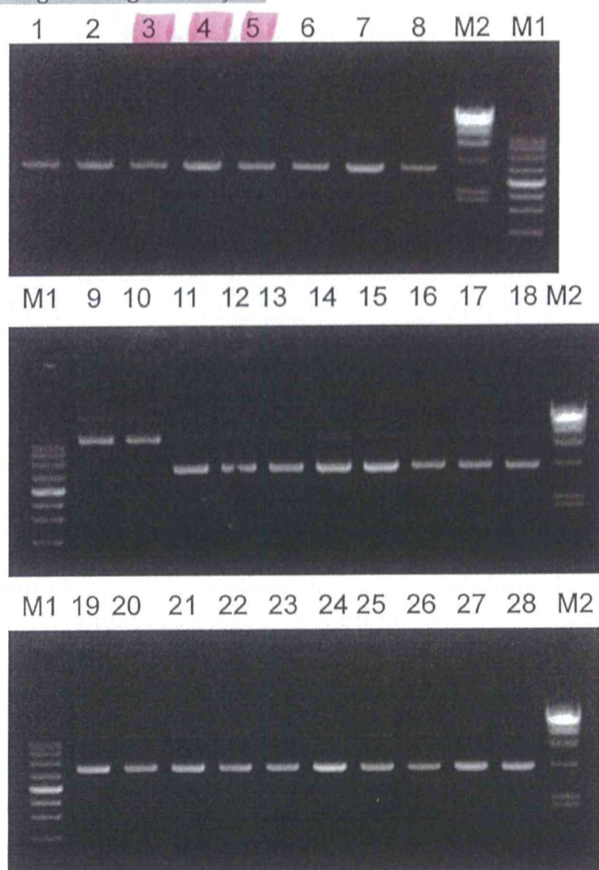
Service report (サンプルリスト)

	配列名称	配列長:bp	5' 末端修飾	3' 末端修飾	備考
SYN5064-1-35	VL1VH1		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-2-39	VL2VH1		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-3-51	VL3VH1		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-4-41	VL4VH1		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-5-40	VL5VH1		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-6-2	VL2VH4		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-7-41	VL3VH3		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-8-37	VL3VH4		ClaI	HpaI	pMS3-MC
SYN5064-9	VL1VH1				pMSGV-1
SYN5064-10	VL2VH1				pMSGV-1
SYN5064-11	VL3VH1				pMSGV-1
SYN5064-12	VL4VH1				pMSGV-1
SYN5064-13	VL5VH1				pMSGV-1
SYN5064-14	VL2VH4				pMSGV-1
SYN5064-15	VL3VH3				pMSGV-1
SYN5064-16	VL3VH4				pMSGV-1
SYN5064-17	Mouse AT-CAR				pMSGV-1
SYN5064-18	Human AT-CAR				pMSGV-1

資料 2

IV Result

1. Agarose gel analysis



M1: Supercoiled DNA Ladder Marker

- 1 : SYN5064-1-35(200 ng)
 - 2 : SYN5064-2-39(200 ng)
 - 3 : SYN5064-3-51(200 ng)
 - 4 : SYN5064-4-41(200 ng)
 - 5 : SYN5064-5-40(200 ng)
 - 6 : SYN5064-6-2(200 ng)
 - 7 : SYN5064-7-41(200 ng)
 - 8 : SYN5064-8-37(200 ng)
 - 9 : SYN5064-9(SYN5064-1template)(200 ng)
 - 10 : SYN5064-1template (提供サンプル)
 - 11 : SYN5064-10(SYN5064-2template)(200 ng)
 - 12 : SYN5064-2template (提供サンプル)
 - 13 : SYN5064-11(SYN5064-3template)(200 ng)
 - 14 : SYN5064-3template (提供サンプル)
 - 15 : SYN5064-12(SYN5064-4template)(200 ng)
 - 16 : SYN5064-4template (提供サンプル)
 - 17 : SYN5064-13(SYN5064-5template)(200 ng)
 - 18 : SYN5064-5template (提供サンプル)
 - 19 : SYN5064-14(SYN5064-6template)(200 ng)
 - 20 : SYN5064-6template (提供サンプル)
 - 21 : SYN5064-15(SYN5064-7template)(200 ng)
 - 22 : SYN5064-7template (提供サンプル)
 - 23 : SYN5064-16(SYN5064-8template)(200 ng)
 - 24 : SYN5064-8template (提供サンプル)
 - 25 : SYN5064-17(SYN5064-9template)(200 ng)
 - 26 : SYN5064-9template (提供サンプル)
 - 27 : SYN5064-18(SYN5064-10template)(200 ng)
 - 28 : SYN5064-10template (提供サンプル)
 - M2 : λ -Hind III digest DNA Marker
- 1% agarose gel

