

筑波大学

博士(医学)学位论文

遺伝子治療の臨床応用に向けた
9型アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV9)の
クロマトグラフィー精製法開発
および rAAV 安定性評価

2 0 1 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

伴 野 太 郎

目次

第1章 序論	1
第2章 実験目的	8
第3章 材料および方法	
3-1 rAAV9 精製法検討	
3-1-1 細胞培養	9
3-1-2 プラスミド	9
3-1-3 rAAV9 作製法および rAAV9 粗精製	10
3-1-4 rAAV9 のイオン交換カラムおよびゲル濾過カラムクロマトグ ラフィー精製	12
3-1-5 ウイルス力価測定	13
3-1-6 SDS-PAGE とウエスタブロットング	14
3-1-7 ヒトゲノム DNA の混入	15
3-1-8 電子顕微鏡観察	15
3-1-9 分析用超遠心 (AUC)	16
3-1-10 AUC データ解析	16

3-2 rAAV の安定性評価

3-2-1	細胞培養	17
3-2-2	プラスミド	17
3-2-3	rAAV 作製法および精製法	17
3-2-4	野生型 AAV2 (wtAAV2)	18
3-2-5	感染性評価を行うための AAV の様々な化合物・混合物・環境 への曝露	18
3-2-6	感染性変化を調べるための蛍光顕微鏡観察および TCID ₅₀ ア ッセイ	18

第4章 結果

4-1 rAAV9 精製法

4-1-1	硫酸アンモニウムによる rAAV9 の粗精製	21
4-1-2	AAV9-dsEGFP の4級アンモニウム陰イオン交換カラムおよ びゲル濾過クロマトグラフィー精製	21
4-1-3	再現性の確認および品質評価	23
4-1-4	適用	24

4-2 rAAV の安定性評価

4-2-1	rAAV1、rAAV8、rAAV9 の感染力の変化	26
4-2-2	rAAV2、wtAAV2 の感染力の変化	27

第5章 考察	28
第6章 結語・今後の方針.....	35
謝辞.....	36
出典.....	37
参考文献	38
図表.....	45

略号

ADA ・ ・ Adenosine Deaminase, アデノシンデアミナーゼ

X-SCID ・ ・ X-linked severe combined immunodeficiency, X 連鎖重症複合免疫不全症

rAAV ・ ・ recombinant adeno-associated virus, アデノ随伴ウイルスベクター

wtAAV ・ ・ wild-type adeno-associated virus, 野生型アデノ随伴ウイルス

ITR ・ ・ Inverted Terminal Repeat

ssAAV ・ ・ single stranded AAV

scAAV ・ ・ self-complementary AAV

dsAAV ・ ・ double-stranded AAV

trs ・ ・ terminal resolution site

HEK293 細胞 ・ ・ Human Embryonic Kidney cells 293,

ヒト胎児腎由来不死化細胞株

HEK293EB 細胞 ・ ・ HEK293 cells expressing the *E1* gene region [*E1A*,

E1B19K, and *E2A*] and the *Bcl-xL* gene

FBS ・ ・ Fetal Bovine Serum

DMEM ・ ・ Dulbecco's modified Eagle's medium

CBA プロモーター ・ ・ chicken beta actin プロモーター

CMV プロモーター ・ ・ cytomegalovirus プロモーター

EGFP ・ ・ Enhanced Green Fluorescent Protein

RFLuc ・ ・ Red Firefly Luciferase

TFF ・ ・ Tangential Flow Filtration, 接線流限外濾過

AS · · Ammonium Sulfate, 硫酸アンモニウム

MHN バッファー · · 3.3 mM morpholinoethanesulfonic acid, 3.3 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, and 3.3 mM sodium acetate バッファー

PCR · · Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE · · Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel
Electrophoresis

CBB · · Coomassie Brilliant Blue

TBST · · Tris-buffered saline containing 0.05% Tween® 20

HRP · · Horse Radish Peroxidase

v.g. · · vector genome

AUC · · Analytical Ultracentrifugation

CsCl · Cesium chloride

GMP · · Good Manufacturing Practice

GAPDH · · Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ATCC · · American Type Culture Collection

UV · · Ultraviolet ray

NaOH · · Sodium hydroxide

NaClO · · Sodium hypochlorite

EtOH · · Ethanol

TCID₅₀ · · Median Tissue Culture Infectious Dose

第1章 序論

遺伝子治療の歴史は順風満帆ではなかった。1990年にアメリカで世界初の遺伝子治療がアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に対して行われ¹、1995年には日本初の遺伝子治療がADA欠損症に対して行われた²。この時代は遺伝子治療の創成期で盛んに遺伝子治療研究が進んでいたが、1999年にアデノウイルスベクター大量投与による死亡事故がアメリカで³、2002年にはX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対する遺伝子治療の副作用による白血病がフランスで⁴起きてしまい、遺伝子治療の停滞期を迎えてしまった。しかし、2012年にヨーロッパで初めて遺伝子治療薬(alipogene tiparvovec, Glybera®)が承認され⁵、2017年にはアメリカでも遺伝子治療薬(voretigene neparvovec, Luxturna™)が承認された⁶ことをきっかけとして、再び遺伝子治療が脚光を浴び再興期を迎え、現在は実用化の流れが出来始めている。

遺伝子治療は、疾病の治療や予防を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること（遺伝子治療等臨床研究に関する指針, 2015年改正）と定義されている。そのため、正常な遺伝子や治療遺伝子、さらには現在注目を集めているゲノム編集関連遺伝子をヒトの体内に運搬・導入することが遺伝子治療を成功させる鍵となっている。その遺伝子運搬の役割を担うものの一つがウイルスベクターである。ウイルスベクターとは、野生型ウイルスゲノムの複製・構成因子を治療遺伝子などの導入遺伝子に組換えたウイルスであり、ウイルスが細胞に感染する能力を活用して遺伝子を細胞へ導入する。遺伝子治療用ウイルスベクターとして、患者に直接投与する *in vivo* 法ではアデノ

随伴ウイルスベクター (rAAV) やアデノウイルスベクターが、患者から採取した幹細胞に体外でウイルスベクターを感染・増殖させて再度患者の体内に投与する *ex vivo* 法ではレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが主に用いられる⁷ (Table 1)。

我々が研究している AAV の性質であるが、野生型 AAV (wtAAV) はエンベロープタンパク質を持たない直径 20-26 nm の正二十面体の非病原性一本鎖 DNA ウイルスで、パルボウイルス科デペンドウイルス属に属するウイルスである⁸⁻¹⁰。wtAAV ウイルスゲノムの両端には、パッケージング配列を含有しヘアピン構造をとる Inverted Terminal Repeats (ITRs) が存在し、複製やパッケージングに関わる *rep* 遺伝子とキャプシド形成に関わる *cap* 遺伝子が ITR 間にコードされている。遺伝子治療用 rAAV ゲノムは、*rep* と *cap* 遺伝子を除去し、ITR 間に目的遺伝子(治療遺伝子など) の発現カセット(プロモーターを含む) を挿入している (Figure 1a)。rAAV は非病原性ウイルス由来のため安全性が高い点、筋細胞や神経細胞などの終末分化した非分裂細胞に効率良く遺伝子導入でき遺伝子発現が長期間持続する点¹¹、さらに熱や pH に対する物理化学的安定性を持っている点において、遺伝子治療用ベクターとして非常に有用であると考えられている。

rAAV を作製する際、現在はウイルスフリーで作製する方法が主流である。AAV 自身は増殖能を保持しておらず、名前が表している通りアデノウイルスが存在することで増殖能力を獲得する。そのため、以前は rAAV 作製の際にアデノウイルスを共感染させて作製していたが、現在はアデノウイルスの因子を搭載したプラスミドを用い、ウイルスフリーで作製している。具体的には 3 種

のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションして作製する^{12, 13}。3 種のプラスミドとは、ITR 間に挟まれた治療遺伝子を搭載したベクタープラスミド(*cis* プラスミド)、*rep* および *cap* 遺伝子を搭載したキャプシドプラスミド(*trans* プラスミド)、およびアデノウイルスヘルパープラスミドである。rAAV 作製時のウイルスゲノム複製機構について以下に述べる。

rAAV ゲノムの基本骨格として、野生型である一本鎖 DNA タイプ (single stranded AAV : ssAAV)、および ITR 内の terminal resolution site (*trs*) と呼ばれる部位に変異があり分子内で相補的にアニーリングする二本鎖 DNA タイプ (self-complementary AAV, double-stranded AAV : scAAV, dsAAV) の 2 種が普及している。ssAAV の複製機構は、片方の ITR から HEK293 細胞の DNA ポリメラーゼを利用してセカンド鎖の合成が始まり、もう一方の ITR まで合成鎖が伸びたら Rep タンパク質によって *trs* 部位が切断され、Rep タンパク質のヘリカーゼ活性によって ITR 部分のヘアピン構造が解れ一本鎖となり、その部分も DNA ポリメラーゼによって合成され、最終的に合成された ITR 部分が再びヘアピン構造をとることで複製が完了する(Figure 1b)。

Figure 1b に示されている通り、ssAAV は複製するとプラス鎖とマイナス鎖が 1 つずつできる。dsAAV は変異がない ITR が 2 つ(wtITR)、および *trs* に変異がある ITR が 1 つ(mITR) の計 3 つの ITR が存在する。複製機構は ssAAV と同様に片方の wtITR から合成が始まり、ssAAV と同様の複製機構をたどる。そして、dsAAV でも ssAAV でも複製されたウイルスゲノムは、Rep タンパク質を介してキャプシドにパッケージングされる。

以上のようにして作製した rAAV は、最終的に精製して治療に用いる。AAV には現在 100 種以上の血清型が報告されている。2 型 AAV (rAAV2) は、作製の際、大部分が HEK293 細胞内にとどまるが、1・6・8・9 型 AAV (rAAV1・rAAV6・rAAV8・rAAV9) など、多くの血清型は培養上清に多く分泌される。同じ精製法でも、細胞由来の rAAV と培養上清由来の rAAV では最終精製物の純度が異なり、培養上清由来の rAAV の方が夾雑タンパク質が少なく純度が高い。そのため、可能な限り培養上清から回収した rAAV を精製することが望ましい。主に精製過程で除去すべきものは、中空粒子・中間体・夾雑タンパク質である。中空粒子とは、ウイルスゲノムがパッケージングされていないキャプシドタンパク質のみの粒子のことで、これが最終精製物に多く存在するとヒトに投与した際、目的臓器へのトランスダクション時にウイルスゲノムがパッケージングされた完全粒子の rAAV と競合してしまい、遺伝子導入効率が格段に下がってしまうため、できるだけ除去することが求められる。また中間体とは、ウイルスゲノムの一部がキャプシドタンパク質にパッケージングされた粒子であり、これも中空粒子と同じ理由で遺伝子導入効率を下げる要因となってしまうため除去することが必要である。夾雑タンパク質は、アジュバントとして働く可能性があるため、なるべく純度を高く精製することが望ましい。これらの物質を除去する方法として、これまで密度勾配超遠心分離法が行われてきており、現在でも主流となっている¹⁴⁻¹⁶。しかしこの方法は、GMP 製造を行うことや、大量生産を達成することにおいてハードルが高いため、代替の手法の開発が望まれており、その筆頭としてクロマトグラフィー精製法が挙げられる。

これまで報告されている rAAV のクロマトグラフィー精製法には、イオン交換カラムクロマトグラフィー¹⁷⁻²³、アフィニティーカラムクロマトグラフィー²⁴⁻²⁶、疎水性カラムクロマトグラフィー²⁷、ゲル濾過クロマトグラフィー²⁸などの方法がある。イオン交換カラムクロマトグラフィーは、rAAV サンプルの pH や塩濃度を調整することで rAAV の荷電を調節し、rAAV をカラム担体に吸着させ、塩濃度を上げて溶出する方法である。アフィニティーカラムクロマトグラフィーは、rAAV のキャプシドに対する抗体をカラム担体に取り付け、rAAV を抗体でトラップし、pH を酸性側にすることで rAAV を溶出する方法である。疎水性カラムクロマトグラフィーは、rAAV サンプルの pH や塩濃度を調整することで、キャプシドにおける疎水性の強いアミノ酸残基を露出させ、カラム担体と疎水結合させ、塩濃度を下げて溶出する方法である。ゲル濾過クロマトグラフィーは、分子の大きさによってタンパク質を分離する方法で、分子量の大きい rAAV と他の夾雑タンパク質を分離するのに適している。

