



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	<a href="https://doi.org/10.18910/101626">https://doi.org/10.18910/101626</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

博士学位論文

アデノ随伴ウイルスベクターの光安定性  
に関する研究

滝野 里枝

2024 年 12 月

大阪大学 大学院工学研究科  
生命先端工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域  
内山研究室

## 目次

略語 .....	4
第 1 章 序論 .....	6
1.1 アデノ随伴ウイルスと遺伝子治療 .....	6
1.2 rAAV の作用機序.....	10
1.3 医薬品における安定性評価 .....	14
1.4 AAV の安定性 .....	16
1.5 DNA の光劣化.....	18
1.6 タンパク質の光劣化.....	20
1.7 本研究の目的と構成.....	21
第 2 章 光ストレスによる品質特性の変化 .....	22
2.1 緒言.....	22
2.2 実験材料および実験手法 .....	24
2.2.1 材料 .....	24
2.2.2 光劣化サンプルの作成.....	24
2.2.3 <i>In vivo</i> トランスダクションアッセイ .....	26
2.2.4 バンド沈降超遠心分析法 (BS-AUC) .....	27
2.2.5 ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) .....	27
2.2.6 キャピラリー電気泳動ーレーザー励起蛍光検出法 (CE-LIF) .....	28
2.2.7 遊離 DNA アッセイ .....	29
2.2.8 CPD 酵素結合免疫吸着測定 (CPD ELISA) .....	29
2.2.9 SDS キャピラリーゲル電気泳動 (CE-SDS) .....	29
2.2.10 液体クロマトグラフィーー質量分析法 (LC-MS) による VP 分析 (Intact MS) .....	30
2.2.11 SDS-PAGE .....	30
2.2.12 液体クロマトグラフィーー質量分析法によるペプチドマッピング	31

2.3	結果.....	32
2.3.1	生物学的活性評価.....	32
2.3.2	rAAV 粒子の評価.....	34
2.3.3	ddPCR によるゲノム濃度の決定.....	38
2.3.4	カプシド内 DNA の光安定性評価.....	39
2.3.5	カプシドタンパク質の光安定性評価.....	42
2.3.6	光ストレスによるカプシドタンパク質の翻訳後修飾.....	46
第 3 章	rAAV の光劣化経路.....	49
3.1	緒言.....	49
3.2	rAAV6 の機能に対する光ストレスの影響.....	50
3.3	rAAV6 の構造に対する光ストレスの影響.....	51
3.3.1	粒子損失.....	51
3.3.2	DNA の光分解.....	52
3.3.3	タンパク質の光分解.....	53
3.4	rAAV6 の安全性および有効性に対する光ストレスの影響.....	57
3.5	異なる照度における光劣化の推測.....	59
3.6	rAAV の光安定性.....	63
第 4 章	総括.....	68
補足資料	.....	71
引用文献	.....	78
発表論文	.....	84

## 略語

AAV : adeno-associated virus、アデノ随伴ウイルス

AUC : analytical ultracentrifugation、超遠心分析

BS-AUC : band sedimentation-analytical ultracentrifugation、バンド沈降超遠心分析

CE-LIF : capillary gel electrophoresis-laser induced fluorescence、キャピラリーゲル

電気泳動－レーザー励起蛍光検出法

CE-SDS : capillary gel electrophoresis、SDS キャピラリーゲル電気泳動

CPD : cyclobutane pyrimidine dimer、シクロブタン型ピリミジン二量体

ddPCR : droplet digital polymerase chain reaction、ドロプレット型デジタル PCR

DFA : difluoroacetic acid、ジフルオロ酢酸

DLS : dynamic light scattering、動的光散乱

ELISA : enzyme-linked immuno-sorbent assay、酵素結合免疫吸着測定

GOI : Gene of Interest、目的遺伝子

ICH : International Council for Harmonization of Technical Requirements for

Pharmaceuticals for Human Use、医薬品規制調和国際会議

Intact-MS : intact mass spectrometry、インタクトタンパク質を対象とした質量分析

LC : liquid chromatography、液体クロマトグラフィー

MOI : Multiplicity of Infection、感染多重度、 $MOI = \text{virus/cell}$  で算出される

MS : mass spectrometry、質量分析

PLA2 : phospholipase A、ホスホリパーゼ A2

qPCR : quantitative polymerase chain reaction、定量 PCR

rAAV : recombinant adeno-associated virus、組換え型アデノ随伴ウイルス

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis、ドデシル硫

酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

VP : viral protein、ウイルスタンパク質

VP1u : VP1 unique region、VP1 特異的配列

## 第1章 序論

### 1.1 アデノ随伴ウイルスと遺伝子治療

アデノ随伴ウイルス (Adeno associated virus、AAV) は、1960 年代に特定されたパルボウイルス科に属する小型の非エンベロープウイルスで<sup>1-3</sup>、近年遺伝子治療の有望な手段として大きな注目を集めている<sup>4-6</sup>。遺伝子治療は、体外に取り出した細胞に目的遺伝子を導入・発現させ再度体内に戻す手法 (*ex vivo* 遺伝子治療) と、遺伝子導入ベクターの全身/局所投与によって標的臓器において目的遺伝子を直接発現させる手法 (*in vivo* 遺伝子治療) に大別され、AAV は *in vivo* 遺伝子治療に適しているウイルスベクターであると考えられている。AAV は非病原性ウイルスであり免疫原性も低く、宿主細胞の染色体に AAV ベクターの遺伝子が組み込まれる頻度は極めて低いため、他のウイルスベクターと比較して安全性が高い。また、神経細胞、肝細胞、筋細胞などの終末分化細胞、非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり、導入した細胞において遺伝子を長期に発現させることができる。AAV には組織指向性が異なる複数の血清型があり<sup>7,8</sup>、標的組織に応じて最適な型を使い分けることが可能である。これらは *in vivo* 遺伝子治療に利用する上で好ましい特性である。

AAV は、正二十面体のタンパク質カプシドに DNA が内包された構造をとる (図 1A)。野生型の場合、ヘアピン構造をとる ITR (inverted terminal repeat) 配列が両末端に位置し、その間に *Rep* 遺伝子および *Cap* 遺伝子からなる、全長約 4.7kb の一本鎖 DNA が内包されている。これらの遺伝子は AAV の複製に必要な非構造タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52、Rep40、AAP、MAAP) と 3 種の構造タンパク質 (VP1、VP2 および VP3) をコードしている (図 1B)。コードされるタンパク質はウイルスゲノムの転写開始点の使い分けと転写後のスプライシングによって発現され、図 1B に記載するようにそれぞれ重複するアミノ酸配列

持つ。Rep タンパク質はカプシド形成やカプシド内へのゲノムパッケージング、宿主細胞の染色体への組込み等の機能を持ち、それ自身はカプシドを構成しない。構造タンパク質である VP1、VP2 および VP3 は図 1A に示すようにカプシドを構成するサブユニットであり、通常、VP1: VP2: VP3=5:5:50 の構成比で計 60 個のサブユニットが集合し、約 20-25 nm のカプシド粒子を形成する<sup>9,10</sup>。AAV 自身はウイルス粒子を複製するために必要な遺伝子を全ては有していないため、アデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖でき、単独では増殖できない。

遺伝子治療に用いられるのはウイルスベクターとしての AAV であり、組換え型 AAV (recombinant AAV、rAAV) あるいは AAV ベクターと称される。野生型との違いは内包する DNA の配列で、rAAV は一般に Rep 遺伝子および Cap 遺伝子が目的遺伝子 (Gene of Interest、GOI) に置き換えられた配列となっている (図 1C)。これにより投与後の体内での予期しないウイルス増殖の可能性を排除した上で、ベクターとしての役割のみを保持することができる。また、ウイルスゲノムを染色体に組込む役割を持つ Rep タンパク質が生産されないため、導入した目的遺伝子が標的細胞の染色体に組み込まれることはほとんどない。製造時には Rep 遺伝子と Cap 遺伝子、さらにウイルス粒子を複製するために必要なヘルパーウイルス由来の遺伝子を別のプラスミド等から供給して製造する。rAAV は主に HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞、human embryonic kidney cell、HEK) や Sf9 細胞 (ツマジロクサヨトウ、*Spodoptera frugiperda*、Sf) を用いて製造されるが、品質面・製造コスト面・製造スケーラビリティに課題があり、浮遊細胞株や HeLa 細胞など様々な細胞を用いた製造方法が研究されている。

2012 年に最初の rAAV 医薬品 (Glybera、現在は販売終了) が上市してから現在に至るまで、血友病や筋ジストロフィーを対象にした 8 つの製品が米国およ



び欧州を中心に上市されている。更に世界中で 200 件を超える臨床試験が行われており、より一層の発展が期待されている<sup>11,12</sup>。進化工学的手法を用いて特定組織への指向性を向上させたカプシド改変型 rAAV、VP に修飾を加えたカプシド改変型 rAAV の開発や、従来的一本鎖 DNA ではなく自己相補性を持つ DNA を内包させた scAAV (self-complementary AAV) など、安全性・有効性の向上を目的としたさまざまなタイプの rAAV が開発されている。

