

氏名	伴野 太郎		
学位の種類	博士（ 医学 ）		
学位記番号	博甲第 9575 号		
学位授与年月	令和 2 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 44 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	島野 仁	博士(医学)
副査	筑波大学准教授	竹内 薫	医学博士
副査	筑波大学准教授	西村 健	博士(医学)
副査	筑波大学講師	加藤貴康	博士(医学)

論文の内容の要旨

伴野太郎 氏の博士学位論文は、9 型アデノ随伴ウイルスベクターにおけるクロマトグラフィー精製法開発および rAAV 安定性評を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

著者は、修士過程の時より遺伝子治療として期待されている rAAV ベクターについて開発に携わってきた。本研究では、種々の血清型のうち rAAV9 ベクターを臨床応用に向け、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。

(対象と方法)

著者は、rAAV9 精製法の検討は、以下の通りに行った。HEK293EB 細胞に 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トランスフェクション、5 日後に培養上清を回収し、TFF で限外濾過後、硫酸沈澱法 で粗精製を行った。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した。AAV 安定性評価は、各血清型 rAAV および wtAAV2 を以下の処理を行った：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。HeLaRC32 細胞に処理した各 AAV と未処理の各 AAV をトランスダクションし、3 日後に、緑色蛍光を蛍光顕微鏡で観察し、感染力変化を調べた。その後、トランスダクションした細胞およびしていない細胞から DNA 抽出を行い、TCID₅₀ を qPCR により測定した。

(結果)

著者は、AAV9-dsEGFP の精製を 3 回繰り返して最終精製物を SDS-PAGE に展開し解析し、夾雑タンパク質が非常に少ないことを見出した。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も観察している。著者は最終精製物を分析用超遠心(AUC) で評価したが電子顕微鏡の結果とは異なり、約 26% の中空粒子が含まれていると判断した。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、 $2.5\pm 0.4 \times 10^{15}$ v. g. の結果が得られた。

上記の精製プロトコルが、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としている。

rAAV 安定性の結果は以下の通りと評価した。rAAV1・8・9 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かった。rAAV2 の感染力が全ての処理(UV、NaOH、NaClO、水道水、EtOH)によって低下した。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かったと報告している。

(考察)

著者が主張する rAAV9 精製法の第一の利点は、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、高収率・高力価の rAAV9 を精製できることである。第三の利点は、ベクターゲノムのタイプ(一本鎖か二本鎖、ゲノムサイズ、GC 含有率)に関係なく、適用できることとした。

また最終精製物を電子顕微鏡および AUC で評価し乖離が見られたことを踏まえ、電子顕微鏡がウイルス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現況から、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する必要があると議論した。

また rAAV の安定性に関する知見が、臨床試験で起こりうる患者からのウイルス排出の際に重要なデータとなること、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知っておく必要があるが、これまで rAAV の安定性に関するデータがほとんどないため、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察した。

(結論)

rAAV9 を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が、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著者は、今後、電子顕微鏡と AUC での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と。さらに、中空粒子および中間体を、そもそも生産しないような新規 rAAV 産生法の確立も目指したいと述べている。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が、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と抱負を述べている。本研究で行った、rAAV 精製法および安定性評価についても、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とした。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、従来より遺伝子治療の臨床応用に実用段階まで来ているアデノ随伴ウイルスベクターの開発と生成に関わってきた。数ある血清型の中、その特徴をよく吟味の上、筋疾患での臨床応用をめざして、9 型 AAV に焦点をあて、クロマトグラフィー技術を軸に従来の欠点を克服し、純度の高い生成法を開発した。その過程で、機能性のない中空粒子や中間体と完全粒子の識別に関する従来の評価法の問題点を指摘し、より優れた評価法を提言している。また臨床応用を意識して、安定性の評価まで AAV で初めて踏み込んでいる。9 型の他の血清型にない特徴を乱し各生成法のより優れた新規の生成法に関しても考察し未来の研究、実用をめざしている。将来の遺伝子治療の生成及び方法に極めて重要な貢献を果たした論文と言える。

審査会においては、長年のこの領域における進歩と自分の貢献や今後の遺伝子治療の方向についても持論と決意を披露していた。

令和元年 12 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。