以上のような方法で精製した rAAV をヒトに投与した際、rAAV は体内で以下のような機構で発現する。rAAV は標的細胞膜に存在する受容体と結合し、エンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドソームに包まれて核まで運ばれる²⁹。エンドソーム内の低 pH 環境に曝露されるとカプソメアに構造変化が起こり、ウイルス粒子内部よりリン脂質分解酵素活性部位 (phospholipase A2 domain) が露出することでエンドソームの脂質二重膜を破って細胞質内に脱出する³⁰ (5 型などの一部の血清型は除く)。核内への移行と共に脱殻し、核内で rAAV ゲノムが露出する。ssAAV の遺伝子発現には核内でプラス鎖とマイナス鎖が相互にアニーリングするか、セカンド鎖が合成されるかのいずれかが

必要となるが、どちらの場合も二本鎖となる行程が遺伝子発現の律速段階となる³¹。一方、dsAAV^{32, 33}は“分子内”で効率良くアニーリングして二本鎖になるため遺伝子発現までの期間が短い。ただし、AAVはもともと小さなウイルスであるため、発現カセットのサイズはssAAVで約4.7 kb、dsAAVで約3.2 kbまでが搭載できる上限であり³⁴、治療遺伝子が大きい場合などはrAAVの設計に注意を要する。二本鎖となったベクターゲノムが染色体に挿入される確率は極めて低く、大部分はエピゾーマルな状態で発現し、核内でコンカタマーを形成するため長期発現に至る。

血清型ごとに受容体や組織指向性が異なる^{35, 36}ため、治療目的や遺伝子導入する組織に応じてrAAVの血清型を使い分けることで、様々な治療が可能となる³⁷。先に紹介したGlybera®は1型アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV1)を用いたリポタンパクリパーゼ欠損症に対する治療薬で³⁸、Luxturna™はrAAV2を用いたレーバー先天性黒内障に対する治療薬である。rAAVを用いた遺伝子治療はパーキンソン病³⁹⁻⁴²、血友病⁴³、筋ジストロフィー⁴⁴などに対しても効果が証明されている。

rAAVを用いた遺伝子治療⁴⁵⁻⁴⁸は今後さらに普及することが期待されているが、ヒトへの投与に十分な質と量を製造および精製する系(大量製造・精製系)が未だ確立されていないことが現在の課題となっている。それと同時に、日本ではカルタヘナ第一種使用規程がrAAVを用いた遺伝子治療の臨床試験のハードルを上げている。カルタヘナ第一種使用規程におけるrAAVの最大の懸念は、投与後に患者から排出されたrAAVが環境内の第三者や生物に感染し、生物多様性に影響を及ぼすことである。アメリカでは臨床試験時に得られたデー

タを基に承認申請時に rAAV の環境影響評価を提出するが、日本では臨床試験開始前にカルタヘナ第一種使用規程の申請書と併せて生物多様性影響評価書を提出することになっている。つまり日本では、rAAV の環境への影響を推測しなければならない。評価書には rAAV の感染性や不活化条件をはじめとする生理・生態学的特性を記入することとなっているが、これまで rAAV の感染性や安定性についての報告はわずかであり、生物多様性影響評価書に記載できるだけのデータが蓄積されておらず、そのこともあって日本での臨床試験が停滞している。また rAAV の性質を把握していないと、患者から排出された rAAV の取扱いにも困窮し、患者の個室管理、つまり患者をどれくらいの期間隔離すればいいか等が判別できず、患者にとって感情的および身体的負担になるのみならず医療従事者にとっても負担となってしまう。そのため、rAAV の基礎的な特性を調べることは今後の遺伝子治療を普及させるのに必要不可欠なことである。

第2章 実験目的

rAAV を用いた遺伝子治療の臨床応用に向け、rAAV9 を密度勾配超遠心分離法を使用せずに、クロマトグラフィー精製のみ(イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィー) で大量かつ高純度に精製する方法を確立すること、および rAAV の安定性の基礎データを取得することを目的とした。我々は以前、rAAV1 のクロマトグラフィー精製法について報告しているが、今回 9 型の血清型に着目した理由は、rAAV9 は筋ジストロフィーなどの神経筋疾患に対する遺伝子治療で多くの実績を積んでおり非常に有用であることが示唆されているためである。rAAV の安定性に関しては、4 種の血清型の rAAV を様々な化合物・混合物・環境に曝露した際の感染力の変化を調べることで評価した。

第3章 材料および方法

3-1 rAAV9 精製法検討

3-1-1 細胞培養

ヒト胎児腎由来不死化細胞株(HEK293 細胞) および *E1* 遺伝子と *Bcl-xL* 遺伝子を導入した HEK293 細胞(HEK293EB 細胞)を、8%の牛胎児血清(FBS, Biowest, Nuaille, France) およびペニシリンとストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) で 37°C・5% CO₂ の環境下で培養した。HEK293 細胞は rAAV9 の硫酸アンモニウム沈殿の条件検討の際に使用した。HEK293EB 細胞は、16 枚の Square dish (245 × 245 × 18 mm, 500 cm²; 計 8,000 cm², Corning, New York, NY) に $\sim 3.2 \times 10^9$ 個播種し、rAAV9 のクロマトグラフィー精製法の検討の際に用いた(総培養液量は 1120 mL)。

3-1-2 プラスミド

rAAV9 精製研究では、3つの *cis* プラスミドである pdsAAV-CBA-EGFP (AAV9-dsEGFP 用)、pdsAAV-CBA-RFLuc (AAV9-dsLuc 用、RFLuc: Red Firefly Luciferase)、および pssAAV-CMV-RFLuc (AAV9-ssLuc 用) を用いた。pdsAAV-CBA-EGFP は、両端が AAV2 型 ITR で、その間に Chicken beta actin (CBA) プロモーターの制御下で発現する EGFP 遺伝子をコードした dsAAV 用のプラスミドで、フロリダ大学の Dr. Arun Srivastava から寄贈

していただいた。pdsAAV-CBA-RFLuc (dsAAV 用プラスミド) は以下の通りにクローニングした。まず、プライマー 5'-AACGAATTCGGATCCGCCACCATGGAAACAGAAAGAGAAGAAAACG -3' および 5'-CTGGAATTCAAGCTTCTACCCACCTGCTTGAGGTTTCTTG-3' を用いて、pCMV-RFLuc (Targeting Systems, El Cajon, CA) の RFLuc 部位を PCR で増幅し、得られた PCR 産物を *NcoI* および *HindIII* により制限酵素処理し、最終的に pdsAAV-CBA-EGFP の EGFP 部分と組換えた。pssAAV-CMV-RFLuc (ssAAV 用プラスミド) は、RFLuc 断片を上記のように PCR で増幅し、pAAV-MCS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) の *EcoRI*-*HindIII* 部位にクローニングして作製した。*trans* プラスミドである pAAV2/9 (AAV2 型 *rep* 遺伝子および 9 型 *cap* 遺伝子を使用) は、James M. Wilson (ペンシルバニア大学) から寄贈していただいた。アデノウイルスヘルパープラスミドである pHelper は、Stratagene (La Jolla, CA) から購入した。

3-1-3 rAAV9 作製および rAAV9 粗精製

HEK293 細胞または HEK293EB 細胞を培養し、細胞密度が 90% 以上の状態であることを確認した。そして、rAAV9 作製に必要なプラスミド、すなわち *cis* プラスミド・pAAV2/9・pHelper の 3 種を Square dish 1 枚当たり *cis* プラスミド: pAAV2/9: pHelper = 44.8 μ g : 44.8 μ g : 90.1 μ g^{12, 13} となるようにポリエチレンイミン (Polyethylenimine Max, Polysciences Inc., Warrington, PA) を用いて無血清の DMEM 培地中で細胞にトランスフェクションし、5 日間培養した。この際、L-アラニル L-グルタミンジペプチドを含有し、細胞の生

存率を向上させる GlutaMAX™-I (1×, Gibco®, Life Technologies) を添加した。プラスミド DNA とポリエチレンイミンは 1:2⁴⁹ の割合で混合してポリプレックスを形成させた。rAAV9 は培養上清に多く分泌するため^{50, 51}、5 日後に培養上清を回収し、0.45 μm のフィルター (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で濾過後、分子量のカットオフが 750 kDa のホローファイバー (UFP-750-E-3MA, GE Healthcare, Westborough, MA) を用いて KrosFlo Research Iii TFF system (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) にて接線流限外濾過 (Tangential Flow Filtration, TFF) を行った。TFF 後サンプルに、0.2 μL/mL の benzonase (25 U/mL, Novagen, San Diego, CA) を添加し、37°C で 30 分間反応させ、持ち込まれたプラスミドなどの DNA を分解した。そして、10 μL/mL の 0.5 M EDTA を加えて benzonase の反応を停止した。Benzonase 処理サンプルを 50°C で 20 分間加熱して、低分子量夾雑タンパク質を変性させた。変性タンパク質は、13,100 × *g* で 10 分間の遠心分離を 3 サイクル行うことにより除去した。次に、飽和硫酸アンモニウム(AS) を加熱処理後サンプルの半量加えて 33% (w/v) AS の溶液を作成し、18,800 × *g*, 4°C で 30 分間遠心分離することにより 1/3 AS 沈殿を行った。rAAV9 はこの処理で上清に存在するので、上清を回収し、飽和 AS を元のサンプル量の半分を加えることで、1/2 AS 溶液を作成し、18,800 × *g*, 4°C で 30 分間遠心分離することにより 1/2 AS 沈殿を行った(1/3→1/2 AS)。沈殿した rAAV9 を 20 mL の、3.3 mM morpholinoethanesulfonic acid (Dojindo, Kumamoto, Japan), 3.3 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Dojindo), and 3.3 mM sodium acetate (Sigma Aldrich) (MHN バッファー,

pH8.0) に溶解した。MHN バッファーには、50 mM NaCl と 0.01% (w/v)

Pluronic F-68 (非イオン性界面活性剤、Sigma-Aldrich) を添加した。

3-1-4 rAAV9 のイオン交換カラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィー精製

1/3→1/2 AS 処理サンプルを、溶液の導電率が 7.3 mS/cm になるまで MHN バッファーで希釈した。導電率は塩濃度を反映しており、導電率センサー (LAQUAtwin, HORIBA, Tokyo) を使用して測定した。希釈サンプルを、MHN バッファーで平衡化したカラム容積 20mL の HiPrep Q XL (GE Healthcare) カラム(4 級アンモニウム陰イオン交換カラム) に、P1 ペリスタルティックポンプ (P1 ポンプ、GE Healthcare) を使用して 3 mL/min の速度でアプライした。カラムに吸着したサンプルは、1M NaCl と 0.01% (w/v) Pluronic F-68 含有 MHN バッファー(pH8.0) により溶出した。カラムに吸着せずに、通過した画分に存在する rAAV9 サンプルは、Ultracel 30K フィルター(Merck Millipore, Billerica, MA) で限外濾過後、HiLoad 16/60 Superdex 200 preparation grade カラム(GE Healthcare) および 10 mL のサンプルループを備え付けた ÄKTAEexplorer 100 HPLC システム(GE Healthcare) を使用してゲル濾過クロマトグラフィー精製をした。ゲル濾過クロマトグラフィーで使用したバッファーは、300 mM NaCl および 0.01% (w/v) Pluronic F-68 含有 MHN バッファー(pH6.5) である。フラクションは次のように回収した。最初の区画：計 0.2 カラム容積(CV)・5 mL のフラクション。2 番目の区画：計 0.6 CV・1mL のフラクション。3 番目の区画：計 0.3 CV・5mL のフラク

ション (1 CV = 120 mL)。ピークフラクションである Fr 15 – Fr 27 を回収し、最終精製物とした。最終精製物の品質評価は、SDS-PAGE、ウエスタンブロットティング、qPCR、分析用超遠心(AUC) にて行った。

3-1-5 ウイルス力価測定

力価を測定するために、rAAV9 のウイルスゲノム DNA を抽出・精製した。まず、rAAV9 サンプルに benzonase (125 U/ μ L, Merck Millipore) および 2 mM MgCl₂ を添加し、37°C で 30 分間反応させた。ウイルスゲノム DNA は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して抽出した。そして、Benzonase 耐性粒子のゲノム力価を 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて定量 PCR 法 (qPCR) により測定した。酵素は SYBR® green dye (SYBR® Premix Ex Taq, TaKaRa, Japan) または TB Green Premix EX Taq II [Tli RNase H Plus] (TaKaRa) を、プライマーは ITR を標的とした配列 (forward primer: 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3', reverse primer: 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3')、EGFP を標的とした配列 (forward primer: 5'-AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC-3', reverse primer: 5'-TGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCC-3')、または RFLuc を標的とした配列 (forward primer: 5'-TCGACATCAGCTACCAGCAG-3', reverse primer: 5'-ATCCCAGACTGTGGTTCAG-3') を用いた。qPCR の条件は、95°C・5 秒、60°C・34 秒を 40 サイクル行った。スタンダードとして、*SacI* で制限酵素処理し直線化した pdsAAV-CB-EGFP DNA (AAV9-dsEGFP 用)、*XmnI* で