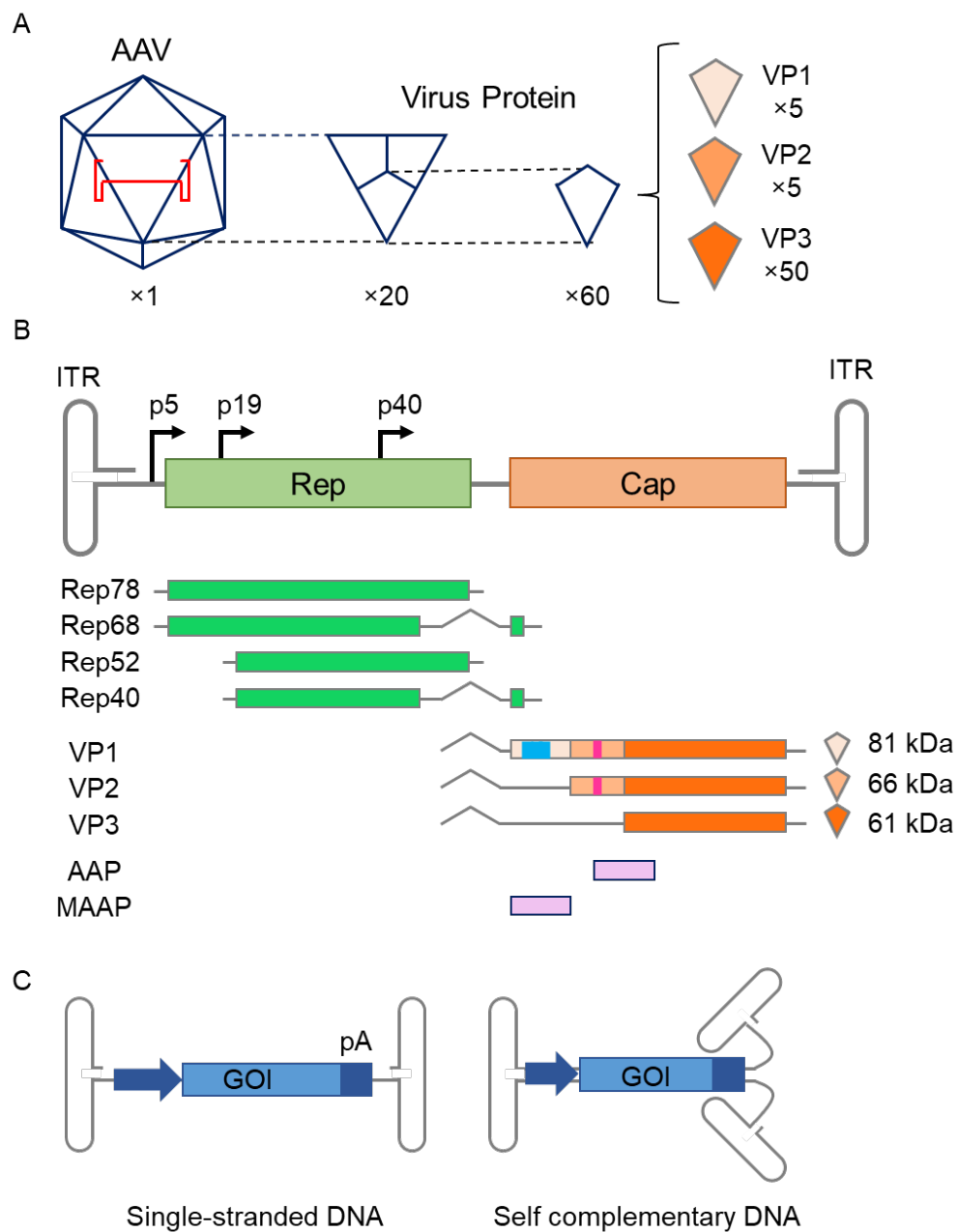


図1 野生型 AAV および rAAV の構造

A) AAV の構造

B) 野生型 AAV の DNA 配列と発現するタンパク質

VP 中の PLA2 ドメインおよび核移行シグナル配列をそれぞれ水色、マゼンタで表した。各 VP の分子量：AAV6 の理論分子量を示した。

C) rAAV の DNA 構造概念図（一本鎖 DNA および自己相補性 DNA）

## 1.2 rAAV の作用機序

ウイルスベクターを用いる遺伝子治療で汎用的に期待される効能は標的細胞への目的遺伝子の発現、形質導入である。rAAV による細胞への形質導入には、複数のステップを経る必要があり、最も基本的な ssDNA を持つ rAAV の場合、

(1) 細胞表面の受容体への結合を介したエンドサイトーシスによる細胞への侵入、(2) 細胞内輸送およびエンドソームからの離脱、(3) ベクターの核内移行、(4) ウイルスゲノムのカプシドからの脱殻、(5) 二本鎖 DNA 合成と RNA への転写、を経て目的タンパク質の発現に至る (図 2) <sup>13,14</sup>。

野生型 AAV の生活環およびそれを利用した rAAV の作用機序は盛んに研究が行われているが、未解明な部分も多く残る。rAAV は細胞表面の一次受容体と結合することで細胞に接着し、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれるが、表 1 に示すように、AAV の血清型によって結合する一次受容体は異なる。ヘパリン硫酸プロテオグリカン (AAV2) やシアル酸 (AAV1、AAV 4、AAV 5) など様々な受容体との結合が報告されており、これらが血清型に依存する組織指向性に繋がっていると考えられる。なお、細胞表面への結合に寄与する一次受容体以外にも比較的普遍的に認識される AAV 受容体 (AAVR) や G タンパク質共役受容体 108 (GPR108) 等のタンパク質との結合も形質導入プロセスに重要な要素であることが報告されている。細胞内へ取り込まれた rAAV は、エンドサイトーシス経路に沿って細胞内輸送される。rAAV は図 1B に示すように VP1 タンパク質の N 末端領域 (VP1u) に phospholipase A2 (PLA2) ドメインを持ち、ホスホリパーゼ活性によって小胞膜を分解することでエンドソームを脱出し、宿主細胞の核へ移動する。この PLA2 ドメインは後期エンドソーム内の pH 低下に伴ってカプシド内から外へ露出し、脂質膜を消化、エンドソーム脱出を可能にしていると考えられている。

rAAV は、VP1/2 共通領域に核移行シグナル配列 (Nuclear Localization Signal; NLS) を有し、エンドソームの分解経路から逃れた後、核膜孔複合体を通して宿主細胞の核内へ移動すると考えられている。その後、核内でカプシドから DNA を放出、放出された GOI を含む DNA は宿主細胞の核で相補鎖合成または rAAV に別々に収納されていたマイナス鎖とプラス鎖のハイブリダイゼーションにより二本鎖 DNA となる。なお、scAAV の場合、カプシド内 DNA 単体で二本鎖構造を形成するため、この合成ステップを省略することが可能となる。その後、二本鎖 DNA から mRNA が転写、細胞質へ運ばれ、目的タンパク質が生産されることで形質導入が達成される。このように rAAV の機能が発揮されるまでの作用機序は非常に複雑である。さらに、細胞内輸送や核内移行の様式、核内での DNA 放出挙動については、血清型によって異なる挙動が観察されているものの、明らかになっていない部分が多い。

rAAV はその構造と作用機序の複雑性から活性低下につながる重要品質特性 (Critical Quality Attribute、CQA) は完全には特定されていない。しかしその作用機序から細胞膜への結合、PLA2 ドメインの外在化、ホスホリパーゼ機能などの阻害に繋がる変化やカプシド内 DNA の変化は rAAV の形質転換能を低下または阻害すると推察される。例えば、熱ストレスに対する安定性試験において観察された PLA2 ドメイン中のアスパラギン残基の脱アミド化は形質導入効率の低下を招くことが明らかになっている<sup>15</sup>。