2. OD measurement (Nanodrop Spectrophotometer ND-2000c)

No.	Name	antibiotic	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Con. (ng/ μ l)	Volume (μ l)	Total (μ g)
1	SYN5064-1-35	Amp	1.87	2.23	546	100	55
2	SYN5064-2-39	Amp	1.87	2.22	534	100	53
3	SYN5064-3-51	Amp	1.87	2.23	533	100	53
4	SYN5064-4-41	Amp	1.84	2.21	536	100	54
5	SYN5064-5-40	Amp	1.87	2.23	539	100	54
6	SYN5064-6-2	Amp	1.87	2.23	545	100	55
7	SYN5064-7-41	Amp	1.85	2.20	541	100	54
8	SYN5064-8-37	Amp	1.87	2.21	541	100	54
9	SYN5064-9(SYN5064-1 template)	Amp	1.85	2.40	556	100	56
10	SYN5064-10(SYN5064-2 template)	Amp	1.85	2.39	538	100	54
11	SYN5064-11(SYN5064-3 template)	Amp	1.86	2.41	528	100	53
12	SYN5064-12(SYN5064-4 template)	Amp	1.86	2.40	565	100	57
13	SYN5064-13(SYN5064-5 template)	Amp	1.86	2.41	543	100	54
14	SYN5064-14(SYN5064-6 template)	Amp	1.86	2.40	550	100	55
15	SYN5064-15(SYN5064-7 template)	Amp	1.86	2.39	556	100	56
16	SYN5064-16(SYN5064-8 template)	Amp	1.86	2.39	565	100	57
17	SYN5064-17(SYN5064-9 template)	Amp	1.84	2.41	566	100	57
18	SYN5064-18(SYN5064-10 template)	Amp	1.86	2.40	557	100	56

1. 概要

抗 FITC Chimeric Antigen Receptor (CAR) 発現ベクタープラスミドを構築し、指定されたクローンについて一過性のレトロウイルスベクターを調製する。当該レトロウイルスベクターをパッケージング細胞に感染させることによりプロデューサー細胞（プール）を取得し、当該プロデューサー細胞から産生される目的遺伝子搭載レトロウイルスベクターの性能を確認する。その後、当該プロデューサー細胞より、将来のマスターセルバンク候補（pre-MCB）となる細胞のスクリーニングを行う。

2. 使用プラスミド DNA、細胞株および試薬

- ・トランスフェクションプラスミド DNA : 6321D_SYN5064 Service report 参照
 - SYN5064-3-51 (pMS3_VL3/VH1), 0.533 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - SYN5064-4-41 (pMS3_VL4/VH1), 0.536 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - SYN5064-5-40 (pMS3_VL5/VH1), 0.539 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - SYN5064-11 (pMSGV1_VL3/VH1), 0.528 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - SYN5064-12 (pMSGV1_VL4/VH1), 0.565 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - SYN5064-13 (pMSGV1_VL5/VH1), 0.543 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- ・レトロウイルス調製細胞 : G3T-hi 細胞 (TaKaRa Code.6163)
- ・プロデューサー細胞作製用細胞 : PG13 細胞
- ・G3T-hi 細胞および PG13 細胞基本培地 : 10% FBS / DMEM
 - DMEM(High Glucose) (SIGMA Code.D5796)
 - Fetal Bovine Serum (FBS) (Bovagen, Code.555-06605, lot. 1309A)
- ・酪酸ナトリウム (和光純薬, Code.193-01522)
- ・PBS(-) (Invitrogen, Code.10010-049)
- ・Trypsin-EDTA 溶液 (Invitrogen, Code.25200-052)
- ・トランスフェクション試薬 : *TransIT-293* Transfection Reagent (Mirus Code.MIR2700)
- ・Retrovirus 粒子産生用試薬 : Retrovirus Packaging Kit Eco (TaKaRa Code.6160)
- ・Retrovirus RNA コピー数測定用試薬 : Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (TaKaRa Code.6166)
- ・リアルタイム PCR 装置 : Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, Code.TP900)
- ・マイコプラズマ汚染確認試薬 :
 - MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza Code. FL073)
- ・凍結保存液 : CELLBANKER 1plus(TaKaRa, Code.CB021)