制限酵素処理し直線化した pdsAAV-CBA-RFLuc (AAV9-dsLuc 用)、および *Bam*HI で制限酵素処理し直線化した pssAAV-CMV-RFLuc (AAV9-ssLuc 用) を用いた。スタンダードは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。1 mL あたりの benzonase 耐性粒子の vector genome (v.g.) 数(v.g./mL) を力価とした。

3-1-6 SDS-PAGE とウエスタンブローディング

精製過程や最終精製物の rAAV9 を、5-20% ポリアクリルアミド濃度勾配のゲル (SuperSep™ Ace, 5–20%, 13 well, Wako, Osaka, Japan) を用いて SDS-PAGE により解析した。AS 処理条件検討では Quick Coomassie brilliant blue (Q-CBB, Wako) を、残りの実験では Oriole Fluorescent Gel Stain (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いてゲル染色した。Oriole で 90 分間染色することは銀染色に匹敵する。

SDS-PAGE を行ったポリアクリルアミドゲルを polyvinylidene fluoride 膜 (Merck Millipore) に一晩転写した。転写後、膜を 3% 牛血清アルブミン/Tris-buffered saline containing 0.05% Tween® 20 (TBST) でブロッキングした。その後、1 次抗体である monoclonal antibody B1 (PROGEN, Heidelberg, German) を 1 時間反応させた。TBST で洗浄後、HRP 標識した 2 次抗体である horseradish peroxidase-labeled anti-mouse secondary antibody (GE Healthcare) を 1 時間反応させた。タンパク質を ECL Plus™ Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いて検出した。

3-1-7 ヒトゲノム DNA 混入の測定

最終精製物である AAV9-dsEGFP (3 回の実験) にヒトゲノム DNA が混入しているか否かの判別を qPCR を用いて行った。酵素は SYBR® Premix Ex Taq、プライマーはヒト GAPDH を標的とした配列 (forward primer: 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3', reverse primer: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3', NCBI : Pr032064752) を用いた。ヒトゲノム DNA (Roche, Mannheim, Germany) をスタンダード DNA として使用した。rAAV9 にパッケージングされているヒトゲノム DNA を検出するために、benzonase (125 U/ μ L, Merck Millipore) および 2 mM $MgCl_2$ を添加して、37 °C で 30 分間反応させ溶媒の DNA を除去した後、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用してウイルスゲノム DNA のみを抽出した。rAAV9 にパッケージングされていない、外の溶媒に存在するヒトゲノム DNA は、benzonase 処理をせずに DNA 抽出を行い測定した。qPCR の条件は、95 °C \cdot 5 秒、60 °C \cdot 34 秒を 40 サイクル行った。

3-1-8 電子顕微鏡観察

炭素が蒸着した銅グリッド (Nisshin EM Corporation, Tokyo, Japan) に 40 μ L のサンプルをのせ、1 分間放置した。その後、1% のウラニル酢酸で 1 分間ネガティブ染色を行った。最終的に、透過型電子顕微鏡 H-7650 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて 80 kV の加速電圧で観察した。中空粒子とベクターゲノムを含有する完全粒子との比率は電子顕微鏡写真を用いて算出した。

3-1-9 分析用超遠心(AUC)

分析用超遠心 (Analytical Ultracentrifugation, AUC) は、Proteome Lab XL-1 超遠心分離機 (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) を用いて行った。400 μL の AAV9-dsEGFP をセンターピースのサンプル区画に、400 μL の溶媒をセンターピースのリファレンス区画にロードし、4穴ローターにセットした。4穴ローターを超遠心機にセットして、20°C で平衡化した後、沈降速度遠心分離は 12,000 rpm, 20°C で行い、分析には吸光度(260nm) を使用した。

3-1-10 AUC データ解析

完全長のウイルスゲノムがパッケージングされた rAAV9、ウイルスゲノムの断片がパッケージングされた rAAV9 (中間体)、およびウイルスゲノムがパッケージングされていない中空粒子の割合は、Sedfit continuous-size C(S) 分布モデルを分析することにより決定した。次の C(S) パラメータを分析に使用した。解像度 : 100S、S 最小 : 20、S 最大 : 120、摩擦比 : 1.32859、F 統計 : 0.68、バッファー密度 : 1.0148、バッファー粘度 : 0.0106。このモデルは、データをラム方程式で解いた。分析の信頼性は、適合度(二乗平均平方根の標準偏差(RSMD)) によって確認した。

3-2 rAAV の安定性評価

3-2-1 細胞培養

HEK293EB 細胞を、8% の FBS (Biowest) およびペニシリンとストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を含有した DMEM (Sigma-Aldrich) で 37°C・5% CO₂ の環境下で培養した。HEK293EB 細胞は、3 枚の Square dish (計 1,500 cm², Corning) に $\sim 6.0 \times 10^8$ 個播種した (総培養液量は 210 mL)。

3-2-2 プラスミド

rAAV 安定性評価の研究での *cis* プラスミドは、pAAV-ZsGreen1 (TaKaRa Bio) を用いた。pAAV-ZsGreen1 は、両端が AAV2 型 ITR で、その間に Cytomegalovirus (CMV) プロモーターの制御下で発現する ZsGreen1 遺伝子をコードした ssAAV 用のプラスミドである。ベクターゲノムの長さは約 2.6 kb であった。3つの *trans* プラスミド、つまり pAAV2/1 (AAV2 型 *rep* 遺伝子および 1 型 *cap* 遺伝子搭載)、pAAV2/8 (AAV2 型 *rep* 遺伝子および 8 型 *cap* 遺伝子搭載)、および pAAV2/9 (AAV2 型 *rep* 遺伝子および 9 型 *cap* 遺伝子搭載) は、James M. Wilson (ペンシルバニア大学) から寄贈していただいた。もう一つの *trans* プラスミドである pAAV-RC (AAV2 型 *rep* 遺伝子および 2 型 *cap* 遺伝子搭載) は、Agilent Technologies から購入した。

3-2-3 rAAV 作製法および精製法

作製法は 3-1-3 で記載したとおりである。rAAV1、rAAV8、および rAAV9 については、トランスフェクション 5 日後に培養上清を回収し、0.45 μm (Thermo Fisher Scientific) のフィルターで濾過後、AAVpro[®] Concentrator (TaKaRa Bio) で精製した。rAAV2 は、トランスフェクション 5 日後に、細胞を回収して、AAVpro Purification Kit (All Serotypes, TaKaRa Bio) を用いて細胞破碎液から精製した。

3-2-4 野生型 AAV2 (wtAAV2)

wtAAV2 は American Type Culture Collection (VR-680[™], ATCC, Manassas, VA) から購入した。

3-2-5 感染性評価を行うための AAV の様々な化合物・混合物・環境への曝露

1.12×10^9 v.g. の各血清型 rAAV および wtAAV2 を以下のような化合物・混合物・環境に曝露し、感染力の変化を調べた。WUV-M20 device (Atto, Tokyo, Japan) を用いて紫外線に 40 分間(照度 $126\text{mW} / \text{cm}^2$ 、総放射照度 $3.0\text{mJ}/\text{cm}^2$)、0.1M NaOH (Wako) に 15 分間、0.06% NaClO (OYALOX, Tokyo, Japan) に 15 分間、0.22 μm 濾過水道水(硬度 71.0~90.5 mg/L、残留塩素 0.4 mg/L) に 10 日間、および 70% エタノール (EtOH, Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) に 10 日間曝露した。

3-2-6 感染力変化を調べるための蛍光顕微鏡観察および TCID₅₀ アッセイ

ATCC (CRL-2972) から購入した HeLaRC32 細胞(*rep* および *cap* 遺伝子を安定的に発現するパッケージング細胞株) を、8% の FBS (Biowest) およびペニシリンとストレプトマイシン(Sigma-Aldrich) を含有した DMEM (Sigma-Aldrich) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

AAV を感染させる前日に、HeLaRC32 細胞を 96 ウェルプレート(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) に 4.0×10^4 cells/well となるように播種した。

ATCC (VR-1516) から購入したヒトアデノウイルス 5 (Ad5) を AAV 感染当日に解凍し、無血清 DMEM で最終濃度 3.2×10^8 particles/mL となるように調製し、これを希釈溶液とした。3-2-5 の処理をした AAV および未処理の AAV 10 μ L に希釈溶液 990 μ L を添加し、 10^{-2} 希釈サンプルを作製した。 10^{-2} 希釈サンプルに希釈溶液 990 μ L を添加し、 10^{-4} 希釈サンプルを作製した。同様にして、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 希釈サンプルを作製した。各希釈サンプル 50 μ L を、96 well プレートに播種した HeLaRC32 細胞に 8 well ずつトランスダクションした。

トランスダクション 3 日後に、緑色蛍光を IX71 倒立蛍光顕微鏡(励起波長範囲：470 nm～490 nm、発光波長範囲：515 nm～550 nm、フィルター：NIBA、倍率：100 倍、Olympus Corporation, Tokyo, Japan) で観察した。感染力変化、つまり蛍光の変化については、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用して分析した。

蛍光顕微鏡観察後、トランスダクションした細胞およびしてない細胞から DNA 抽出を行った。DNA 抽出液の組成は、0.25% デオキシコール酸ナトリウム (Wako)、0.045% Tween20 (Sigma-Aldrich)、1× プロテナーゼ K バッフ

アー、0.3 mg/mL プロテナーゼ K (QIAGEN) で、85 μ l の DNA 抽出液を各ウェルに添加し、細胞含有 DNA 抽出液を PCR チューブに移した後、37°C 1 時間、55°C 2 時間、95°C 30 分間の行程を経た。抽出した DNA を蒸留水で 10^3 倍に希釈後、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた定量 PCR 法 (qPCR) により TCID₅₀ を測定した。この測定法は、https://www.atcc.org/~media/AAV8_Information/AAV2_Information/AAV2_RSS_Infectious_titer_assays_V2.ashx に記載の標準的な方法である。rAAV1・rAAV8・rAAV9 の場合は、酵素は TB Green Premix EX Taq II [Tli RNase H Plus] (TaKaRa) を、プライマーは ZsGreen1 を標的とした配列 (forward primer: 5'-ACCGTGTACAAGGCCAAGTC-3', reverse primer: 5'-GTCAGCTTGTGCTGGATGAA-3') を用いた。rAAV2 および wtAAV2 の場合は、ITR を標的とした配列 (forward primer: 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3', reverse primer: 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3') を用いた。qPCR の条件は、95°C・5 秒、60°C・34 秒を 40 サイクル行った。スタンダードとして、*XmnI* で制限酵素処理し直線化した pAAV-ZsGreen1 を用いた。スタンダードは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

第4章 結果

4-1 rAAV9 精製法

4-1-1 硫酸アンモニウムによる rAAV9 の粗精製

rAAV9 (AAV9-dsEGFP) 作製に必要な 3 種のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、5 日後に無血清培養上清を回収して TFF で濃縮した後(材料および方法を参照)、硫酸アンモニウム(AS) 沈殿処理を行うことにより夾雑タンパク質の除去と、さらなる濃縮を行うことにした。以前、我々は AS を使用して rAAV1 を沈殿・濃縮することに成功していたため、それが rAAV9 にも適用できるか調べた。具体的には、rAAV 粗精製法でよく用いられる 1 段階沈殿法(サンプルと等量の AS を加える 1/2 飽和 AS 処理, 1/2AS) と、2 段階沈殿法(1/3 および 1/2 飽和 AS 処理 (材料および方法を参照), 1/3→1/2AS) について SDS-PAGE を用いて純度を比較した。AAV9-dsEGFP を SDS-PAGE で展開した場合、AAV9-dsEGFP を構成する 3 つの capsid タンパク質のバンド(VP1 (82 kDa)、VP2 (67 kDa)、VP3 (60 kDa)) のみが現れる。Figure 2 より、1/3→1/2AS (レーン 5) の方が 1/2AS (レーン 3) よりも capsid タンパク質以外のバンド、つまり夾雑タンパク質のバンドが少ないことがわかり、純度が高いことを示した。

4-1-2 AAV9-dsEGFP の 4 級アンモニウム陰イオン交換カラムおよびゲル濾過クロマトグラフィー精製

3-1-3・3-1-4 で記載した方法で、AAV9-dsEGFP を作製し、TFF および 1/3→1/2AS 処理し、陰イオン交換カラムで精製したサンプルを、SDS-PAGE で分析した結果が Figure 3a である。Figure 3a によると、カラムに吸着しなかった通過画分(Lane 6) に AAV9-dsEGFP を構成する 3 つのキャプシドタンパク質(VP1, VP2, VP3) のバンドが見られ、カラムに吸着した画分(Lane 8) には多くの夾雑タンパク質(VP1, VP2, VP3 以外のバンド) が結合していることがわかった。rAAV1 精製で除去するのに労力を要した 200kDa 付近の夾雑タンパク質も、陰イオン交換カラムに 1 回通すだけで AAV9-dsEGFP と分離し除去できることがわかった(Figure 3a の白三角)。つまり、AAV9-dsEGFP は陰イオン交換カラムに吸着せずに通過画分に存在し、夾雑タンパク質は陰イオン交換カラムに吸着した。