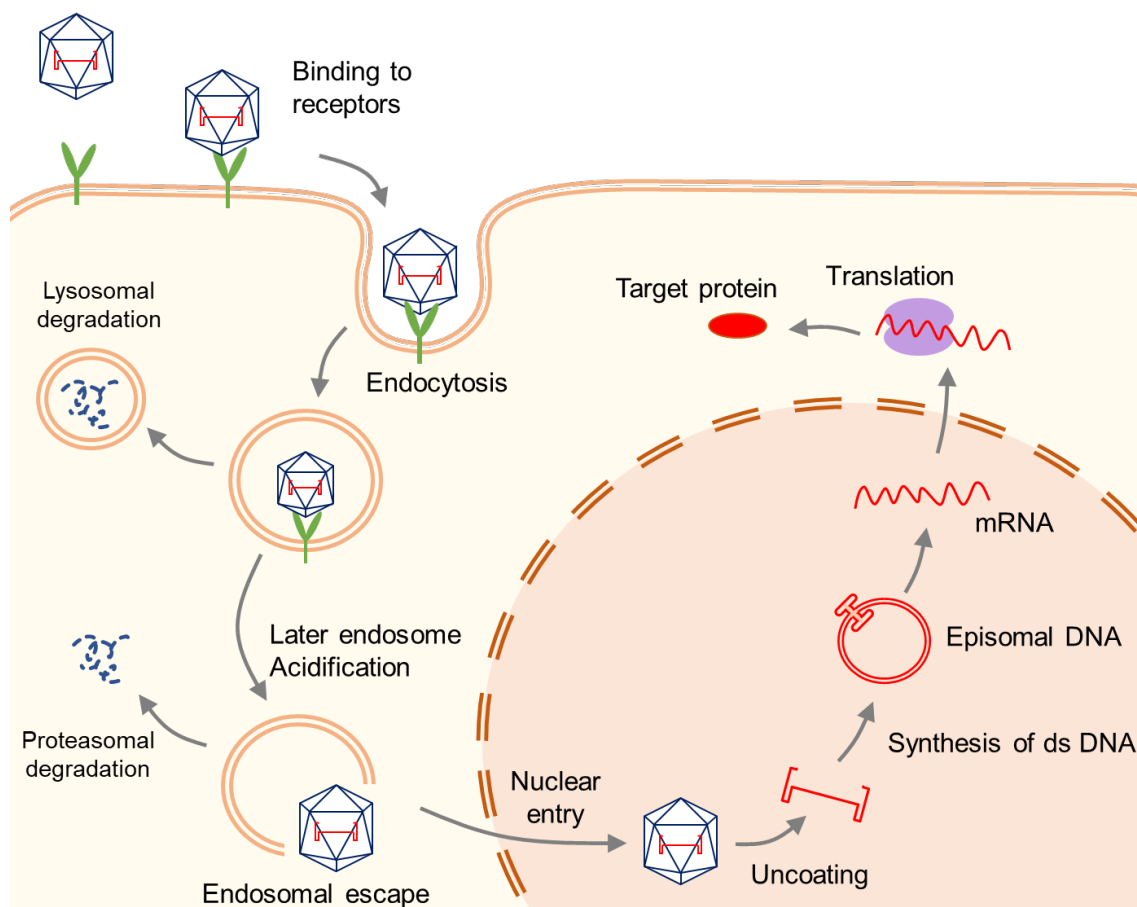


図 2 rAAV の作用機序

表 1 AAV の主な血清型における受容体の種類と組織指向性

Serotype	Primary receptors	Receptors for post-attachment	Tissue tropism in human
AAV1	N-linked sialic acid	AAVR, GPR108	Skeletal muscle, CNS, airway, retina, pancreas, lung
AAV2	HSPG	AAVR, GPR108	Retina, CNS, smooth muscle, skeletal muscle, liver, kidney
AAV3	HSPG	AAVR, GPR108	Hepatocarcinoma, skeletal muscle, inner ear, liver
AAV4	O-linked sialic acid	GPR108	Lung, CNS, retina
AAV5	N-linked sialic acid	AAVR	Retina, CNS, kidney, pancreas, liver, skeletal muscle, lung
AAV6	N-linked sialic acid, HSPG	AAVR, GPR108	Airway, CNS, skeletal muscle, heart, lung, bone marrow
AAV7	Unknown	Unknown	Liver, skeletal muscle, retina, CNS
AAV8	Unknown	AAVR, GPR108	Liver, CNS, retina, skeletal muscle, pancreas, heart
AAV9	Galactose	AAVR, GPR108	Heart, CNS, liver, brain, skeletal muscle, lungs, pancreas, kidney
AAV10	Unknown	Unknown	Liver

HSPG : ヘパリン硫酸プロテオグリカン、AAVR : AAV 受容体、GPR108 : G タンパク質共役受容体 108

Skeletal muscle : 骨格筋、CNS : Central nervous system、中枢神経系、Airway : 気道、Retina : 網膜、Pancreas : 膵臓、Lumber cistern : 腰椎、Spleen : 脾臓、Submandibular glands : 顎下腺、Smooth muscle : 平滑筋、Hepatocarcinoma : 肝細胞癌

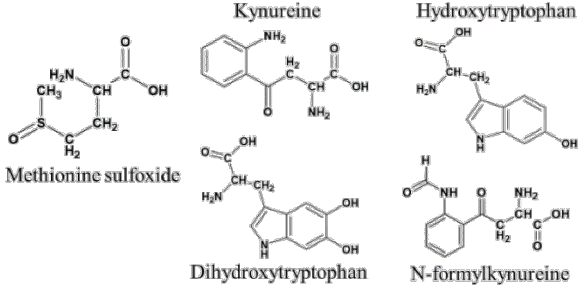
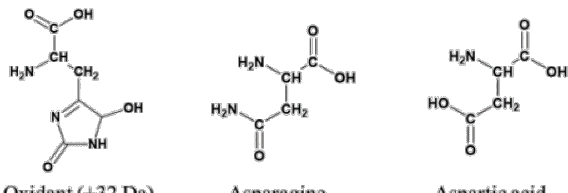
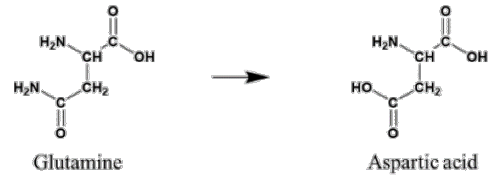
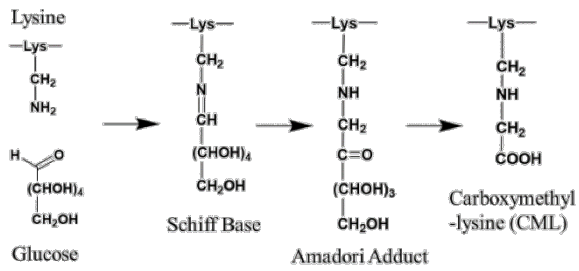

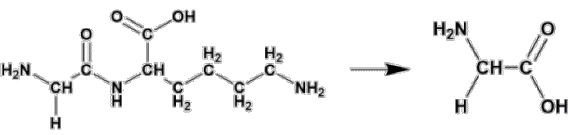
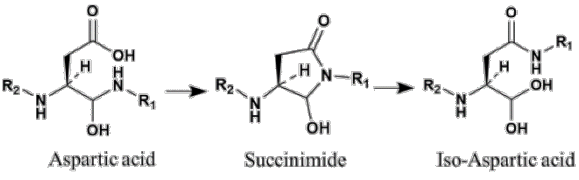
参考文献<sup>16,17</sup>より作成。

### 1.3 医薬品における安定性評価

医薬品の安定性は安全で有効な製品を安定的に供給するために必要不可欠な情報である。医薬品開発においては、製造から保管、輸送を経て患者に投与されるまでの医薬品の一生においてどのような品質変化が起こりうるのか、曝露が予測される様々なストレスに対しての品質の経時的変化が評価され、有効期間や保管条件の設定に活用されている。医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、ICH）においても承認申請に不可欠な情報として評価方法の国際調和が行われガイドラインが制定されている（Q1A～Q1E および Q5C）<sup>18</sup>。バイオ医薬品の場合、有効成分は一般にタンパク質やポリペプチドであり、分子の高次構造およびそれに基づく生物学的活性は、共有結合だけでなく非共有結合にも依存している。そのため、温度、光、酸化、イオン強度、物理ストレス（せん断等）等の環境因子に敏感で、一次構造の変化から変性や凝集といった高次構造変化が起こる。これらは医薬品としての有効性および安全性が損なわれることに繋がる。

こうした背景から、現在のバイオ医薬品の主流であるモノクローナル抗体の安定性は盛んに研究されており、特に、製造や保管、使用を通して避けることができない重要なストレス因子である熱と光に対する劣化傾向や劣化経路については表 2 に記載するように一定の普遍的な理解が進んでいる<sup>19-21</sup>。一方で、近年では抗体と低分子医薬をリンカーを介して結合した抗体薬物複合体（ADC）や二重特異性抗体など、より複雑で多様な構造を有するバイオ医薬品が開発のトレンドとなっている。有効成分の構造が複雑になればなるほど不均一性が増し、複合的な劣化も生じることから、その安定性の評価は難しくなる。

表2 モノクローナル抗体の代表的な化学修飾構造とその要因

アミノ酸	種類	代表的な例	主要因
メチオニン トリプトファン システイン	酸化	 <p>Methionine sulfoxide      Kynureine      Dihydroxytryptophan      Hydroxytryptophan      N-formylkynureine</p>	熱 酸素 光
ヒスチジン	酸化	 <p>Oxidant (+32 Da)      Asparagine      Aspartic acid</p>	光
アスパラギン グルタミン	脱アミド	 <p>Glutamine      Aspartic acid</p>	熱 pH 配列
リジン	糖化	 <p>Lysine      Glucose      Schiff Base      Amadori Adduct      Carboxymethyl-lysine (CML)</p>	熱
N 末端グルタミン酸 N 末端グルタミン	環化		熱
リジン	欠損		酵素
アスパラギン酸 システイン	異性化	 <p>Aspartic acid      Succinimide      Iso-Aspartic acid</p>	熱 pH



#### 1.4 AAV の安定性

モノクローナル抗体のような一定の理解には未だ遠いが、rAAV の遺伝子治療薬としての開発が進むにつれて、その安定性は徐々に解明され始めている。一例として、rAAV カプシド粒子の熱安定性は血清型によって異なることや、カプシドが完全に崩壊しなくともカプシド内 DNA の放出が観測されること、またその放出のしやすさはパッケージされている DNA の長さに依存することなどが熱力学的安定性評価の中で解明されている<sup>22-25</sup>。さらに、Howard らによって、rAAV1 の形質導入効率は 4°C で 7 週間の保存により約 20% 低下することが明らかになっている<sup>26</sup>。また、凍結融解ストレスによってカプシドからの DNA 放出が促進されることや<sup>27</sup>、VP1u の PLA2 ドメインの pH 依存的挙動に関連して、rAAV が血清型によって異なる pH 依存的な熱安定性を持つことも報告されている<sup>28</sup>。

こうした熱安定性に対する知見の蓄積とは対照的に、rAAV の光ストレスに対する安定性の知見は現在のところ非常に限られており、312 nm などの短波長 UV 曝露によって rAAV の生物学的活性が顕著に低下することのみが報告されている<sup>29,30</sup>。こうした UV 曝露は殺菌や不活化に使用される非常に強いストレスであり、治療薬が曝される一般的な環境ストレスとは大きく異なる。治療薬が曝される可能性のある光条件は、実験室での 1000 lx から直射日光での 130,000 lx までの範囲で、最も支配的なスペクトル領域は、紫外線 A (UV A) (320~400 nm) と可視光 (約 400~780 nm) 領域である<sup>31,32</sup>。光ストレスによるタンパク質や DNA の劣化は、自然界でも、制御された環境でも起こることが知られている。しかしながら、一般的な環境ストレスによる rAAV の光安定性は不明であり、カプシドタンパク質やカプシド内 DNA の光劣化、分解については不明である。rAAV はバイオ医薬品として汎用される治療用タンパク質よりもさらに複雑な構造を有しているため、光ストレスによってどの部分にどのような劣化が起きているの

か、またそれらが rAAV の生物学的活性にどのような影響を与えるのか、を明らかにするには、カプシドタンパク質およびカプシド内 DNA、さら rAAV 粒子全体について、それぞれの包括的な品質評価が必要である。以下のセクションではこれまでに知られている、DNA とタンパク質の光劣化についてそれぞれ述べる。

