



Title	アデノ随伴ウイルスベクターの光安定性に関する研究
Author(s)	滝野, 里枝
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101626
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（滝野里枝）	
論文題名	アデノ随伴ウイルスベクターの光安定性に関する研究
論文内容の要旨	
<p>第1章 序論 組換え型アデノ随伴ウイルス(rAAV)は、非病原性ウイルス由来かつ免疫原性が低く安全性が高いことや血清型に依存した組織指向性など、遺伝子治療に適した特性を持つことから、遺伝子治療用ベクターとして活用が進められている。一方で、医薬品開発に不可欠な安定性に関する知見は未だ不十分である。医薬品の安定性は、安全で有効な製品の供給に欠かせない要素であり、製品の品質を担保するため、製造から保管、輸送、使用時に曝される様々なストレスに対して評価される。特に避けられないストレスである熱及び光に対する安定性が重視されるが、現在のところrAAVの光に対する安定性の知見は非常に限られている。本研究では、強緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を目的遺伝子として含むrAAV6を試料として光安定性試験を実施することで、光ストレスによってrAAVの安全性及び有効性がどのように損なわれるかを明らかにし、rAAVの光安定性の包括的な理解を得ることを目指した。</p> <p>第2章 品質特性に対する光ストレスの影響 ICHに規定される光安定性条件に沿ってrAAV6の光安定性試験を実施し、rAAV6の機能面、構造面の変化を評価した。機能の評価では、光劣化サンプルを細胞に感染させ、フローサイトメーターを用いて光劣化サンプルの形質導入効率を測定した。その結果、形質導入効率は7日間の光ストレスによって劇的に低下し、非劣化サンプルに対して約10%にまで低下した。構造の評価では、rAAV粒子、カプシド内DNA、カプシドタンパク質の品質変化を評価した。rAAV粒子の評価にはバンド沈降超遠心分析法(BS-AUC)、ドロップレット型デジタルPCR(ddPCR)、及び動的光散乱分析法(DLS)を用いた。カプシド内DNAの評価にはキャピラリー電気泳動(CE-LIF)、遊離DNAアッセイ、及びシクロプロタン型ピリミジンダイマー(CDP)酵素結合免疫吸着測定法を用いた。カプシドタンパク質の評価ではキャピラリーゲル電気泳動(CE-SDS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)によるウイルスタンパク質(VP)分析及び翻訳後修飾解析、SDS-PAGEを行った。その結果、rAAV粒子、カプシド内DNA、カプシドタンパク質それぞれで光ストレスによる劣化が観察された。具体的には、BS-AUC及びDLSの結果から、rAAV6の完全粒子(FP_{app})は光曝露に伴い7日間で約20%が失われ、1000 nm以上の凝集体形成に繋がることが示された。ddPCRの結果では、ゲノム濃度が光ストレスにより57.4%減少し、粒子の損失だけでなく、カプシド内DNAの劣化が示唆された。カプシド内DNAの分析では光曝露によって典型的なDNAの光劣化であるCPDが生じ、CE-LIFによる純度分析では主ピークが非劣化サンプルに対して7日間で74.0%減少した。一方で光ストレスによるカプシド内DNAの放出は限定的であった。カプシドタンパク質の評価では、VP1及びVP3とVP2の間のピーク(VPx)の存在比が減少し、高分子量種が光曝露に伴い増加した。LC-MS分析により、VPxはVP2断片体と特定された。LC-MSによるアミノ酸レベルの分析では、カプシド内外の表面に位置するメチオニン残基と、特定のヒスチジン残基(H628及びH630)の酸化が光曝露に伴い上昇することが確認された。</p> <p>第3章 rAAVの光劣化経路 第2章の結果から光ストレスによる機能低下に繋がる主な光劣化経路として、2つの構造上の変化(凝集とカプシド内DNAの光劣化による構造変化)の特定に成功した。これらは有効性の低下と安全性の懸念を引き起こす。本研究によってrAAVのDNA部分が光ストレスに対して最も脆弱であること、またカプシド内DNAの完全性が生物学的活性を発揮するのに重要なことが明らかになった。AAVの血清型はカプシドタンパク質のアミノ酸配列に依存することから、観察されたrAAV6の構造変化が血清型依存的か否か、を検証した。その結果、rAAV6で観察された光劣化には血清型依存的な劣化と非依存的な劣化が存在するが、特定した主な劣化は血清型に共通する可能性が高いことを明らかにした。また、rAAVの光劣化挙動が曝露した総照度(照度×時間)に依存する一次反応式に回帰したことから、高照度・短期間で実施した安定性試験から許容最大曝露量を推定可能であることを示した。さらに、rAAV6のFP_{app}がDNA放出せずに凝集体を形成すること、カプシドタンパク質のヒスチジン残基の酸化がカプシド内DNAの光劣化に伴って発生すると示唆されたこと、などrAAVの凝集や構造に関する研究に資する新しい知見も得られた。</p> <p>第4章 総括 本研究では、rAAVの光ストレスに対する安定性の包括的な理解を得ることを目的に光安定性試験を実施し、主要な光劣化経路・挙動推測や安全性有効性への影響など、新たな知見を得た。これによりrAAVにおいて光は製造、流通及び使用時を通して適切に管理する必要がある重要な環境因子であることを明らかにした。本成果は、今後のrAAVを用いた遺伝子治療用医薬品の開発において、より安全で効果的な治療法の提供に寄与することが期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (潟野 里枝)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主査 教授 内山 進 副査 教授 大政 健史 副査 教授 福崎 英一郎
論文審査の結果の要旨	
<p>第1章 序論 組換え型アデノ随伴ウイルス(rAAV)は、非病原性ウイルス由来かつ免疫原性が低く安全性が高いことや血清型に依存した組織指向性など、遺伝子治療に適した特性を持つことから、遺伝子治療用ベクターとして活用が進められている。一方で、医薬品開発に不可欠な安定性に関する知見は未だ不十分である。医薬品の安定性は、安全で有効な製品の供給に欠かせない要素であり、製品の品質を担保するため、製造から保管、輸送、使用時に曝される様々なストレスに対して評価される。特に避けられないストレスである熱及び光に対する安定性が重視されるが、現在のところ rAAV の光に対する安定性の知見は非常に限られている。本研究では、強緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を目的遺伝子として含む rAAV6 を試料として光安定性試験を実施することで、光ストレスによって rAAV の安全性及び有効性がどのように損なわれるかを明らかにし、rAAV の光安定性の包括的な理解を得ることを目指した。</p> <p>第2章 品質特性に対する光ストレスの影響 ICH に規定される光安定性条件に沿って rAAV6 の光安定性試験を実施し、rAAV6 の機能面、構造面の変化を評価した。機能の評価では、光劣化サンプルを細胞に感染させ、フローサイトメーターを用いて光劣化サンプルの形質導入効率を測定した。その結果、形質導入効率は 7 日間の光ストレスによって劇的に低下し、非劣化サンプルに対して約 10% にまで低下した。構造の評価では、rAAV 粒子、カプシド内 DNA、カプシドタンパク質の品質変化を評価した。rAAV 粒子の評価にはバンド沈降超遠心分析法(BS-AUC)、ドロップレット型デジタル PCR(ddPCR)、及び動的光散乱分析法(DLS)を用いた。カプシド内 DNA の評価にはキャピラリー電気泳動(CE-LIF)、遊離 DNA アッセイ、及びシクロプロタン型ピリミジンダイマー(CDP)酵素結合免疫吸着測定法を用いた。カプシドタンパク質の評価ではキャピラリーゲル電気泳動(CE-SDS)、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)によるウイルスタンパク質(VP)分析及び翻訳後修飾解析、SDS-PAGEを行った。その結果、rAAV 粒子、カプシド内 DNA、カプシドタンパク質それぞれで光ストレスによる劣化が観察された。具体的には、BS-AUC 及び DLS の結果から、rAAV6 の完全粒子(FPapp)は光曝露に伴い 7 日間で約 20% が失われ、1000 nm 以上の凝集体形成に繋がることが示された。ddPCR の結果では、ゲノム濃度が光ストレスにより 57.4% 減少し、粒子の損失だけでなく、カプシド内 DNA の劣化が示唆された。カプシド内 DNA の分析では光曝露によって典型的な DNA の光劣化である CPD が生じ、CE-LIF による純度分析では主ピークが非劣化サンプルに対して 7 日間で 74.0% 減少しした。一方で光ストレスによるカプシド内 DNA の放出は限定的であった。カプシドタンパク質の評価では、VP1 及び VP3 と VP2 の間のピーク(VPx)の存在比が減少し、高分子量種が光曝露に伴い増加した。LC-MS 分析により、VPx は VP2 断片体と特定された。LC-MS によるアミノ酸レベルの分析では、カプシド内外の表面に位置するメチオニン残基と、特定のヒスチジン残基(H628 及び H630)の酸化が光曝露に伴い上昇することが確認された。</p> <p>第3章 rAAV の光劣化経路 第2章の結果から光ストレスによる機能低下に繋がる主な光劣化経路として、2つの構造上の変化(凝集とカプシド内 DNA の光劣化による構造変化)の特定に成功した。これらは有効性の低下と安全性の懸念を引き起す。本研究によって rAAV の DNA 部分が光ストレスに対して最も脆弱であること、またカプシド内 DNA の完全性が生物学的活性を發揮するのに重要であることが明らかになった。AAV の血清型はカプシドタンパク質のアミノ酸配列に依存することから、観察された rAAV6 の構造変化が血清型依存的か否か、を検証した。その結果、rAAV6 で観察された光劣化には血清型依存的な劣化と非依存的な劣化が存在するが、特定した主な劣化は血清型に共通する可</p>	