陰イオン交換カラムの通過画分を最終的に 3-1-4 で記載した方法で、ゲル濾過クロマトグラフィー精製を行った。Figure 3b のクロマトグラムにおける黒い三角は AAV9-dsEGFP を表しており、Figure 3c の SDS-PAGE 上の Lane 2-14 の 3 本のタンパク質のバンドは、全て AAV9-dsEGFP のキャプシドタンパク質を表している。陰イオン交換カラムでほぼ全ての夾雑タンパク質が除去されているため、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、AAV9-dsEGFP 以外のタンパク質のクロマトグラムのピークや SDS-PAGE でのバンドはほとんど確認されなかった。ピークフラクションである Fr 15- Fr 27 を回収して最終精製物とし、ITR を標的とするプライマーで qPCR を行ったところ、 2.9×10^{15} v.g. の力価が得られた。同じ最終精製物を EGFP を標的とするプライマーで力価を測定したところ、 3.7×10^{14} v.g. であった。また、最終精

製物を SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングで確認したところ、キャプシドタンパク質由来のバンドが大部分を占め、高純度の AAV9-dsEGFP が精製できていることが示された(Figure 3d, 3e)。さらに、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行った。ウイルスゲノムを含有する rAAV はネガティブ染色をすると粒子が白く映り(Figure 3f の紫色矢印)、ウイルスゲノムを含まない中空粒子は粒子が一部黒抜けした状態で映る(Figure 3f の黄色矢印)。この判断基準をもとに中空粒子の割合を調べたところ、3.8% (195 粒子/ 5168 粒子) と極めて少なく、高品質の AAV9-dsEGFP を作製・精製することができた(Figure 3f)。次に、最終精製物を分析用超遠心(AUC) で評価した(Figure 3g)。AUC では、粒子の重さによって、完全粒子・中間体・中空粒子を定量的に選別できる。その結果、電子顕微鏡写真から得られた結果とは異なり、約 26% の中空粒子が含まれていることが示唆された(Figure 3g (i) 25.7% (中空粒子)、(ii) 32.4% (中間体)、(iii) 38.8% (完全粒子))。

4-1-3 再現性の確認および品質評価

再現性を確認するために、AAV9-dsEGFP の精製を 3 回繰り返した(Figure 4a-f)。最終精製物を SDS-PAGE で展開し、総タンパク質に対するキャプシドタンパク質のバンドの割合を Image J で解析したところ、ピクセル強度が $94.9\% \pm 1.1\%$ (n=3) であり、夾雑タンパク質が非常に少ないことがわかり、このバンドはウエスタンブロッティングで AAV9-dsEGFP 由来のものであることも確認した(Figure 4a-b, 4d-e)。また、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察の結果、 $96.1\% \pm 1.1\%$ (n=3) のウイルスゲノム含有 AAV9-dsEGFP を精製

できていることがわかった(Figure 4c, 4f)。さらに、最終精製物の力価を ITR を標的とするプライマーで qPCR で測定したところ、 $2.5 \pm 0.4 \times 10^{15}$ v.g.、EGFP を標的とするプライマーで測定したところ、 $3.7 \pm 0.7 \times 10^{14}$ v.g. であった(Table 2)。

また、HEK293EB 細胞由来の DNA が最終精製物に混入していないか測定するために、ヒト GAPDH を標的とするプライマーを用いて qPCR により分析した。最終精製物および最終精製物の溶媒に含まれるヒト GAPDH は検出限界以下だった。ただ、TFF 後の溶媒には 2.6 copies/ 1.0×10^9 v.g. のヒト GAPDH が検出された(Table 3)。つまり、本クロマトグラフィー精製法によりヒトゲノム DNA の混入物を除去できた。

4-1-4 適用

上記の精製プロトコルが別のベクターゲノムにおいても適用できるか調べるため、rAAV9-CBA-dsRFLuc (AAV9-dsLuc)、および rAAV9-CMV-ssRFLuc (AAV9-ssLuc) の精製を AAV9-dsEGFP と同じ精製手順で実施した(Figure 4g-l)。各最終精製物を SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより純度(総タンパク質に対するキャプシドタンパク質の割合)を調べたところ、AAV9-dsLuc では 84%、AAV9-ssLuc では 86% であった(Figure 4g-h, 4j-k)。また、電子顕微鏡の結果、AAV9-dsLuc の 92.7% (4341 粒子/4684 粒子)、AAV9-ssLuc の 96.2% (5350 粒子/5561 粒子) にウイルスゲノムが含有されていた(Figure 4i, 4l)。また、力価を測定したところ、AAV9-dsLuc においては、ITR を標的としたプライマーでは 3.9×10^{15} v.g.、Luc を標的とした

プライマーでは 4.0×10^{14} v.g. であり、AAV9-ssLuc においては、ITR を標的としたプライマーでは 1.8×10^{14} v.g.、Luc を標的としたプライマーでは 8.7×10^{13} v.g. であった (Table 2)。従って、本精製法は ssAAV や dsAAV に関わらず、様々なベクターゲノムに適用可能であることが示された。

rAAV9 精製プロトコルの概要を Figure 5 に示す。

4-2 rAAV の安定性評価

4-2-1 rAAV1、rAAV8、rAAV9 の感染力の変化

3-2-3 に記載の通り rAAV を作製・精製し、安定性評価の実験には各血清型 1.12×10^9 v.g. を使用した。3-2-5 に記載の通り、各血清型を様々な化合物・混合物・環境に曝露した(Figure 6)。Figure 7a-c は、UV、NaOH、NaClO に曝露した各 rAAV および未処理の各 rAAV を HeLaRC32 細胞にトランスダクションした際の緑色蛍光を示している。蛍光、つまり感染力は処理することによって減退することがわかった。特に、どの血清型も NaClO 曝露によって完全に不活化されることがわかった。NaOH および NaClO 曝露では、HeLaRC32 細胞へのトランスダクション時に NaOH および NaClO の影響を除去するために、溶媒を PBS に置換してからトランスダクションを行ったため、緑色蛍光の減退は NaOH および NaClO によって HeLaRC32 細胞が死んだことによるものではない。Figure 7d-e は、水道水、および 70% EtOH に曝露した各 rAAV および未処理の各 rAAV を HeLaRC32 細胞にトランスダクションした時の緑色蛍光を示しており、蛍光はそれほど減少しなかった(rAAV2 は除く)。Table 4 は、Figure 7 の緑色蛍光を定量化したものであり、緑色蛍光の減少率を示している。Table 5 は、トランスダクションされたウイルスゲノムを測定することによって TCID₅₀ を計測し、rAAV の感染力を示している。各 rAAV は UV、NaOH、NaClO 曝露によって感染力が減衰するが、水道水と EtOH 処理によっては減衰しない(rAAV2 は除く)、という結

果が出た。これらの結果は Figure 7 に示す蛍光顕微鏡写真の結果と一致していた。

4-2-2 rAAV2、wtAAV2 の感染力の変化

UV、NaOH、NaClO 曝露した rAAV2 をトランスダクションした HeLaRC32 細胞では、未処理のもの比べて緑色蛍光の顕著な減少がみられた。特に、NaOH および NaClO に曝露した rAAV2 は完全に不活化した (Figure 7a-c)。また、rAAV1、rAAV8、rAAV9 とは異なり、rAAV2 は水道水および 70% EtOH 曝露でも感染力が低下した。3-2-6 に記載した方法(ITR 標的プライマーを用いた qPCR) で測定した TCID₅₀ のデータによると、蛍光顕微鏡写真の結果と一致しており、rAAV2 の感染力が全ての処理によって弱められたことがわかった(Table 5)。一方、wtAAV2 の感染力は水道水曝露を除く全ての処理で低下し、rAAV2 の感染力は wtAAV2 の感染力を超えることはないこともわかった(Table 5)。

第5章 考察

我々はこれまでに、**rAAV1** を陰イオン交換カラムに吸着させ、塩濃度を上げて溶出するクロマトグラフィー精製法を報告した²⁸が、本研究では新たに**rAAV9** のクロマトグラフィー精製法の確立を試みた。粗精製の第一段階である飽和硫酸アンモニウム沈殿(AS)においては、**rAAV1** と同様に 1/3→1/2AS 処理によって粗精製できた。**rAAV1** で除去するのに労力を要した 200 kDa の夾雑タンパク質は、**rAAV9** 精製においては AS 処理サンプルを陰イオン交換カラムに通すだけで簡単に分離することができた。また、200 kDa 以外の夾雑タンパク質も陰イオン交換カラムに 1 回通すだけで**rAAV9** と分離することが可能であった。**Zhou** ら⁵²は、我々と同様に、**rAAV9** はイオン交換カラムに吸着しにくいことを報告しており、**rAAV9** の陰イオン交換カラムへの結合が**rAAV1** とは全く異なることを示している。陰イオン交換カラムへの吸着に影響を与える要因として、まず**rAAV** の等電点が挙げられる。しかし **Venkatakrishnan** ら³⁰は、**AAV1** と **AAV9** の等電点に有意な差が見られなかったことを報告しているため、決定的な要因ではないと考えられる。次に考えられる要因として、**rAAV** のキャプシド表面に露出したアミノ酸のわずかな違いが陰イオン交換カラムへの吸着に変化をもたらしている、ということである。以前に、**AAV2** のキャプシドのアミノ酸 5 残基を **AAV1** のアミノ酸に置換した **AAV2.5** が **AAV2** と全く異なるキャプシドの特性を示したことが報告されている⁵³。そのことを考慮すると、**AAV1** と **AAV9** は 84.6% のキャプシドアミノ酸配列の相同性があるが、そのわずかなアミノ酸配列の違いが表面荷

電に影響を与えている可能性があり、それが AAV1 と AAV9 のイオン交換カラム精製法の違いを引き起こしているかもしれない。

rAAV9 の精製法はこれまでにいくつか報告がある。Lock ら⁴⁹は、培養上清から回収した rAAV9 を iodixanol 密度勾配超遠心分離法で精製し、非常に純度が高く我々と同等の力価の最終精製物を得ている。しかし rAAV9 の生産に我々の 4.7 倍量の細胞を用いており、より少ない細胞で同等の生産性を得られている本精製法の方が優れていると言える。Zhou ら⁵²は、細胞を破砕して rAAV9 を回収し、ceramic hydroxyapatite クロマトグラフィーと陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(POROS 50HS) を用いて精製したが、中空粒子が 30%含まれていたため、最終的に CsCl 密度勾配超遠心分離法で中空粒子を除去しなければならなかった。Potter ら⁵⁴は、細胞を破砕して rAAV9 を回収し低 pH (pH 3.9) で陽イオン交換カラムグラフィーを用いて精製したが、電子顕微鏡写真によると最終精製物には中空粒子がかなり含有されていた。AAV9 キャプシドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーも行われており、Nass ら²⁶は、AAV9 をアフィニティークラムに中性 pH 条件下で結合させ、pH 3.0 の酸性条件で溶出させた。酸性溶液は rAAV の感染力を低下させる可能性があり、また、このカラムは rAAV9 を用いた遺伝子治療をより広く推進するにはとても高価である(25 mL で 2735 ドル)。さらに、抗体を用いているので、完全粒子・中空粒子・中間体を分けることができないこともクロマトグラフィー精製の第一選択とするには難しい点である。

以上のような過去の報告と比べて、本精製法の利点として挙げられるのは、第一に精製ステップが簡便なことである。陰イオン交換カラムに 1 回通すだけ

で、ほぼ全ての細胞由来の夾雑タンパク質を rAAV9 と分離することができ
る。第二の利点は、その簡便さゆえに高収率・高力価の rAAV9 を最終的に精
製できることである。最終精製物(AAV9-dsEGFP) の力価は ITR を標的とし
たプライマーを用いた qPCR によると $2.5 \pm 0.4 \times 10^{15}$ v.g.、EGFP を標的と
したプライマーだと $3.7 \pm 0.7 \times 10^{14}$ v.g. であり、他の報告されている精製法と
比べ、同等かそれ以上の力価が得られた。第三の利点は、本精製法はベクター
ゲノム(ウイルスゲノム) のタイプ(一本鎖か二本鎖、ゲノムサイズ、GC 含有
率) に関係なく適用できることである。

rAAV9 (AAV9-dsEGFP) の最終精製物をネガティブ染色による電子顕微鏡で
解析したところ、 $96.1\% \pm 1.1\%$ がウイルスゲノムを封入した完全粒子であっ
た(Table 2)。しかし、AUC で評価したところ 38.8% が完全粒子であった
(Figure 3g)。AUC の原理は、超遠心をするこで重量によって粒子を分離
し、各粒子の沈降速度をモニターするものである。中空粒子はウイルスゲノム
を含有していない軽い粒子なのでゆっくりと沈降し、完全粒子はウイルスゲノ
ムを含有している重い粒子なので速く沈降し、中間体は中空粒子と完全粒子の
中間の速さで沈降する。上記の結果より、電子顕微鏡で完全粒子と判断して
も、AUC で測定した場合、真の完全粒子ではないことを意味している。電子
顕微鏡写真はこれまで完全粒子と中空粒子とを識別する判断材料として長年使
用されてきたが、今後はウイルス完全粒子と中空粒子、および中間体(ウイルス
ゲノムが断片化して封入されたウイルス粒子) を区別するために、電子顕微鏡
と AUC の両方を使用して品質評価をする必要がある。このことを実現するた
めには、電子顕微鏡写真と AUC を比較した多くのデータを蓄積することが必