## 1.5 DNA の光劣化

DNA の光劣化は、医薬品の安定性評価としてではなく、皮膚がんの発生原因である DNA 損傷や細胞内の DNA 修復機構の解明といった分子細胞生物学的な興味により長年研究されてきた。図 3 に示すように、これまでに塩基修飾、DNA 鎖切断、架橋、DNA-タンパク質付加物の形成など、さまざまな種類の DNA 損傷が光ストレスによって引き起こされることが報告されている<sup>33,34</sup>。DNA 光劣化の代表的な形態には、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) とピリミジン-ピリミドン (6-4) 光産物がある。いくつかの研究では、CPD は弱い UV である UVA によっても直接誘発される可能性があることが示唆されている<sup>33,35</sup>。このような DNA の損傷は、正常な塩基対形成を破壊し、DNA の複製と転写を妨げる。医薬品としての観点から見ると、こうした DNA の変化は目的タンパク質の発現低下に繋がり有効性を損なう可能性があり、さらに、変異したタンパク質または不完全なタンパク質が発現する場合など、安全性リスクも高まることから、劣化を抑制するための適切な管理が必要となる。

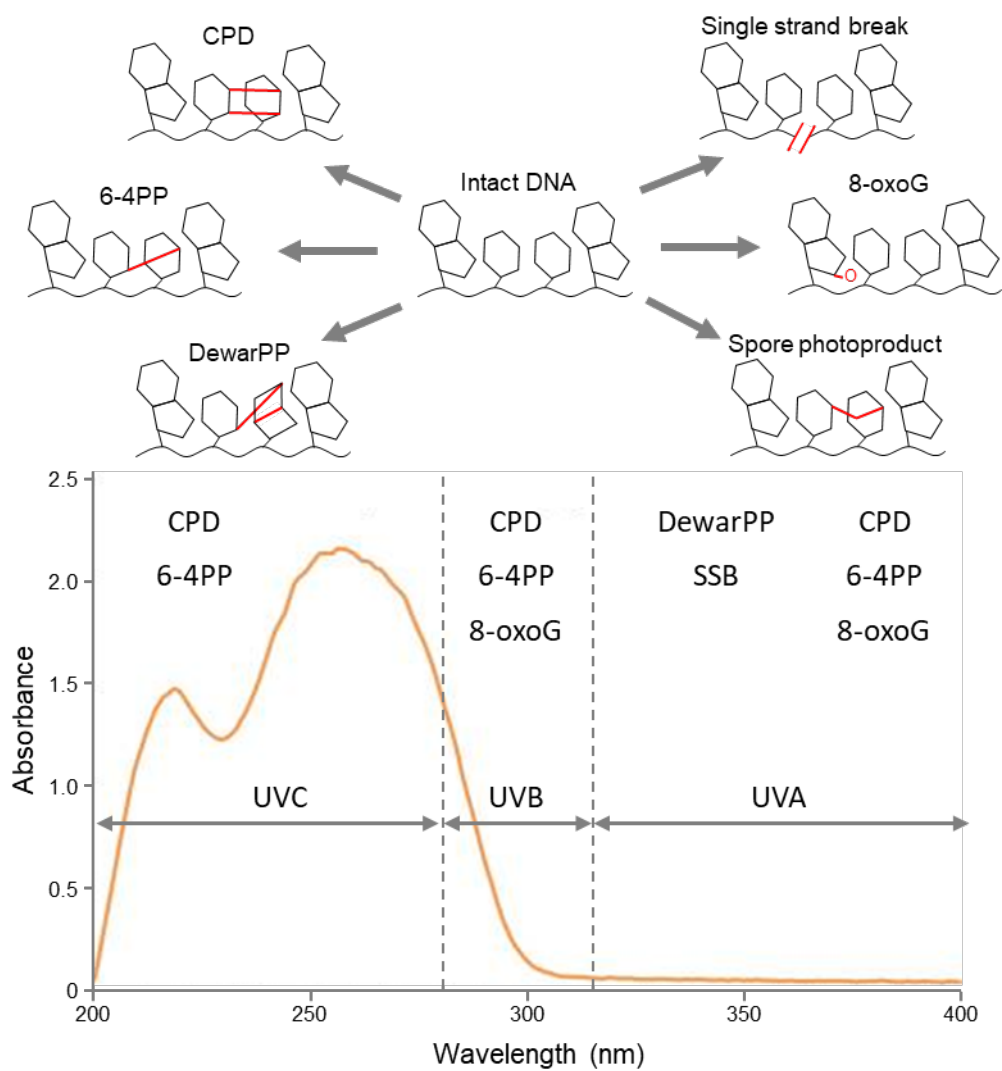


図3 DNAの吸収スペクトルとDNAの代表的な光劣化生成物

参考文献<sup>36</sup>より作成。

CPD：シクロブタンピリミジン二量体、6-4PP：ピリミジン（6-4）ピリミドン  
 光生成物、DewarPP：デュワー型異性体、8-oxoG：8-オキソ-7,8-ジヒドログア  
 ニン、SSB：一本鎖切断、各光劣化物の変異部分を赤字で記載

## 1.6 タンパク質の光劣化

タンパク質は光にさらされると構造的および機能的変化を起こす。様々な形態の光分解がタンパク質の構造変化、凝集、治療効果の喪失につながることを報告されているが<sup>37,38</sup>、最も一般的な光ストレスによって誘発されるのは酸化による一次構造の変化である<sup>39</sup>。光ストレスに対する感受性はタンパク質によって異なり、アミノ酸組成、構造安定性、溶媒環境などの要因が重要な役割を果たしていることが報告されている。なかでも、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、システインのアミノ酸残基の側鎖は、光吸収を持つことが知られており、UV-A より波長が短い UV-C および UV-B 領域の光を吸収する。しかしながら、前述したように一般的な環境下における光の波長は 320 nm 以上であるため、これらのアミノ酸残基の側鎖による光の吸収はほとんど起こらない。にもかかわらず、光ストレスによりこれらのアミノ酸残基の側鎖の酸化が観測されることがあり、活性酸素種を生成する非タンパク質性の光増感剤が、タンパク質修飾の引き金として重要な役割を果たすと考えられている<sup>40,41</sup>。表 2 に記載したとおり、モノクローナル抗体を使用した研究では、メチオニン、ヒスチジン、トリプトファン残基が一般的な光ストレスによって酸化されやすいことが報告されている<sup>39,42</sup>。

## 1.7 本研究の目的と構成

本研究の目的は、遺伝子治療で用いられる 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である。目的達成に向け、強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を GOI として含む rAAV6 を試料として光安定性試験を実施した。生物学的、物理化学的分析手法を適用し光劣化サンプルを分析、比較することで、光ストレスによって rAAV の安全性および有効性が損なわれるか、rAAV を構成するタンパク質および DNA にどのような劣化が生じるか、を明らかにし、rAAV6 の光劣化経路の解明を試みた。

第 2 章では、ICH に規定される光安定性条件に沿った rAAV6 の光安定性試験を実施し、rAAV6 の機能面、構造面の変化を生物学的および物理化学的な手法を用いて評価した。機能面の安定性評価では、生物学的活性として形質導入効率を評価し、光ストレスが rAAV6 の形質導入効率を顕著に低下させることを明らかにした。構造面の安定性評価では、rAAV 粒子、カプシドに内包される DNA、カプシドタンパク質の品質変化を評価した。その結果、DNA およびタンパク質のいずれにおいても既知の典型的な光劣化が発生するだけでなく、rAAV 粒子の凝集体が形成されることが明らかになった。

第 3 章では、rAAV の光劣化経路の解明として、第 2 章で観察された機能面、構造面での光ストレスに伴う変化を考察し、機能の低下につながった構造上の変化を特定した。また、機能の低下および要因となった光劣化が総照度に依存する擬一次反応として回帰可能であることを明らかにし、本研究で用いた rAAV6 の有効性が担保される総照度の閾値を推定した。さらに、特定された生物学的活性の顕著な低下に繋がった主要因が血清型に依存するか否か、を検証した。

第 4 章では、本研究で得られた rAAV の光安定性の知見を踏まえた今後の展望を示し、総括とした。

## 第2章 光ストレスによる品質特性の変化

### 2.1 緒言

一般に医薬品の光や熱に対する安定性を評価する際は一定のストレス環境下に置いた経時検体を複数時点作成し、その CQA の変化を分析する。医薬品の製造販売において管理すべき CQA としては、物理的、化学的、生物学的、微生物学的な品質特性があるが、安定性評価において特に重視されるのは、有効成分である目的物質の品質変化である。具体的には、生物学的な品質特性である「機能」の変化と、物理化学的な品質特性である「目的物質の構造」の変化である。本章では、ICH Q1B に規定される光安定性条件に沿った rAAV6 の光安定性試験を実施し、光劣化サンプルを得た後、それらの機能と構造の変化を生物学的、物理化学的手法を用いて分析した。

rAAV の品質管理において機能評価に相当する生物活性は、作用機序におけるどのステップまでを確認するか、によって異なる。具体的には、rAAV の細胞への感染確認から、mRNA の転写や目的タンパク質の発現確認、目的タンパク質が期待する機能を発揮するか、まで多岐にわたる評価手法があり、後者の評価ほど頑健な分析法を構築する難易度が高くなる。本研究では EGFP を GOI として含む rAAV6 を使用し、AAV が細胞に遺伝子を導入し、目的タンパク質を発現させる能力を評価した。

評価対象が複雑な構造を有する場合、全体の構成を評価する分析と個々の構成要素の分析を行うことが多い。例えば、ADC の場合、全体の構成を評価するために薬物－抗体結合比率の分析を行い、個々の構成要素として抗体および薬物それぞれの純度等を評価する。rAAV についても同様に、その構造を考慮し、全体の構成評価として rAAV 粒子の評価を行い、個々の構成要素の評価としてカプシド内 DNA およびカプシドタンパク質の評価をそれぞれ行うことで、包括

的な品質評価が可能であると考えた。rAAV 粒子の評価として、バンド沈降超遠心分析法 (BS-AUC) による分散評価およびドロップレット型デジタル PCR (ddPCR) を用いたゲノム力価評価を実施した。カプシド内 DNA の評価として、キャピラリー電気泳動 (CE-LIF) を用いた純度評価を実施した。カプシドタンパク質の評価として、キャピラリーゲル電気泳動 (CE-SDS) を用いた純度評価および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による翻訳後修飾解析を行った。また、それぞれの分析中に得られた結果に基づき、粒子評価においては動的光散乱 (DLS)、DNA 評価においては遊離 DNA アッセイおよび CPD 酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)、カプシドタンパク質評価においては Intact MS を追加解析としてそれぞれ実施した。