3. 方法と結果

3-1. プロデューサー細胞調製用レトロウイルスベクター溶液 (Eco env.) の調製

TransIT-293 トランスフェクション試薬を用いて、G3T-hi 細胞に目的遺伝子発現用プラスミド DNA、pGP ベクターDNA、pE-Eco ベクターDNA を共導入し、プロデューサー細胞調製用組換えレトロウイルスベクター溶液を作製した。方法は下記の通りである。

1 プラスミドDNA当たり Collagen I coated 6 cmディッシュ 2 枚に 2.0×10^6 個/ディッシュでG3T-hi細胞を播種し、24 時間培養した後、*TransIT-293* トランスフェクション試薬によりディッシュ 1 枚当たり目的

資料 3

遺伝子発現用プラスミドDNA (2 µg) とpGPベクターDNA (gag-pol遺伝子発現ベクター) (2 µg)、およびpE-EcoベクターDNA (Ecotropic env遺伝子発現ベクター) (1 µg) を共導入した。導入方法は試薬に添付のプロトコルに従った。DNAトランスフェクション開始から約 24 時間後に新たな培地に交換し、さらに 24 時間の培養を行った。DNAトランスフェクション開始から約 48 時間後に各ディッシュより上清を回収し、0.45 µm フィルターで濾過したものをプロデューサー細胞調製用組換えレトロウイルスベクター溶液とし、1 mL/vial で分注後、-80°C に保存した。

トランスフェクション操作の確認用に蛍光タンパク質発現プラスミド (pDON-ZsG) を導入した細胞ディッシュも準備し、同様の操作を行い、操作に問題のないことを確認した。

3-2. プロデューサー細胞調製用組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数の算出

3-1 で調製した組換えレトロウイルスベクター (pMS3 骨格, Eco env., 3 種) の RNA コピー数を、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて算出した。方法は下記の通りである。

One step リアルタイム RT-PCR 解析

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて組換えレトロウイルスベクター溶液の DNase I 処理を実施した (反応条件は表 1 を参照)。DNase I 処理後、EASY Dilution で 500 倍に希釈した。One step リアルタイム RT-PCR 反応は、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) のプロトコルに従い、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて表 1 に示す反応条件で行った。Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) に含まれる RNA Control Template を用いて検量線を作成し、被検サンプルの RNA コピー数を算出した。

二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値を Y 軸に、RNA Control Template のコピー数を X 軸にプロットして検量線を作成した。この検量線より被検サンプルの RNA コピー数を算出した (表 2 に RNA Control Template の測定データを、図 1 に検量線を、表 3 に被検サンプルのリアルタイム RT-PCR 測定データをそれぞれ示す)。

One step リアルタイム RT-PCR 解析結果より、作製したプロデューサー細胞調製用組換えレトロウイルスベクターは下記の RNA タイターを示した。

SYN5064-3-51 (pMS3_VL3/VH1)	: 1.35E+11 copies/mL
SYN5064-4-41 (pMS3_VL4/VH1)	: 1.83E+11 copies/mL
SYN5064-5-40 (pMS3_VL5/VH1)	: 1.59E+11 copies/mL

3-3. PG13 細胞のセットアップ

PG13 細胞の細胞増殖と形態の異常の有無について確認し、マイコプラズマ検査を行った。方法は下記の通りである。

Tissue Culture Dish で培養を行い、約 90% 程度のコンフルエンスに達したら、培養上清を除き、PBS(-) で一回洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA 溶液を加えて室温で 2~3 分インキュベートし、細胞をディッシュより剥離した。適当量の基本培地を加え、ピペッティングによりシングルセルの細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液を 10-20 倍に希釈して新しいディッシュに継代した。以降、同様の方法で培養を継続し、2 回以上継代して細胞の増殖や形態に問題がないことを確認した。同時に培養上清について、MycoAlert Mycoplasma

Detection Kit を用いてマイコプラズマ汚染がないことを確認した（表 4 参照。検査方法は添付のプロトコールに従った）。

3-4. プロデューサー細胞（プール）の作製

ポリブレン試薬を用いて 3-1. で調製したプロデューサー細胞調製用レトロウイルスベクター溶液を PG13 細胞に感染させ、プロデューサー細胞（レトロウイルスベクター 2 回感染プール）を作製した。方法は下記の通りである。