要である。以前、rAAV9 産生時の完全粒子・中空粒子・中間体の割合を AUC で調べた報告があった²⁶。この報告によると、中空粒子は全体の 88%を占めていた。つまり、今回の AUC の結果から、本精製法により完全ではないが、ある程度中空粒子が除去できているとも言える。しかし、中空粒子をさらに除去するために別のクロマトグラフィーのステップが必要となるかもしれない。その候補として疎水性クロマトグラフィーが考えられる。電子顕微鏡写真で完全粒子と中空粒子が見分けられる理由として、構造の違いが考えられる。ウラニル酢酸によるネガティブ染色において、完全粒子の場合は粒子の周りにのみウラニル酢酸が侵入し、粒子自体には侵入しないので、中が白く周りが黒い輪郭がはっきりとした粒子として見えるが、中空粒子の場合は、粒子の周りのみならず、キャプシドが歪んでいて、その歪んで窪んだ部分にもウラニル酢酸が溜まるため、黒抜きの粒子として見えるのではないかと考えられる。よって、完全粒子と中空粒子で構造が違うと考えられ、ひいては、キャプシド表面上の疎水基と親水基の露出具合にも違いが生じると考えられる。そのため、この構造の違いを利用して両者を分けられるのではないかと思案している。

本精製法は研究室レベルの規模で行っているが、浮遊細胞を用いた作製法⁵⁵と組み合わせることでスケールアップも可能である。また、本精製法は超遠心の密度勾配作成に用いられる CsCl を含まないので、急性毒性のリスクが最小限に抑えられる。以上の大量精製および毒性については、超遠心分離法では限界があったが、本精製法はそれらの課題をクリアして、将来の臨床研究に応用される可能性を秘めている。

日本では rAAV を用いた遺伝子治療の臨床研究の際、カルタヘナ第一種使用の申請書とともに生物多様性評価書を提出しなければならない。この評価書には感染性や不活化条件(安定性)も含めた rAAV の特徴を記載しなければならない。しかし、様々な血清型に対する rAAV の安定性を調べた研究は非常に乏しく、このことは日本で rAAV を用いた臨床研究があまり活発でない要因の一つとなっている。そこで本研究では安定性の指標として、rAAV を様々な化合物や混合物、環境に曝露した時の感染力の変化を調査することで、臨床研究に貴重なデータを蓄積しようと考えた。

rAAV を産生する際、rAAV2 は細胞内にとどまるが、他の血清型は培養上清に分泌される^{49, 51}。また、rAAV9 は他の血清型と違ってイオン交換カラムにほとんど吸着されない性質を持っていることが本研究で明らかになった。このことから、 capsid 構造の違いは各血清型の特徴の違いを生み出すので、安定性にも違いを生じるのではないかと仮説を立てた。この仮説が正しいかどうか調べるため、rAAV1、rAAV2、rAAV8、rAAV9 を様々な化合物・混合物・環境条件に曝露した。Figure 7a-c と Table 4 および Table 5 の結果は、UV・NaOH・NaClO 曝露によって全血清型の rAAV の感染力が低下されることを示唆している。しかし、血清型間で感染力の低下の度合いに差があった。0.1M NaOH への 15 分間の曝露後、rAAV2 は他の血清型よりも感染力が低下した。さらに、rAAV1・rAAV8・rAAV9 は水道水や 70% EtOH への 10 日間の曝露ではあまり感染力が低下しなかったが、rAAV2 は感染力が有意に低下した(Figure 7d, e, Table 4, Table 5)。この rAAV2 と他の血清型との感染力の変化の違いは、capsid の安定性に起因する可能性がある。Bennett

らは、AAV2 は AAV1~AAV9 および AAVrh10 の中で最も熱安定性が低いと報告しており、それはキャプシドの安定性が低いためと結論づけている⁵⁶。そのため、水道水や 70% EtOH、および UV に曝露した場合、rAAV2 は他の血清型よりも壊れやすく、感染力がより低下しやすい可能性が考えられる。

前述のように、rAAV1・rAAV8・rAAV9 は 70% EtOH 曝露によってそれほど感染力が低下しなかった(Figure 7e)。これは、AAV がエンベロープを持たないウイルスだからである。エンベロープはアルコールによって簡単に破壊されるが、AAV はエンベロープを持たないウイルスであるため、EtOH によって不活化されにくい。Howard と Harvey は、rAAV1 が 70% イソプロパノールで不活性されなかったと報告している⁵⁷が、これは、今回の我々の結果と一致した。また、彼らは rAAV1 を 10% NaClO に 5 分間曝露すると不活化できると報告しているが、今回の我々の実験では、より低濃度で不活化(0.06% NaClO, 15 分間) することに成功した。

また、rAAV2 と wtAAV2 の感染力を比較し、rAAV2 は wtAAV2 よりも安定性が低いことがわかった(Table 5)。この結果は、外界における rAAV2 の感染力が wtAAV2 よりも低くなる可能性を示唆しており、仮に rAAV が患者から流出した場合でも、すぐに感染が広がる可能性が低い、ということを意味している。

本研究の rAAV の安定性の知見は、環境影響評価に関する重要なデータとなる。また、臨床試験で起こりうる患者からのウイルス排出の際にも重要なデータとなる。rAAV の排出について調査した事例がこれまでに報告されている^{43, 58, 59}。ヒト・非ヒト霊長類・マウスにおいて、それぞれ 2×10^{12} v.g./kg の

rAAV8 を投与し、糞・尿・唾液などを調べたところ、いずれの生物種においても、投与後 15 日目付近までは rAAV の排出が観察されるが、20 日目前後でほとんど観察されなくなる。これら排出された rAAV を本研究で得られた知見をもとにすれば、適切に不活化することが可能であり、環境に影響を及ぼすこともない。このように、排出されたウイルスの取り扱いには、ウイルスの安定性やその他の特性を事前に知っておく必要があり、本研究で得られた rAAV の特徴は、将来の臨床研究に大いに役立つと考えられる。

第6章 結語・今後の方針

rAAV9 を超遠心分離法を使用せずにクロマトグラフィー技術のみで高純度のベクターを精製することが可能であった。しかし、中空粒子の割合が評価法によって異なる、という課題に直面した。今後は電子顕微鏡と AUC で生まれる差異について原因を究明し、両方の品質評価法で整合性のとれた結果が出るように追究していきたい。さらに、中空粒子および中間体を、そもそも生産しない新たな rAAV 産生法の確立も目指したい。中空粒子を減らす手立てとして、ウイルスゲノムの複製効率を上げること、つまり Rep タンパク質の強化を考えている。また、中間体は、ベクターゲノムプラスミドのバックボーンも多くパッケージングされていることが報告されているため、中間体を減らすために、プラスミドではなく、ベクターゲノム部分(ITR から ITR の部分)のみをトランスフェクションすることを考えている。

また、本研究では rAAV の安定性に関する重要なデータを取得できた。今後はマウスやヒトの血液中での rAAV の安定性を調べることで、より臨床試験に近い形でのデータを蓄積したい。

本研究では、rAAV 精製法および安定性評価について研究を行ったが、これらの経験を踏まえて、将来的には GMP 製造した rAAV9 を用いて、神経・筋疾患に対する遺伝子細胞治療の臨床応用につなげたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、本研究ならびに論文作成に対する御指導・御助言を頂きました筑波大学大学院 玉岡晃教授、石井亜紀子講師、そして東京大学医科学研究所 岡田尚巳教授、平井幸彦先生、日本医科大学大学院 宮川世志幸講師に深く感謝申し上げます。

出典

Infectivity assessment of recombinant adeno-associated virus (rAAV) and wild-type AAV (wtAAV) exposed to various diluents and environmental conditions.

Taro Tomono, Yukihiro Hirai, Hideto Chono, Junichi Mineno, Akiko Ishii, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, Takashi Okada. *Human Gene Therapy Methods*, 30(4): 137-143, 2019, doi: 10.1089/hgtb.2019.082.

Highly efficient ultracentrifugation-free chromatographic purification of recombinant AAV serotype 9.

Taro Tomono, Yukihiro Hirai, Hironori Okada, Yoshitaka Miyagawa, Kumi Adachi, Shuhei Sakamoto, Yasuhiro Kawano, Hideto Chono, Junichi Mineno, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, Takashi Okada. *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*, 11: 180-190, 2018, doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015

本学位論文では、上記に掲載された論文の内容を、各出版社の許可を得て再利用している。

参考文献

1. Anderson, WF, Blaese, RM, and Culver, K (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol. *Hum Gene Ther* **1**: 331-362.
2. Onodera, M, Ariga, T, Kawamura, N, Kobayashi, I, Ohtsu, M, Yamada, M, *et al.* (1998). Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* **91**: 30-36.
3. Raper, SE, Chirmule, N, Lee, FS, Wivel, NA, Bagg, A, Gao, GP, *et al.* (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**: 148-158.
4. Hacein-Bey-Abina, S, Von Kalle, C, Schmidt, M, McCormack, MP, Wulffraat, N, Leboulch, P, *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-419.
5. Yla-Herttuala, S (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* **20**: 1831-1832.
6. Dias, MF, Joo, K, Kemp, JA, Fialho, SL, da Silva Cunha, A, Jr., Woo, SJ, *et al.* (2018). Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res* **63**: 107-131.
7. 伴野太郎、岡田尚巳 (2016). 遺伝子導入用ウイルスベクターの作製法. *PHARMSTAGE* **15**: 36-48.
8. Hoggan, MD (1970). Adenovirus associated viruses. *Prog Med Virol* **12**: 211-239.
9. Berns, KI, and Bohenzky, RA (1987). Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res* **32**: 243-306.
10. Berns, KI, and Linden, RM (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* **17**: 237-245.

11. Okada, T, Shimazaki, K, Nomoto, T, Matsushita, T, Mizukami, H, Urabe, M, *et al.* (2002). Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Methods Enzymol* **346**: 378-393.
12. Grimm, D, Kern, A, Rittner, K, and Kleinschmidt, JA (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**: 2745-2760.
13. Salvetti, A, Oreve, S, Chadeuf, G, Favre, D, Cherel, Y, Champion-Arnaud, P, *et al.* (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**: 695-706.
14. Hermens, WT, ter Brake, O, Dijkhuizen, PA, Sonnemans, MA, Grimm, D, Kleinschmidt, JA, *et al.* (1999). Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* **10**: 1885-1891.
15. Zolotukhin, S, Byrne, BJ, Mason, E, Zolotukhin, I, Potter, M, Chesnut, K, *et al.* (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**: 973-985.
16. Ayuso, E, Mingozzi, F, Montane, J, Leon, X, Anguela, XM, Haurigot, V, *et al.* (2010). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* **17**: 503-510.
17. Brument, N, Morenweiser, R, Blouin, V, Toublanc, E, Raimbaud, I, Cherel, Y, *et al.* (2002). A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther* **6**: 678-686.
18. Kaludov, N, Handelman, B, and Chiorini, JA (2002). Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* **13**: 1235-1243.
19. Davidoff, AM, Ng, CY, Sleep, S, Gray, J, Azam, S, Zhao, Y, *et al.* (2004). Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods* **121**: 209-215.

20. Urabe, M, Xin, KQ, Obara, Y, Nakakura, T, Mizukami, H, Kume, A, *et al.* (2006). Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* **13**: 823-828.
21. Qu, G, Bahr-Davidson, J, Prado, J, Tai, A, Cataniag, F, McDonnell, J, *et al.* (2007). Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods* **140**: 183-192.
22. Okada, T, Nonaka-Sarukawa, M, Uchibori, R, Kinoshita, K, Hayashita-Kinoh, H, Nitahara-Kasahara, Y, *et al.* (2009). Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther* **20**: 1013-1021.
23. Lock, M, Alvira, MR, and Wilson, JM (2012). Analysis of particle content of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vectors by ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther Methods* **23**: 56-64.
24. Wang, Q, Lock, M, Prongay, AJ, Alvira, MR, Petkov, B, and Wilson, JM (2015). Identification of an adeno-associated virus binding epitope for AVB sepharose affinity resin. *Mol Ther Methods Clin Dev* **2**: 15040.
25. Terova, O, Parra, S, Clasen, R, and Hermans, P. Innovative Downstream Purification Solutions for Viral Vectors: Enabling Platform Approaches to Advance Gene Therapies.
26. Nass, SA, Mattingly, MA, Woodcock, DA, Burnham, BL, Ardinger, JA, Osmond, SE, *et al.* (2018). Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev* **9**: 33-46.
27. Chahal, PS, Aucoin, MG, and Kamen, A (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods* **139**: 61-70.
28. Tomono, T, Hirai, Y, Okada, H, Adachi, K, Ishii, A, Shimada, T, *et al.* (2016). Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Mol Ther Methods Clin Dev* **3**.