## 2.2 実験材料および実験手法

### 2.2.1 材料

目的遺伝子として強緑色蛍光タンパク質（Enhanced Green Fluorescent Protein、GFP）を持つ組換え型 AAV6 (rAAV6) は、SignaGen から購入した。処方は 0.005% PF-68 添加リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffer saline、PBS）であり、製造元によってリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応法（qPCR）で決定された濃度は  $1.11 \times 10^{13}$  vg/mL であった。

### 2.2.2 光劣化サンプルの作成

光劣化サンプルの調製は ICH Q1B 「新原薬及び新製剤の光安定性試験ガイドライン」に規定される条件に沿って行った。本ガイドラインには医薬品の曝光に伴う変化を評価する標準的なパッケージが記載されており、医薬品が一般的に曝される光条件を模するため、単一光源または複数光源の組み合わせによる 320 nm 以上のスペクトル分布の光を照射することが求められている。本研究においては ISO10977 に規定されている屋外の昼光の国際的標準である D65 スペクトルを模した D65 常用光源を使用した。（スペクトル分布：図 4）

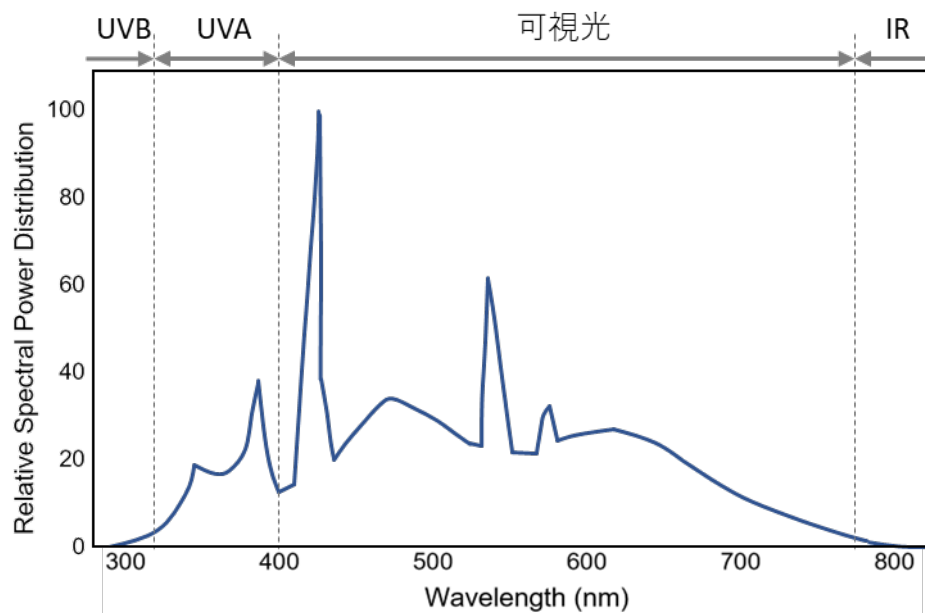


図 4 使用した D65 光源のスペクトル分布

メーカー (NAGANO SCIENCE) 提供スペクトルから作成

rAAV6 300  $\mu$ L を 2 mL の環状オレフィンポリマー製バイアル (DAIKYO) に分注し、ゴム製ストッパー (DAIKYO) を使用して密封した。バイアルは 25°C、60%相対湿度に設定した光安定性試験機 (NAGANO SCIENCE) に静置し、D65 ランプを光源とする 4000 lx の光に 2、4、7 日間曝光し、光ストレスを与えた。保管中の熱ストレスの影響と区別するため、ダークコントロールサンプル (非照射サンプル、DC) を同チャンバー内に紙箱遮光下で 7 日間静置した。各サンプルは、光安定性試験機から取り出した後にポリプロピレンチューブに分注し、測定まで-80°C の冷蔵庫で保存した。コントロールサンプル (非劣化サンプル、CTRL) は、同一溶液からポリプロピレンチューブに分注し、測定まで-80°C の冷凍庫で保存した。

### 2.2.3 *In vivo* トランスダクションアッセイ

形質導入を行うにあたり、まず適切な感染多重度 (Multiplicity of Infection, MOI = virus/cell) を検証した。HeLa RC32 細胞 (ATCC) を 12 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  cell/500  $\mu$ L で播種し、1 日培養した。DMEM (Sigma Aldrich) 培地に 10% の胎児牛血清 (FBS, ATCC) を添加した完全培地を用いて MOI が  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  になるように rAAV6 を希釈し、500  $\mu$ L を培地を除去した細胞に添加した。4 時間後に 500  $\mu$ L の完全培地をウェルに添加した。2 日後に細胞を回収し、GFP の発現を CytoFlex™ II Flow Cytometer (Beckman Coulter) を用いて測定した。MOI の最適化は、コントロールサンプルの用量反応曲線に基づいて実施した。光ストレスが rAAV の形質導入効率へ与える影響を評価するため、最大の感度が得られるプラトーに至る直前の  $5 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  を本評価の MOI として採用した (図 5)。

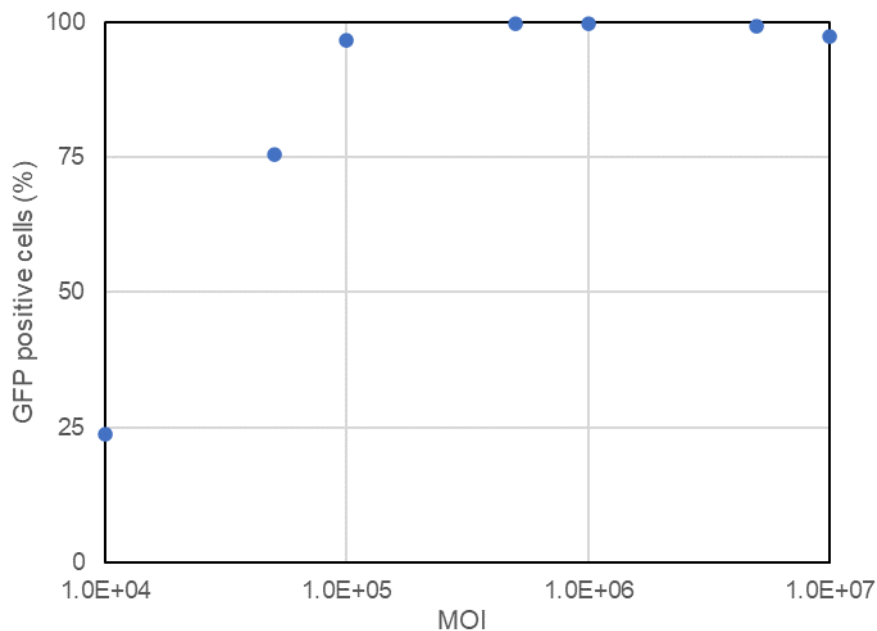


図 5 コントロールサンプルの用量反応曲線

#### 2.2.4 バンド沈降超遠心分析法 (BS-AUC)

BS-AUC は、参考論文<sup>43</sup>のプロトコルに従って実施した。15  $\mu\text{L}$  のサンプルおよび溶媒をサファイアウィンドウを備えた 12-mm バンド形成センターピースのサンプルまたはリファレンスリザーバーウェルにロードした。0.001 w/v % P-188 を含む 240  $\mu\text{L}$  または 250  $\mu\text{L}$  の PBS/D<sub>2</sub>O をそれぞれサンプルまたはリファレンスセクターに充填した。UV 検出器を備えた Optima AUC (Beckman Coulter) を用いて、20°C、20000 rpm で 150 秒ごとに 10  $\mu\text{m}$  の半径増分でデータを取得した。 $s$  値は 0~175 S の範囲を分解能 350 で評価し、緩衝液密度と PBS/ D<sub>2</sub>O の粘度はプログラム SEDNTERP を用いて計算した。沈降係数分布プロファイル( $c(s)$  分布)の図は、プログラム GUSI (バージョン 1.3.2) を用いて作成した。沈降係数である  $s$  値は  $s_w$  (実験条件下での見かけの値としての重量平均沈降係数) として記述した。各 EP および FP の粒子濃度は、吸光係数を用いて各ピーク面積から計算した。参考文献<sup>44</sup>に従って EP および FP に対して異なる吸光係数を適用した。

#### 2.2.5 ドロップレットデジタル PCR (ddPCR)

rAAV サンプルのゲノム濃度を Auto-DG system (Bio-Rad) および QX200 ddPCR system (Bio-Rad) を用いた ddPCR 法により定量した。rAAV サンプルに DNase I (Takara) を添加し 37°C で 30 分間インキュベートすることでカプシド外 DNA を消化した。最終濃度 50 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA、Nacalai) で消化反応を停止した後、95°C 10 分間の加熱処理によりカプシドを変性させた。カプシドから放出された DNA を適切に希釈した後、以下のプライマーおよびプローブ (Takara) と混合した。

プライマーおよびプローブの配列 (5'→3') :

CMVp-フォワードプライマー: CATCAATGGGCGTGGATAGC

CMVp-リバースプライマー: GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA

CMVp-プローブ: [FAM] ATTTCCAAGTCTCCACCC [BHQ1]

Auto-DG system を用いてドロップレットを生成し、PCR 反応を行った。95°C の初期変性後、60°C 1 分間のアニーリングと 95°C 30 秒間の変性を 40 サイクル行い、各ドロップレットの蛍光を測定した。ddPCR に必要なその他の試薬および材料はすべて Bio-Rad から購入した。