プロデューサー細胞（レトロウイルスベクター 2 回感染プール）の作製

6 ウェルプレートに 3×10^4 個/ウェルで PG13 細胞を播種し、約 24 時間培養した。基本培地で 4 倍希釈したウイルス溶液にポリブレン（終濃度 $8 \mu\text{g/mL}$ ）を添加し、細胞に感染させた。4 時間後に上清を除き、同様の方法で調製したポリブレン添加ウイルス希釈溶液を、再度細胞に感染させた。翌日基本培地 1 mL を添加し、培養を継続した。

細胞の状態、および増殖速度に合わせて 6 ウェルプレートより細胞を回収し、10 cm ディッシュに拡大培養した。感染開始後 8 日目以降に細胞を回収し、凍結保存液 CELLBANKER 1plus を用いて、 1×10^6 個以上/バイアルで凍結細胞ストックを作製し、 -80°C 保存した。

3-5. 目的遺伝子搭載レトロウイルスベクター溶液（GaLV env.）の作製

プロデューサー細胞（2 回感染プール）より目的遺伝子搭載レトロウイルスベクター溶液の作製を行った。方法は下記の通りである。

10 cm ディッシュ 5 枚に 3×10^6 個/ディッシュで 3-4. で作製した各プロデューサー細胞（2 回感染プール）を播種した。約 24 時間培養後、培養上清を除去し、1 ディッシュあたり 8 mL の 5 mM 酪酸ナトリウム含む基本培地を添加した。24 時間培養後に各ディッシュより上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過したものを目的遺伝子搭載レトロウイルスベクター溶液とし、1 mL/vial で分注後、 -80°C に保存した。

3-6. 目的遺伝子搭載レトロウイルスベクター溶液の RNA コピー数の算出

3-5. で調製した組換えレトロウイルスベクター（pMS3 骨格, GaLV env., 3 種）の RNA コピー数を、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて算出した。方法は 3-2. に記載の通りである。

二次微分曲線（2nd Derivative）から算出した Ct 値を Y 軸に、RNA Control Template のコピー数を X 軸にプロットして検量線を作成した。この検量線より被検サンプルの RNA コピー数を算出した（表 2 に RNA Control Template の測定データを、図 1 に検量線を、表 5 に被検サンプルのリアルタイム RT-PCR 測定データをそれぞれ示す）。

One step リアルタイム RT-PCR 解析結果より、プロデューサー細胞より作製した目的遺伝子搭載組換えレトロウイルスベクター（GaLV env.）は下記の RNA タイターを示した。

SYN5064-3-51 (pMS3_VL3/VH1)	: $2.69\text{E}+10$ copies/mL
SYN5064-4-41 (pMS3_VL4/VH1)	: $1.08\text{E}+10$ copies/mL
SYN5064-5-40 (pMS3_VL5/VH1)	: $1.32\text{E}+10$ copies/mL

資料 3

3-7. マスターセルバンク候補細胞の調製

ご指定のプロデューサー細胞 (Pool) について、限界希釈法にてクローニングを行った。取得したクローンより調製した組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数を、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて算出した。方法は 3-2.に記載の通りである。

96 ウエルプレート 5 枚に 3-4.で作製した pMS3_VL4/VH1 遺伝子発現プロデューサー細胞 (2 回感染プール) を 0.5 個/ウエルになるように播種し、クローンの取得を行った。1 細胞から増殖してきたクローン細胞について 24 ウエルプレート、6 ウエルプレート、10 cm ディッシュと培養を拡大した。最終的に 35 個のクローン細胞を得た。各クローンを凍結保存液 CELLBANKER 1plus を用いて、 1×10^6 cell/vial で凍結細胞ストックを各 10 本作製し、 -80°C 保存した。同時に RNA タイター測定用に培養上清を回収し、 -80°C 保存した。

3-8. マスターセルバンク候補細胞由来レトロウイルスベクター溶液の RNA コピー数の算出

3-7.で調製した組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数を、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) を用いて算出した。方法は 3-2.に記載の通りである。

二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値を Y 軸に、RNA Control Template のコピー数を X 軸にプロットして検量線を作成した。この検量線より被検サンプルの RNA コピー数を算出した (表 6 に RNA Control Template の測定データを、図 2 に検量線を、表 7 に被検サンプルのリアルタイム RT-PCR 測定データをそれぞれ示す)。

One stepリアルタイムRT-PCR解析結果より、Clone No. 10, 19, 24 についてRNAタイターが確認できた。