29. Bartlett, JS, Wilcher, R, and Samulski, RJ (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**: 2777-2785.
30. Venkatakrishnan, B, Yarbrough, J, Domsic, J, Bennett, A, Bothner, B, Kozyreva, OG, *et al.* (2013). Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking. *J Virol* **87**: 4974-4984.
31. Ferrari, FK, Samulski, T, Shenk, T, and Samulski, RJ (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**: 3227-3234.
32. McCarty, DM, Fu, H, Monahan, PE, Toulson, CE, Naik, P, and Samulski, RJ (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10**: 2112-2118.
33. Wang, Z, Ma, HI, Li, J, Sun, L, Zhang, J, and Xiao, X (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* **10**: 2105-2111.
34. Wu, J, Zhao, W, Zhong, L, Han, Z, Li, B, Ma, W, *et al.* (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* **18**: 171-182.
35. Mietzsch, M, Broecker, F, Reinhardt, A, Seeberger, PH, and Heilbronn, R (2014). Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glyicans. *J Virol* **88**: 2991-3003.
36. 伴野太郎, and ほか (2015). 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作製法. *Pharma Medica* **33**: 15-22.
37. 小澤敬也 (2007). AAV を利用した遺伝子治療. *ウイルス* **57**: 47-55.
38. Burnett, JR, and Hooper, AJ (2009). Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther* **11**: 681-691.

39. Muramatsu, S, Fujimoto, K, Kato, S, Mizukami, H, Asari, S, Ikeguchi, K, *et al.* (2010). A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* **18**: 1731-1735.
40. Kaplitt, MG, Feigin, A, Tang, C, Fitzsimons, HL, Mattis, P, Lawlor, PA, *et al.* (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* **369**: 2097-2105.
41. Eberling, JL, Jagust, WJ, Christine, CW, Starr, P, Larson, P, Bankiewicz, KS, *et al.* (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* **70**: 1980-1983.
42. Christine, CW, Starr, PA, Larson, PS, Eberling, JL, Jagust, WJ, Hawkins, RA, *et al.* (2009). Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* **73**: 1662-1669.
43. Nathwani, AC, Tuddenham, EG, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Linch, DC, *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357-2365.
44. Ramos, JN, Hollinger, K, Bengtsson, NE, Allen, JM, Hauschka, SD, and Chamberlain, JS (2019). Development of Novel Micro-dystrophins with Enhanced Functionality. *Mol Ther* **27**: 623-635.
45. Hayashita-Kinoh, H, Yugeta, N, Okada, H, Nitahara-Kasahara, Y, Chiyo, T, Okada, T, *et al.* (2015). Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance. *Mol Ther* **23**: 627-637.
46. Hira, R, Ohkubo, F, Masamizu, Y, Ohkura, M, Nakai, J, Okada, T, *et al.* (2014). Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nat Commun* **5**: 5551.
47. Arimura, S, Okada, T, Tezuka, T, Chiyo, T, Kasahara, Y, Yoshimura, T, *et al.* (2014). Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* **345**: 1505-1508.

48. Masamizu, Y, Tanaka, YR, Tanaka, YH, Hira, R, Ohkubo, F, Kitamura, K, *et al.* (2014). Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci* **17**: 987-994.
49. Lock, M, Alvira, M, Vandenberghe, LH, Samanta, A, Toelen, J, Debyser, Z, *et al.* (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum Gene Ther* **21**: 1259-1271.
50. Xiao, X (2010). Adeno-associated viral vectors found free in media. *Hum Gene Ther* **21**: 1221-1222.
51. Vandenberghe, LH, Xiao, R, Lock, M, Lin, J, Korn, M, and Wilson, JM (2010). Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing. *Hum Gene Ther* **21**: 1251-1257.
52. Zhou, J, Yang, X, Wright, JF, High, KA, Couto, L, and Qu, G (2011). PEG-modulated column chromatography for purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9. *J Virol Methods* **173**: 99-107.
53. Bowles, DE, McPhee, SW, Li, C, Gray, SJ, Samulski, JJ, Camp, AS, *et al.* (2012). Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther* **20**: 443-455.
54. Potter, M, Lins, B, Mietzsch, M, Heilbronn, R, Van Vliet, K, Chipman, P, *et al.* (2014). A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* **1**: 14034.
55. Grieger, JC, Soltys, SM, and Samulski, RJ (2016). Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther* **24**: 287-297.
56. Bennett, A, Patel, S, Mietzsch, M, Jose, A, Lins-Austin, B, Yu, JC, *et al.* (2017). Thermal Stability as a Determinant of AAV Serotype Identity. *Mol Ther Methods Clin Dev* **6**: 171-182.
57. Howard, DB, and Harvey, BK (2017). Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Hum Gene Ther Methods* **28**: 39-48.

58. Nathwani, AC, Rosales, C, McIntosh, J, Rastegarlarlari, G, Nathwani, D, Raj, D, *et al.* (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* **19**: 876-885.
59. Nathwani, AC, Reiss, UM, Tuddenham, EG, Rosales, C, Chowdary, P, McIntosh, J, *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* **371**: 1994-2004.

図表

Figure 1

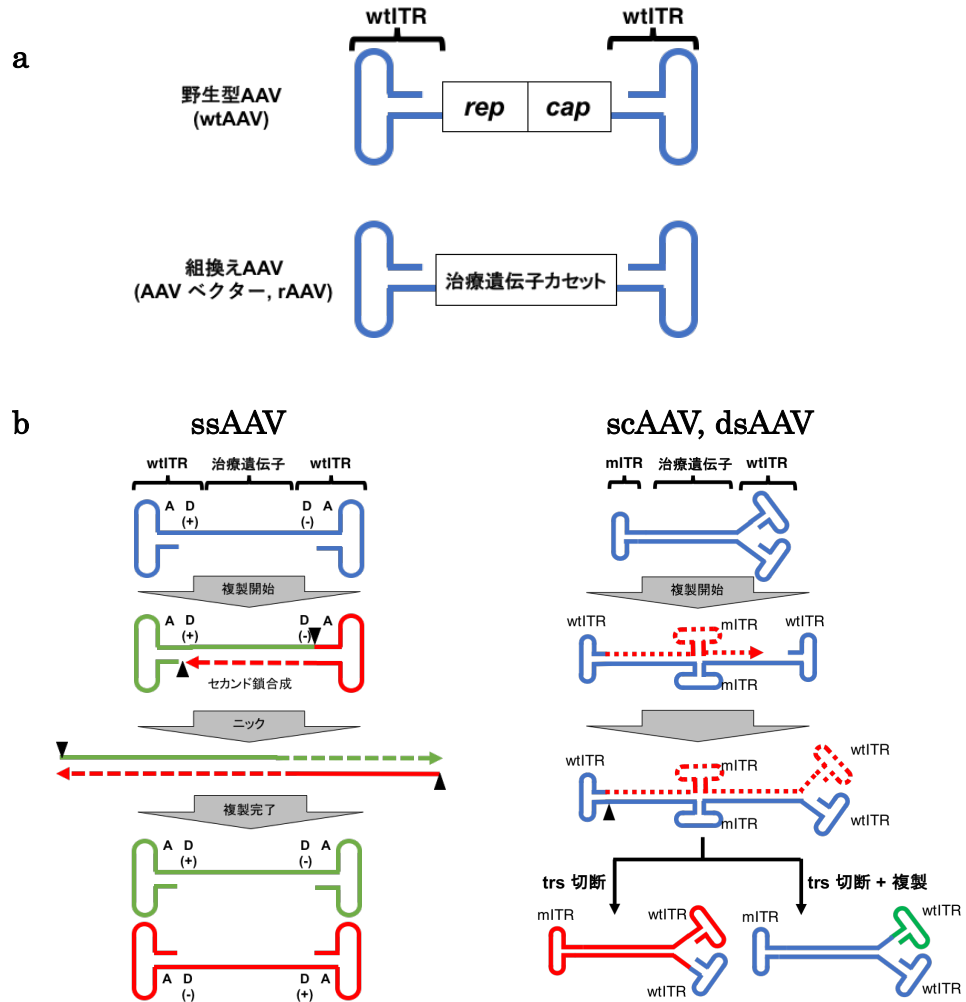


Figure 1. AAV の特性

(a) 野生型 AAV (wtAAV) ゲノムと組換え AAV (rAAV) ゲノムを比較した図である。wtAAV ウイルスゲノムの両端には繰り返し配列でヘアピン構造をとる Inverted Terminal Repeats (ITRs) が存在し、複製に関わる *rep* 遺伝子と capsid 形成に関わる *cap* 遺伝子が ITR 間にコードされている。遺伝子治療用に組み換えた rAAV ゲノムは *rep* と *cap* 遺伝子を除去し、ITR 間に目的遺伝子 (治療遺伝子など) を挿入したものである。(b) ssAAV と scAAV (dsAAV) の複製様式を示した図である。ssAAV の複製機構は、一方の wtITR からセカンド鎖の合成が始まり、もう一方の wtITR まで合成されると、trs

と呼ばれる部位が Rep タンパク質により切断され、さらに Rep タンパク質のヘリカーゼ活性によって ITR のヘアピン構造が解け、その部分も DNA が合成される。合成が完了すると、ITR 部分は再びヘアピン構造を取り、複製が完了する。dsAAV の複製機構は、一方の wtITR からセカンド鎖の合成が始まり、もう一方の wtITR まで合成が完了すると、trs で切断される。trs で切断されると、切断された一方は dsAAV をそのまま形成し、他方は wtITR 部分をさらに合成して dsAAV を形成することによって複製が完了する。wtITR, wild-type ITR; mITR, mutated ITR; A · D(+) · D(-), パッケージング配列; ▲, trs。

Figure 2

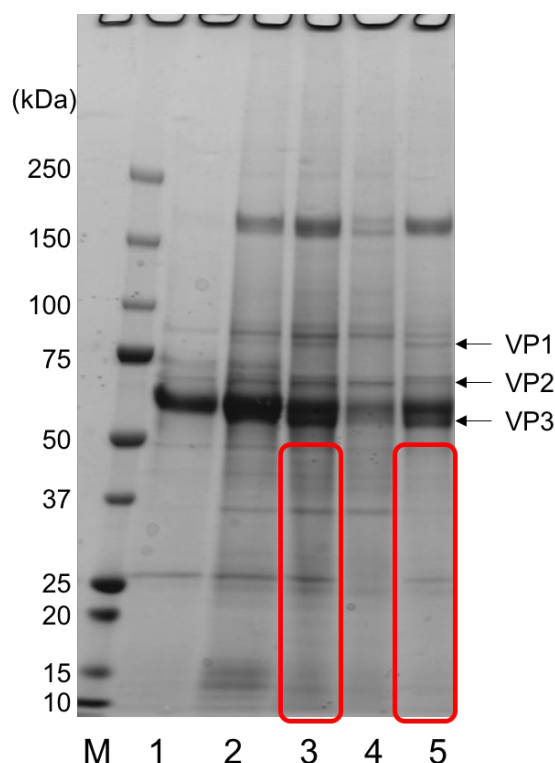


Figure 2. 硫酸アンモニウム(AS) 沈殿による rAAV9 粗精製
(AS 沈殿の条件検討)

TFF 後サンプルに AS をサンプルの半分量加えて 33% (w/v) AS の溶液を作成し、 $18,800 \times g$, 4°C で 30 分間遠心分離することにより 1/3 AS 沈殿を行った。rAAV9 は上清に存在するので上清を回収し、飽和 AS を元のサンプル量の半分を加えることにより、1/2AS 溶液を作成し、 $18,800 \times g$, 4°C で 30 分間遠心分離することにより 1/2 AS 沈殿を行った(1/3→1/2AS、レーン 5)。これまで行ってきた 1/2 AS 沈殿(レーン 3) 精製と SDS-PAGE を用いて純度を比較した(CBB 染色)。VP1 (82 kDa)、VP2 (67 kDa)、VP3 (60 kDa) は、AAV9 の capsid タンパク質を表しているが、capsid タンパク質以外のタンパク質のバンド(特に赤四角部分)、つまり夾雑タンパク質は、1/3→1/2AS の方が 1/2 AS 沈殿よりも少なかった。レーン 1, TFF 前; レーン 2, TFF 後; レーン 3, 1/2 AS; レーン 4, 1/3 AS 沈殿物; レーン 5, 1/3→1/2AS。