#### 2.2.6 キャピラリー電気泳動ーレーザー励起蛍光検出法 (CE-LIF)

ddPCR 法により決定されたコントロールサンプルのゲノム濃度に基づいて約  $5 \times 10^{10}$  vg の rAAV サンプルを CE-LIF 分析に供した。カプシド内の DNA を分析するため、ベンゾナーゼ (Merck) で 37°C で 30 分間処理し、カプシド外の DNA を消化した。最終濃度 50 mM の EDTA で消化反応を停止し、カプシドタンパク質をプロテイナーゼ K により 55°C で 1 時間消化した後、95°C で 20 分間加熱した。これを QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) を用いて精製し、30  $\mu$ L のヌクレアーゼフリー水 (Thermo Fisher Scientific) で溶出した。溶出したカプシド内 DNA 精製溶液 20  $\mu$ L と 20  $\mu$ L のサンプルローディング溶液 (Sciex) を混合し、70°C で 5 分間加熱後、すぐに氷上で 2 分間冷却し、これを CE-LIF 測定溶液とした。CE-LIF 測定は、PA800Plus システム (Sciex) を用いて実施した。測定には RNA9000 Purity and Integrity kit (Sciex) に含まれる分離ゲル、SYBR Green II RNA gel stain、洗浄バッファーを用いた。測定は参照プロトコル<sup>45</sup>に軽微な変更を加えて実施した。感度を高めるために、注入設定は 5.0 kV で 15 秒に変更した。DNA に結合した SYBR Green II の蛍光シグナルは、488 nm の励起および 520 nm の放出で LIF 検出器によって検出した。ピーク面積は、式 1 を用いてノーマ

ライズした。

$$\text{CPA} = \text{Ld} \times \text{PA} \div \text{MT} \quad (\text{式 1})$$

CPA : 修正ピーク面積

Ld : 検出器までの長さ

PA : ピーク面積 (未正規化)

MT : 移動時間

### 2.2.7 遊離 DNA アッセイ

遊離 DNA アッセイは、最近報告された文献<sup>46</sup>のプロトコルに従った。rAAV サンプルを 1×SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific) を含む調製バッファーと混合し、495 nm 励起/530 nm 発光フィルターを用いて蛍光を測定した。遊離 DNA (%) は、85 °C で 20 分間加熱しカプシドを破壊したサンプルの DNA 含有量を 100% として算出した。

### 2.2.8 CPD 酵素結合免疫吸着測定 (CPD ELISA)

CPD ELISA は、高感度紫外線誘発 DNA 損傷 CPD 測定キット (COSMO BIO) を用いて測定した。2.2.6 に記載した CE-LIF のサンプル調製に沿って  $2.7 \times 10^{10}$  vg の rAAV サンプルからカプシド内 DNA を精製し、キットに含まれる 10×Assay Diluent を加え、ELISA サンプルとした。

### 2.2.9 SDS キャピラリーゲル電気泳動 (CE-SDS)

rAAV サンプルの CE-SDS 測定は、タンパク質として 600 ng に相当する rAAV6 を使用し、参考文献<sup>47</sup>のプロトコルに従ってサンプルの変性処理およびバッファー交換を行った。回収したサンプル溶液に超純水を加え 55 µL にし、これを

CE-SDS サンプル溶液とした。CE-SDS 測定は、PA800Plus システム (Sciex) を用いて行った。サンプルはフォトダイオードアレイ検出器を用いて 214 nm で検出した。ピーク面積は CE-LIF と同様、式 1 を用いてノーマライズした。

#### 2.2.10 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) による VP 分析 (Intact MS)

VP の全長の質量を測定するため、rAAV サンプルを、質量分析装置 (Exploris 240, Thermo Fisher Scientific) が接続された HPLC (Nexera X2, Shimadzu) を用いて分析した。サンプルの分離は ACQUITY UPLC PrST C4 カラム (300 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm, Waters) により、流速 0.2 mL/min、80°C にて実施した。移動相 A および移動相 B として、0.1%ジフルオロ酢酸 (DFA, Waters) /5%ジメチルスルホキシド (DMSO) /水、0.1%DFA/5%DMSO/アセトニトリル (FUJIFILM Wako Chemicals) をそれぞれ使用した。VP の分離は移動相 B : 30-34%、15 分間のグラジエントで実施した。質量分析計は脱溶媒 350°C、質量範囲 800~2800、で測定した。デコンボリューション分析は、BioPharma Finder ver.4.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

#### 2.2.11 SDS-PAGE

rAAV サンプルを最終濃度 20 ng/µL になるように 4×LDS サンプルバッファー (Thermo Fisher Scientific) および 10×還元剤 (Thermo Fisher Scientific)、水と混合し、70°C で 10 分間加熱した。サンプル溶液および質量マーカー (BenchMark™ Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) を、4%–12%の Bis-Tris ゲル (Thermo Fisher Scientific) にロードし、1×MOPS バッファー (Thermo Fisher Scientific) で 200 V で 5 分間、150 V で 50 分間電気泳動した。得られたゲルを Imperial dye (Thermo

Fisher Scientific) を使用して染色した。

#### 2.2.12 液体クロマトグラフィー質量分析法によるペプチドマッピング

VP の一次構造変化を評価するため、rAAV サンプルのペプチドマッピングを参考文献<sup>48</sup>のプロトコルに軽微な修正を加え実施した。約 3 µg の rAAV タンパク質と、SMART Digest Pepsin Kits (Thermo Fisher Scientific) に付属のペプシン SMART Digest buffer (pH 2) を 2:1 (v/v) で混合した。トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (FUJIFILM Wako Chemicals) を最終濃度 12 mM になるよう添加した溶液に Magnetic SMART digest resin 10 µL を添加し、1400 rpm、70°C で 45 分間ペプシン消化を行った。消化後、磁気スタンドを用いて上清を回収した。最終濃度 0.1% のギ酸を加え、これを LC-MS で分析した。50 µL のサンプル溶液を、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (130 Å, 1.7 µm, 1 mm × 100 mm, Waters) に供し、逆相高性能液体クロマトグラフィー (Nexera X2, Shimadzu) にてペプチド断片を分離し、質量分析装置 (Exploris 240, Thermo Fisher Scientific) にて質量を測定した。データ分析は、BioPharma Finder (ver 4.1, Thermo Fisher Scientific) を用いた。ペプチドの同定は、MS および MS/MS の許容範囲を 5 ppm として AAV6 VP1 アミノ酸配列に対して行った。修飾率は、式 2 を用いて、最も量が豊富なシグナルに対するペプチド (>17%) と、最も豊富な電荷状態シグナルに対する電荷状態 (>33%) の強度閾値以上のイオンを用いて、計算した。

修飾率 = (修飾成分の抽出イオンクロマトグラムにおけるピーク面積の合計)/(全成分の MS 面積の合計)×100 (式 2)



## 2.3 結果

### 2.3.1 生物学的活性評価

光劣化サンプルの形質導入効率を GFP 発現から評価した結果を図 6 に示す。コントロールサンプルの形質導入効率を 100%としたとき、ダークコントロールサンプルは MOI :  $5 \times 10^4$  で 85.6%、MOI :  $1 \times 10^5$  で 92.4%の相対活性を示した。一方、rAAV6 の形質導入効率は光曝露に伴って劇的に低下した。先行研究では苛烈な UV 照射 1 時点での評価で形質導入効率がほとんど消失していたが、本研究では時間および用量依存的な光劣化に関する結果を得ることが出来た。

光ストレスを受けた rAAV6 はコントロールサンプルと比較して 2 日後 (192,000 lx・hr 照射) には MOI :  $5 \times 10^4$  で 59.9%、MOI :  $1 \times 10^5$  で 67.6%、4 日後 (384,000 lx・hr 照射) には MOI :  $5 \times 10^4$  で 23.2%、MOI :  $1 \times 10^5$  で 31.2% にまで、細胞への GFP 発現の導入率が低下していた。7 日間光ストレス (672,000 lx・hr 照射) を受けた rAAV6 はコントロールサンプルと比較して MOI :  $5 \times 10^4$  で 8.2%、MOI :  $1 \times 10^5$  で 11.2%の細胞にしか GFP 発現を導入しなかった。

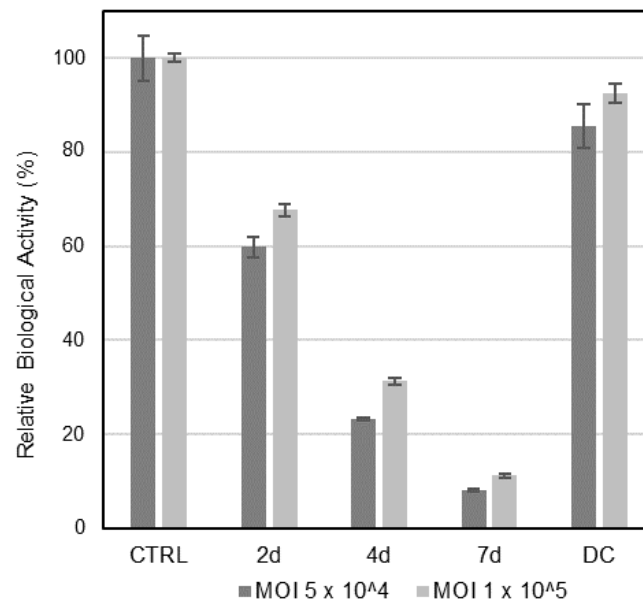


図 6 rAAV6 の形質導入効率の変化

各 MOI で rAAV サンプルを細胞に感染させた際のコントロールサンプル (CTRL) に対する相対的な形質導入効率を示した。n=3、エラーバー：三重測定標準偏差

### 2.3.2 rAAV 粒子の評価

前述のように特定のストレス条件下で rAAV のカプシドから DNA が排出されることが報告されている<sup>27</sup>。AUC は、粒子のサイズ、密度、および形状に基づく沈降係数で測定対象を分離するため、AAV 分析においては完全粒子 (Full particle、FP)、空粒子 (Empty particle、EP)、部分粒子 (Partial particle、PP) を分離・定量できる、強力なツールである<sup>44</sup>。本研究においては AAV 分析におけるサンプル量の制限という課題に対処するため、従来の沈降速度 AUC と比較してより少量のサンプルで測定可能な BS-AUC 法を採用した<sup>43</sup>。