能性が高いことを明らかにした。また、rAAV の光劣化挙動が曝露した総照度(照度×時間)に依存する一次反応式に回帰したことから、高照度・短期間で実施した安定性試験から許容最大曝露量を推定可能であることを示した。さらに、rAAV6 の FPapp が DNA 放出せずに凝集体を形成すること、カプシドタンパク質のヒスチジン残基の酸化がカプシド内DNA の光劣化に伴って発生すると示唆されたこと、など rAAV の凝集や構造に関する研究に資する新しい知見も得られた。

第4章 総括 本研究では、rAAV の光ストレスに対する安定性の包括的な理解を得ることを目的に光安定性試験を実施し、主要な光劣化経路・挙動推測や安全性有効性への影響など、新たな知見を得た。これにより rAAV において光は製造、流通及び使用時を通して適切に管理する必要がある重要な環境因子であることを明らかにした。本成果は、今後の rAAV を用いた遺伝子治療用医薬品の開発において、より安全で効果的な治療法の提供に寄与することが期待される。

以上のように、本論文は光安定性試験を組換えアデノ随伴ウイルスに適用した世界ではじめての研究に関する内容で、本論文で明らかとなった光劣化メカニズムは遺伝子治療用医薬品の有効性と安全性の担保に学術面から貢献する。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。