Figure 3

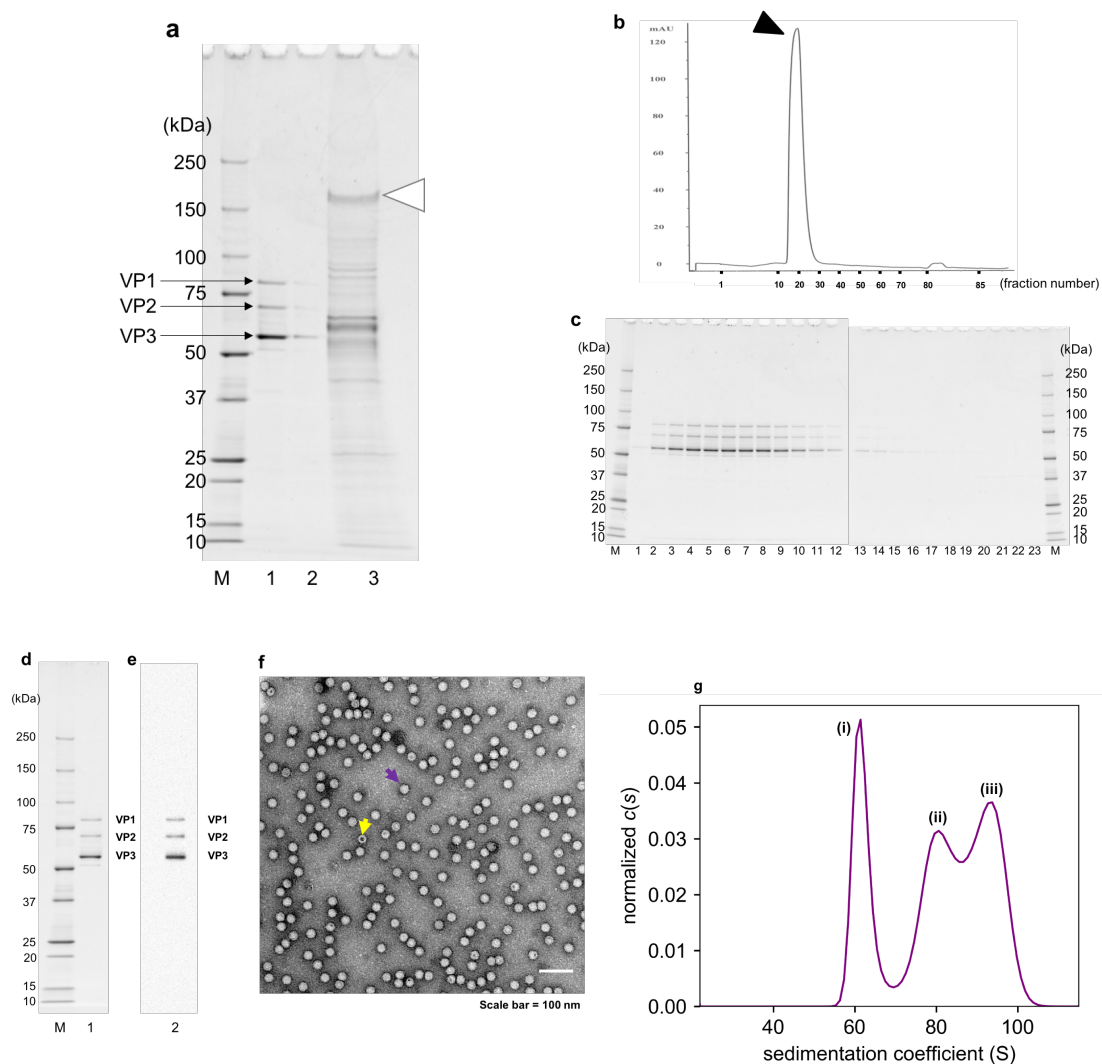


Figure 3. 4級アンモニウム陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによる AAV9-dsEGFP 精製

3-1-3・3-1-4 で記載した方法で、AAV9-dsEGFP を作製し、TFF および 1/3→1/2AS 処理し、(a) 4級アンモニウム陰イオン交換カラム(HiPrep Q XL 16/10) 精製後の AAV9-dsEGFP の純度を SDS-PAGE を用いて解析した (Oriole 染色)。白三角は 200 kDa の夾雑タンパク質を表している。レーン 1, HiPrep Q XL 16/10 通過画分；レーン 2, カラム洗浄フラクション；レーン 3, カラム吸着フラクション。(b) HiPrep Q XL 16/10 通過画分をゲル濾過クロマトグラフィー精製したクロマトグラム。y 軸, 280 nm 吸光度；x 軸, フラクション番号。黒三角は AAV9-dsEGFP のピークフラクションを表している。(c)

ゲル濾過精製サンプルを SDS-PAGE に展開して解析した。レーン 1-18, Fr 14-31; レーン 19, Fr 33; レーン 20, Fr 35; レーン 21, Fr 37; レーン 22, Fr 39; レーン 23, Fr 41。ピークフラクション(Fr 15-27) を回収し、最終精製物とした。AAV9-dsEGFP 最終精製物を(d) SDS-PAGE (Oriole 染色)、(e) ウエスタンブロッティング (B1 抗キャプシド抗体)、(f) 電子顕微鏡写真、(g) 分析用超遠心(AUC) で品質評価を行った。(d) (e) レーン 1&レーン 2, AAV9-dsEGFP 最終精製物。3本のバンドは AAV9 のキャプシドタンパク質である VP1 (82 kDa)、VP2 (67 kDa)、VP3 (60 kDa) を表している。(f) 紫色矢印, 全長のウイルスゲノムを含有する完全粒子; 黄色矢印, ウイルスゲノムを含有しない中空粒子を表している。(g) (i) 中空粒子(25.7%, 68.6S); (ii) 中間体(32.4%, 88.8S); (iii) 完全粒子(38.8%, 102.6S) のピークを表している。S, 沈降係数。

Figure 4

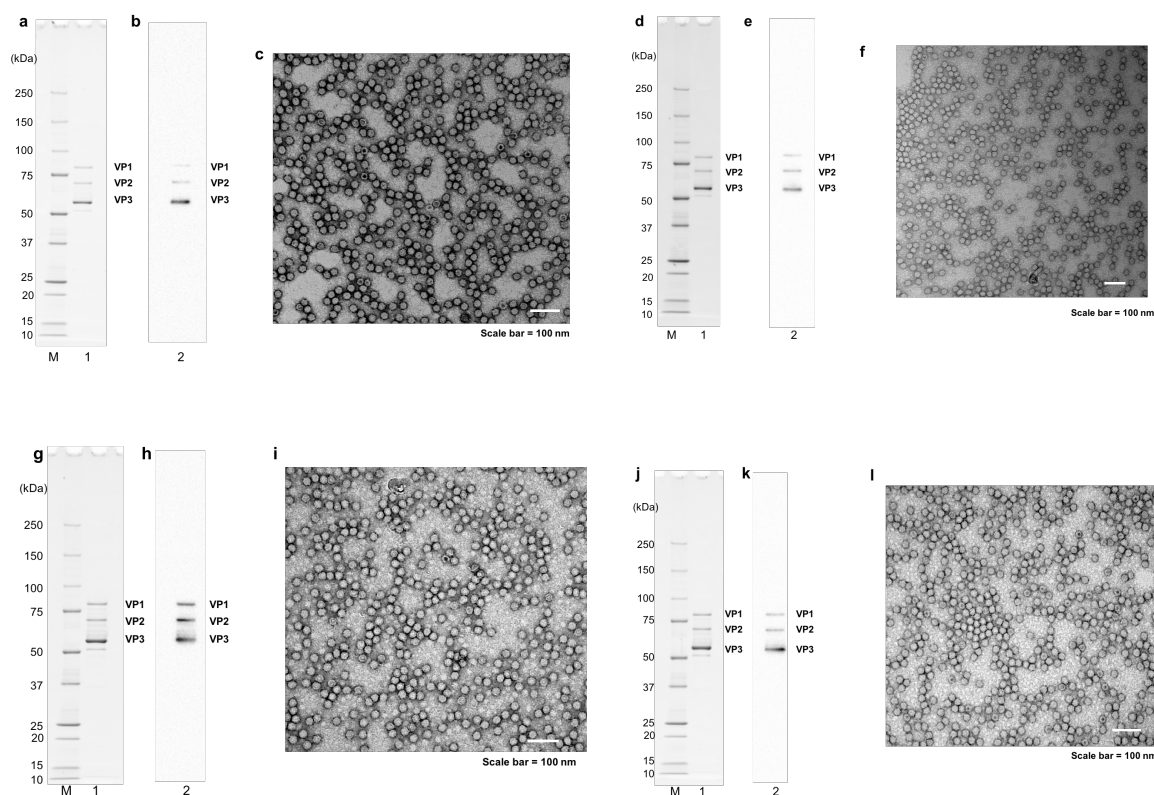


Figure 4. AAV9-dsEGFP の再現性の確認および AAV9-dsLuc・AAV9-ssLuc 精製への適用

(a-f) AAV9-dsEGFP の再現性の確認と、(g-i) AAV9-dsLuc および(j-l) AAV9-ssLuc に精製法が適用できるか検討した。品質評価を、(a, d, g, j) SDS-PAGE (Oriole 染色)、(b, e, h, k) ウェスタンブロッティング(B1 抗キャプシド抗体)、(c, f, i, l) 電子顕微鏡写真を用いて行った。各レーン 1&レーン 2, rAAV9 最終精製物。3 本のバンドは AAV9 のキャプシドタンパク質である VP1 (82 kDa)、VP2 (67 kDa)、VP3 (60 kDa) を表している。

Figure 5

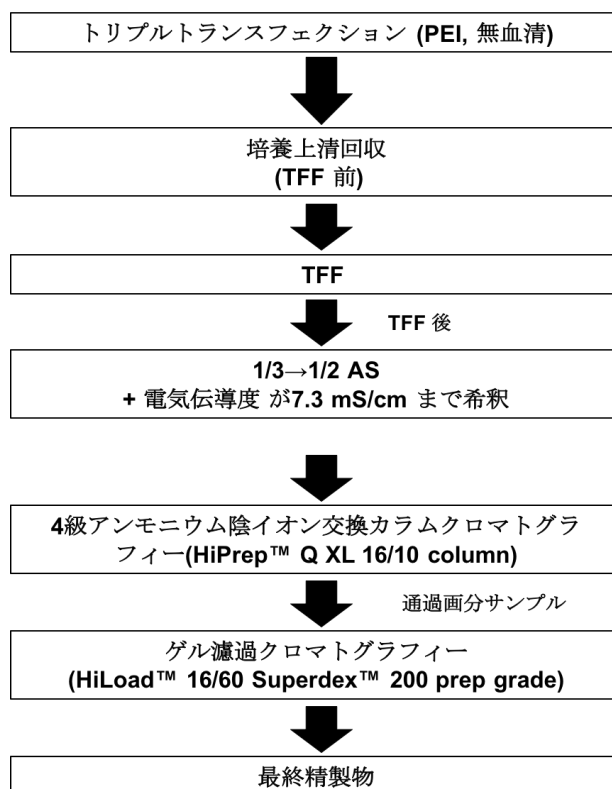


Figure 5. rAAV9 精製プロトコル

HEK293EB 細胞に rAAV9 作製に必要な 3 種のプラスミド(*cis* プラスミド、*trans* プラスミド、アデノヘルパープラスミド) を PEI を用いて無血清の状態ですトランスフェクションする(DMEM 培地)。5 日後に無血清培養上清を回収し、TFF で限外濾過した後、1/3→1/2AS で粗精製を行う。1/3→1/2AS 処理サンプルを 4 級アンモニウム陰イオン交換カラムにロードし、通過画分を最終的にゲル濾過クロマトグラフィーで精製する。