光ストレスを受けた rAAV6 サンプルから BS-AUC 法を用いて得られた沈降係数分布プロファイル ( $c(s)$  分布) を図 7 に示した。これ以降、本研究では沈降係数 98S および 69S の粒子をそれぞれ見かけ上の FP ( $FP_{app}$ ) および EP ( $EP_{app}$ ) と記載する。図 8 に定量結果を示した。図 8A に示すように、 $FP_{app}$ 、 $EP_{app}$ 、および断片や凝集物などのその他成分はコントロールサンプルでそれぞれ 65.4%、7.0%、27.6%であった。コントロールサンプルおよびダークコントロールサンプルと 7 日間光ストレスを与えたサンプルの間で、分散状態に明らかな変化は見られず、光ストレスに伴うその他成分の明確な変化傾向は観察されなかった。さらに、得られた  $FP_{app}$ 、 $EP_{app}$  のピーク面積とそれぞれの吸光係数から算出した粒子数での評価を行った結果、F/E 比 (図 8B) は、7 日間光曝露後、 $FP_{app}$  が約 2.5% 減少していた。F/E 比の変動の小ささとは対照的に、230 nm の吸光度での総ピーク面積は有意な減少が見られた (図 8C)。興味深いことに、この減少は  $FP_{app}$  粒子濃度の減少傾向 (7 日間で-18.5%) と良好に相関していた。一方で、 $EP_{app}$  の粒子数に明確な変化は認められなかった (図 8D)。

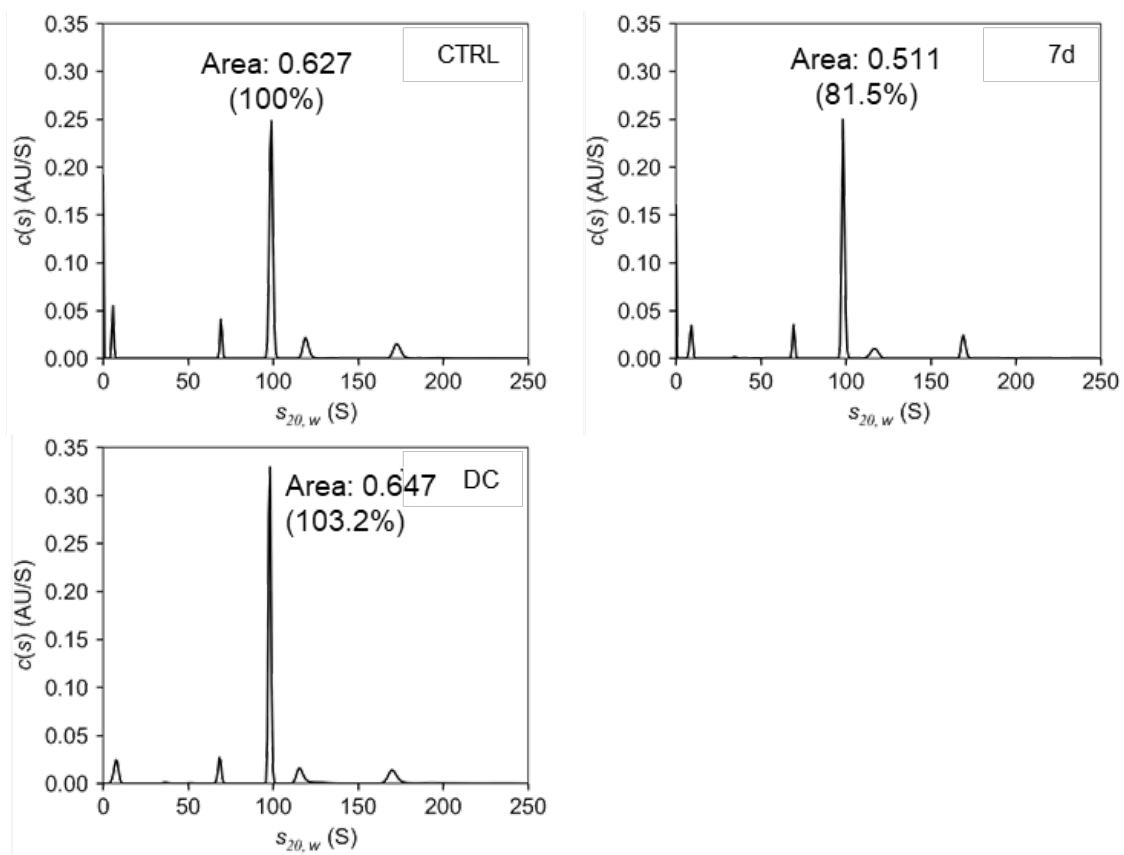


図7 沈降係数分布プロファイル

BS-AUC 法を用いて rAAV6 の光ストレスに伴う粒子状態の変化を分析した。

FP<sub>app</sub> のピーク面積と対照試料に対する相対的割合を図中に記載した。CTRL : コントロールサンプル、7d : 7日間光劣化サンプル、DC : ダークコントロールサンプル

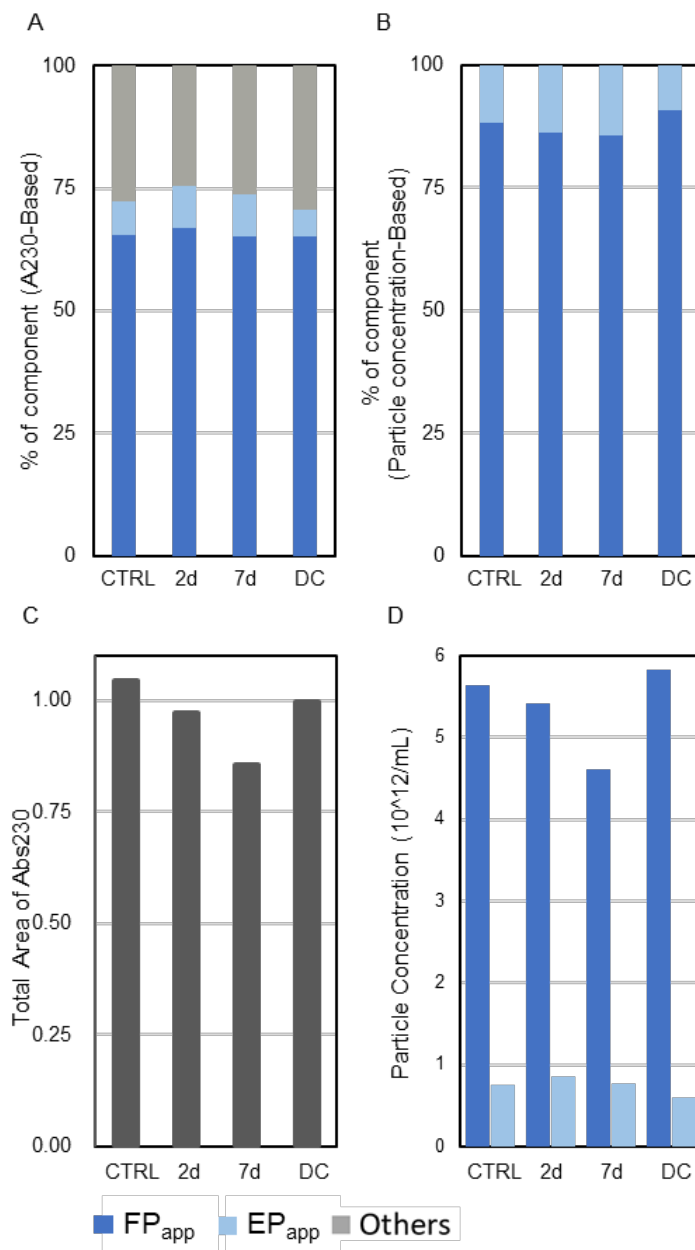


図8 AUCを用いたrAAV6の粒子プロファイル評価

全成分の存在比 (A) および総ピーク面積 (C) は、230 nm での吸光度に基づいて算出した。EP および FP の粒子数としての存在比率 (B) と粒子濃度 (D) は各ピーク面積と吸光係数から算出した。CTRL：コントロールサンプル、DC：ダークコントロールサンプル、FP<sub>app</sub>：見かけの完全粒子、EP<sub>app</sub>：見かけの空粒子、n=1

BS-AUC の結果では断片体の増加が見られなかったことから、失われた  $FP_{app}$  の行方を検証するため、動的光散乱 (DLS) 分析を行った。その結果、図 9 に示すように BS-AUC では観察されなかった大きな凝集体の増加が明らかになった。ダークコントロールサンプルの BS-AUC および DLS ではコントロールサンプルから変化が確認されなかった。これらの結果から BS-AUC における総ピーク面積の減少は  $FP_{app}$  の減少に起因しており、 $FP_{app}$  は光ストレスに伴い DNA を放出することなく凝集する傾向が示唆された。