Figure 6

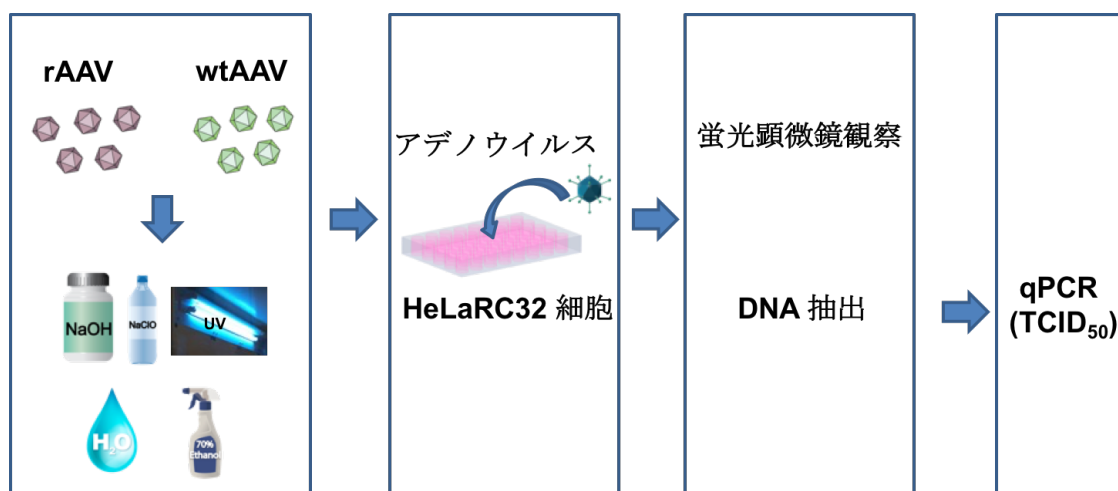


Figure 6. AAV 感染力評価のプロトコル

各血清型 rAAV (rAAV1, rAAV2, rAAV8, rAAV9) および wtAAV2 を以下のような化合物・混合物・環境に曝露し、感染力の変化を調べた。UV に 40 分間、0.1M NaOH に 15 分間、0.06% NaClO に 15 分間、0.22 μ m 濾過水道水に 10 日間、および 70% EtOH に 10 日間曝露した。96 well プレートに播種した HeLaRC32 細胞に 8 well ずつ各 AAV をトランスダクションした。rAAV が不活化されていない場合、アデノウイルス存在下で rAAV は HeLaRC32 細胞内で増殖することが可能である。

トランスダクション 3 日後に、緑色蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。感染力の変化、つまり蛍光の変化については、Image J を使用して分析した。

蛍光顕微鏡観察後、トランスダクションした細胞およびしてない細胞から DNA 抽出を行い、TCID₅₀ を qPCR により測定した。

Figure 7

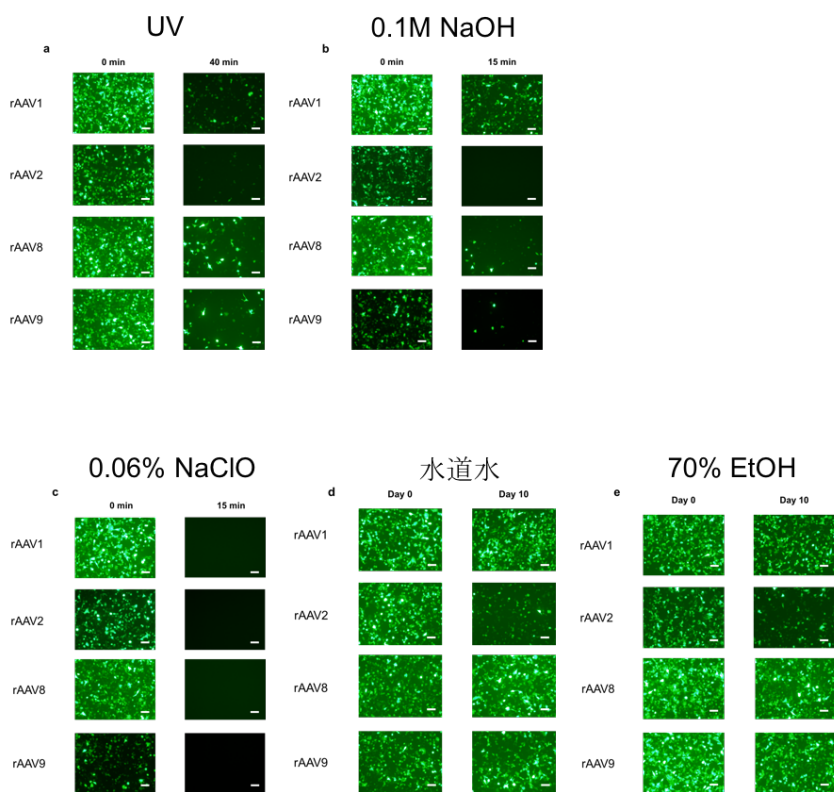


Figure 7. rAAV1・rAAV2・rAAV8・rAAV9 の感染力変化

(a) 40 分間の UV 照射、(b) 15 分間の 0.1M NaOH 曝露、(c) 15 分間の 0.06% NaClO 曝露、(d) 10 日間の 0.22 μ m フィルター濾過した水道水曝露、(e) 10 日間の 70% EtOH 曝露した前後の rAAV をトランスダクションした HeLaRC32 細胞の蛍光顕微鏡写真を示した。蛍光強度は各 rAAV の感染力を示している。蛍光強度の相対的評価、つまり感染力の変化を定量化したものを Table 4 に掲載した。

Table 1 遺伝子治療用ウイルスベクターの比較表

ベクター	ゲノム	導入可能 遺伝子 サイズ	導入可能細胞		遺伝子 発現期間	主な用途(標的)	主な 治療法	野生型 病原性
			分裂 細胞	非分裂 細胞				
AAV	ssDNA	約 4.7 kb	○	○	長期 (非分裂細胞)	神経筋疾患	<i>in vivo</i>	なし
レトロ ウイルス	ssRNA	約 8 kb	○	×	長期	造血幹細胞	<i>ex vivo</i>	あり
レンチ ウイルス	ssRNA	約 8 kb	○	○	長期	造血幹細胞 神経	<i>ex vivo</i>	あり
アデノ ウイルス	dsDNA	約 8 kb	○	○	短期	がん	<i>in vivo</i>	あり

参照: 第 3 回遺伝子治療臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会 参考資料 1 p.7 改変

上記は遺伝子治療で主に用いられるウイルスベクターである。rAAV は ssAAV の場合約 4.7kb まで、dsAAV の場合約 3.2kb まで治療遺伝子が搭載可能である。rAAV は非病原性で神経・筋などの終末分化組織(非分裂細胞) への遺伝子導入に効果的である。また、rAAV は様々な血清型が存在し、それぞれに組織指向性を有するので、対象疾患に応じて血清型を柔軟に対応できることも大きな利点である。

Table 2 各精製過程での力価測定

rAAV ゲノム	dsAAV-CBA-EGFP			dsAAV-CBA-RFLuc	ssAAV-CMV-RFLuc ^a
AAV ゲノムの形態	二本鎖			二本鎖	一本鎖
GC 含有率	59%			55%	52%
実験回数	1	2	3	4	5
TFF 前 ^{b, c}	1.3×10^{16} v.g.	9.9×10^{15} v.g.	1.0×10^{16} v.g.	8.5×10^{15} v.g.	3.6×10^{14} v.g.
TFF 後 ^c	5.3×10^{15} v.g.	5.2×10^{15} v.g.	4.1×10^{15} v.g.	7.0×10^{15} v.g.	2.9×10^{14} v.g.
総力価 陰イオン交換カラム精製 ^c	3.2×10^{15} v.g.	3.3×10^{15} v.g.	2.1×10^{15} v.g.	4.9×10^{15} v.g.	2.0×10^{14} v.g.
最終精製物 ^{c, d}	2.9×10^{15} v.g.	2.7×10^{15} v.g.	2.0×10^{15} v.g.	3.9×10^{15} v.g.	1.8×10^{14} v.g.
最終精製物 ^e	3.7×10^{14} v.g.	4.3×10^{14} v.g.	3.0×10^{14} v.g.	4.0×10^{14} v.g.	8.7×10^{13} v.g.
回収率 ^f	60%	63%	51%	70%	69%
総回収率 ^g	22%	27%	20%	46%	50%
中空粒子の割合 (中空粒子数 / 総粒子数)	3.8% (195/5168)	5.2% (230/4404)	2.6% (79/3013)	7.3% (343/4684)	3.8% (211/5561)

各精製過程の力価を **qPCR** で測定した。また、中空粒子の混入率は電子顕微鏡写真をもとに算出した。

- a **ssAAV** のスタンダードプラスミドは **dsAAV** のスタンダードプラスミドとは異なる(材料および方法を参照)。
- b 培養上清は 1120 mL。
- c **ITR** を標的としたプライマーでの **qPCR**。
- d 最終精製物は 13 mL。
- e **ITR** ではない部位を標的としたプライマーでの **qPCR**。
- f 回収率は、(陰イオン交換カラム精製後の力価) / (**TFF** 後の力価) で算出。
- g 回収率は、(最終精製物を **ITR** プライマーで測定した力価) / (**TFF** 前の力価) で算出。

Table 3 最終精製物のヒトゲノム DNA 混入率の測定

rAAV9 (1.0 × 10 ⁹ v.g.)	ヒトゲノム DNA	
	Benzonase 処理	TFF 後
+ ^c	最終精製物 ^a	< 1 コピー ^b
- ^d		2.6 コピー

HEK293EB 細胞由来の DNA が最終精製物に混入していないか測定するために、ヒト GAPDH を標的とするプライマーを用いて qPCR により分析した。

^a 3 回の AAV9-dsEGFP の精製実験の最終精製物を調べた。

^b Benzonase 処理(+) では、rAAV9 にヒトゲノム DNA がパッケージングされているか否かを判別している。

^c 1 コピー未満とは、検出限界以下を表す。

^d Benzonase 処理(-) では、rAAV9 および rAAV9 溶解溶液にヒトゲノム DNA が混入しているか否かを判別している。

Table 4 トランスダクションされた細胞の蛍光強度の相対的評価

	UV	NaOH	NaClO	水道水	EtOH
rAAV1	0.03	0.01	N.D.	0.9	0.7
rAAV2	0.003	N.D.	N.D.	0.09	0.2
rAAV8	0.02	0.04	N.D.	>1	0.5
rAAV9	0.01	0.08	N.D.	0.7	>1

蛍光顕微鏡写真から、ZsGreen1 をトランスダクションされた細胞の蛍光強度を、Image J を使用して測定した。各数値は、未処理 rAAV をトランスダクションした細胞の蛍光強度を 100% (=1) とした時の、処理 rAAV をトランスダクションした細胞の蛍光強度の割合を示したものである。N.D. は蛍光細胞を観察できなかったということを表している。EtOH, エタノール; NaClO, 次亜塩素酸ナトリウム; NaOH, 水酸化ナトリウム; N.D., not detected; UV, 紫外線。

Table 5 AAV の感染力の变化について

	UV			0.1M NaOH			0.06% NaClO			水道水			70% EtOH		
	未処理	曝露後	感染力	未処理	曝露後	感染力	未処理	曝露後	感染力	未処理	曝露後	感染力	未処理	曝露後	感染力
rAAV1	2.00 x 10 ¹⁰	1.12 x 10 ⁷	↓	3.56 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁷	↓	3.56 x 10 ⁸	2.00 x 10 ²	↓↓	6.32 x 10 ⁸	6.32 x 10 ⁸	-	3.56 x 10 ⁸	3.56 x 10 ⁸	-
wtAAV2	3.56 x 10 ⁷	2.00 x 10 ⁶	↓	2.00 x 10 ⁸	3.56 x 10 ³	↓↓	2.00 x 10 ⁸	2.00 x 10 ²	↓↓	6.32 x 10 ⁷	6.32 x 10 ⁷	-	2.00 x 10 ⁸	3.56 x 10 ⁶	↓
rAAV2	2.00 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁶	↓	2.00 x 10 ⁸	2.00 x 10 ²	↓↓	6.32 x 10 ⁸	2.00 x 10 ²	↓↓	3.56 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁸	↓	6.32 x 10 ⁸	3.56 x 10 ⁷	↓
rAAV8	2.00 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁶	↓	2.00 x 10 ⁹	1.12 x 10 ⁷	↓	6.32 x 10 ⁸	2.00 x 10 ²	↓↓	1.12 x 10 ⁹	2.00 x 10 ⁹	-	2.00 x 10 ⁹	3.56 x 10 ⁹	-
rAAV9	6.32 x 10 ⁹	6.32 x 10 ⁷	↓	2.00 x 10 ⁹	3.56 x 10 ⁷	↓	2.00 x 10 ⁹	3.56 x 10 ²	↓↓	1.12 x 10 ⁹	2.00 x 10 ⁹	-	6.32 x 10 ⁸	6.32 x 10 ⁸	-

単位：TCID₅₀/mL

3-2-6 の方法に従って、各 rAAV のトランスダクション前後で、細胞から DNA を抽出し、各プライマーを使用して qPCR を行うことで TCID₅₀ を測定した。この時、rAAV1, rAAV8, rAAV9 は、ZsGreen1 を標的としたプライマーを用い、rAAV2, wtAAV2 は ITR を標的としたプライマーを用いた。そして、qPCR の値から、感染力の变化を測定した。表中の記号は以下の通りである。-, 感染力の低下が見られない; ↓, 有意に感染力の低下が見られた; ↓↓, 5-log 以上の感染力の低下が見られた。