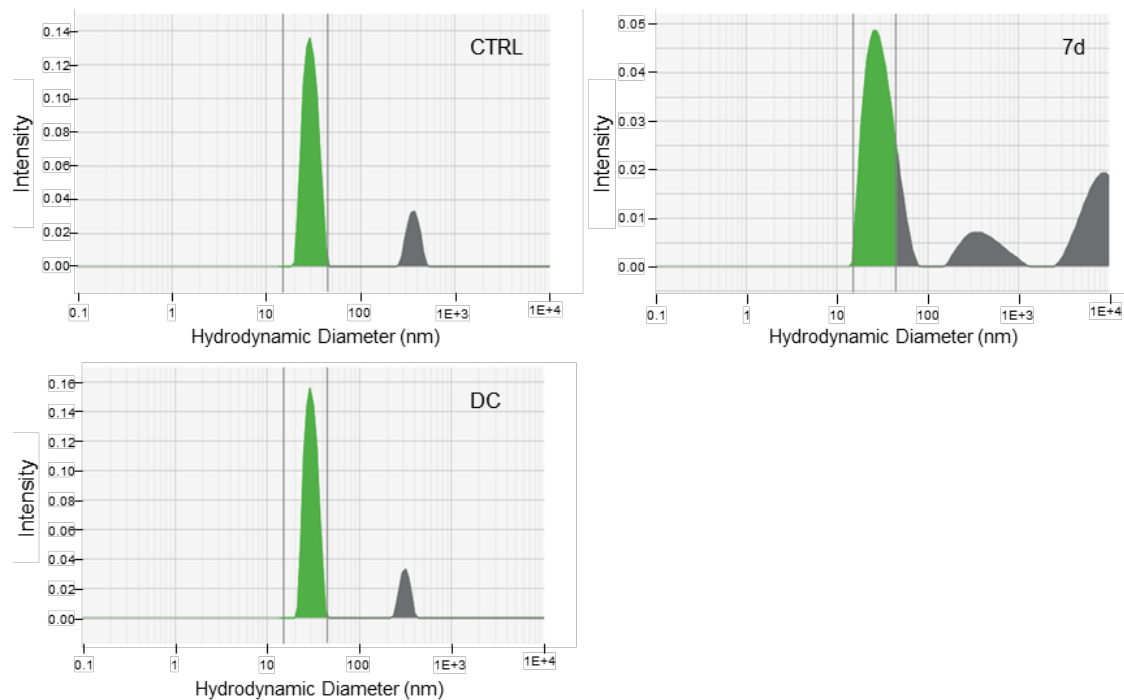


図 9 DLS を用いた粒子サイズ分析

コントロールサンプル (CTRL) およびダークコントロールサンプル (DC) と比較すると、7 日間光ストレスを受けたサンプル (7d) では、1000 nm を超える大きな凝集体と 25-30 nm 付近の AAV モノマーピークの強度低下とブロード化が観察された。縦太線：15 nm – 45 nm、 $n=1$

### 2.3.3 ddPCR によるゲノム濃度の決定

rAAV の「濃度」は、ddPCR、qPCR、ELISA、AUC など、原理の異なる複数の方法により測定することが可能であるが、その測定方法によって何を表す濃度なのか、意味合いが異なる<sup>49-51</sup>。BS-AUC で観察された粒子濃度の減少を測定原理が異なる他の手法により検証するため、ddPCR を用いてゲノム濃度を測定した（図 10）。ddPCR によるゲノム濃度は BS-AUC の結果と同様に光ストレスに伴って減少する傾向を示した。しかし、ゲノム濃度の減少（7 日間で-57.4%）は、BS-AUC から推定された粒子濃度の減少よりも顕著であった。なお、コントロールおよびダークコントロールサンプル間でゲノム濃度に有意な差は観察されなかった。

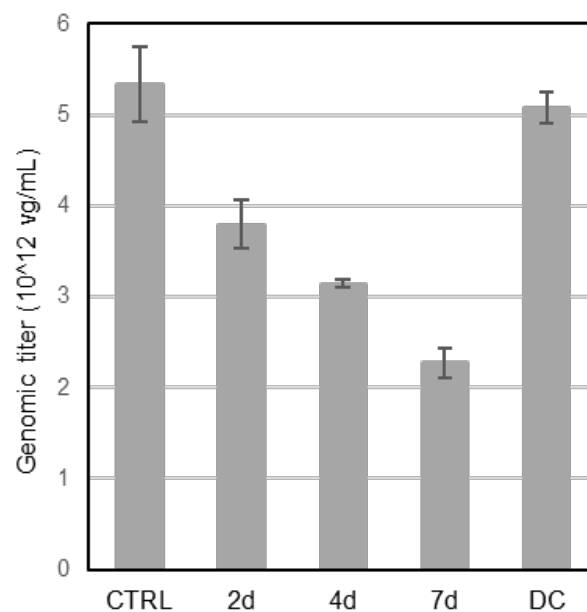


図 10 ddPCR による rAAV6 のゲノム力価評価

CTRL：コントロールサンプル、DC：ダークコントロールサンプル

n=3、エラーバー：三重測定の標準偏差

#### 2.3.4 カプシド内 DNA の光安定性評価

BS-AUC で観察された  $FP_{app}$  粒子数の減少と ddPCR で観察されたゲノム濃度の低下の差異から、カプシド内 DNA の劣化が示唆された。そこで、CE-LIF 分析を実施し、カプシド内の DNA にどのような劣化が発生したか、検証した。結果を図 11 および図 12 A に示した。カプシド内 DNA のエレクトロフェログラムは光ストレスにより顕著な変化を示した。主ピークの補正面積 (corrected peak area、CPA) は、7 日間の光曝露で 74.0%減少したが、総 CPA は 19.0%の減少でより穏やかな変化だった。また、12~13 分の移動時間に検出されたピークは 7 日間の光曝露で 68.3%減少しており、主ピークの挙動と同様であった。特定の断片の増加は観察されなかった。光ストレスを受けたサンプルでは、主ピーク右側のベースラインの盛り上がりが見られ、主ピークの減少に伴って増加していた。観察された総 CPA における 19.0%の減少は、 $FP_{app}$  の 18.6%の減少を示した BS-AUC の結果と一致していた。なお、コントロールおよびダークコントロールサンプル間で総 CPA に有意な差は観察されなかった。さらに、カプシド外 DNA を含む溶液中の総 DNA の評価として、ベンゾナーゼ処理を行わずサンプルを分析した。その結果、ベンゾナーゼ処理を行わないサンプルにおいても 7 日間の光曝露後に主ピークの CPA が 69.5%減少し、ベンゾナーゼ処理を行ったサンプルで得られた 74.0%と同様の結果が得られた (図 S1)。

さらに、カプシドから DNA が放出されているか否か、を検証するため、遊離 DNA アッセイを実施した (図 12B)。7 日間の光曝露後に遊離 DNA は約 4%しか増加せず、 $EP_{app}$  の増加が見られなかった BS-AUC の結果と一致した。DNA の代表的な光劣化パターンであるピリミジン二量体の形成有無を CPD ELISA を用いて確認した。その結果、CPD 形成が光ストレスによって進行したことが明らかになった (図 12E)。



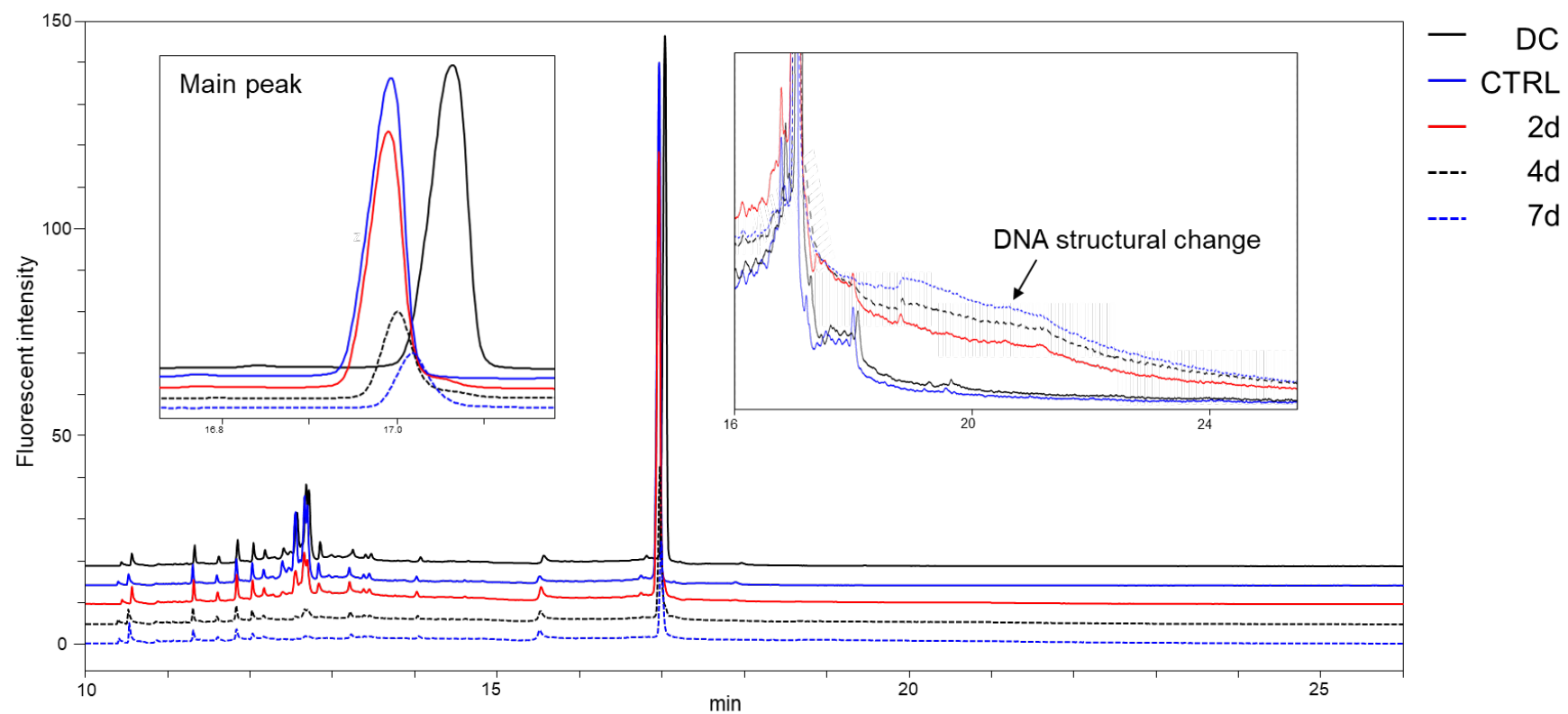


図 11 CE-LIF によるカプシド内 DNA の純度評価

挿入図：主ピーク（左）および主ピーク後のプロファイル変化（右）

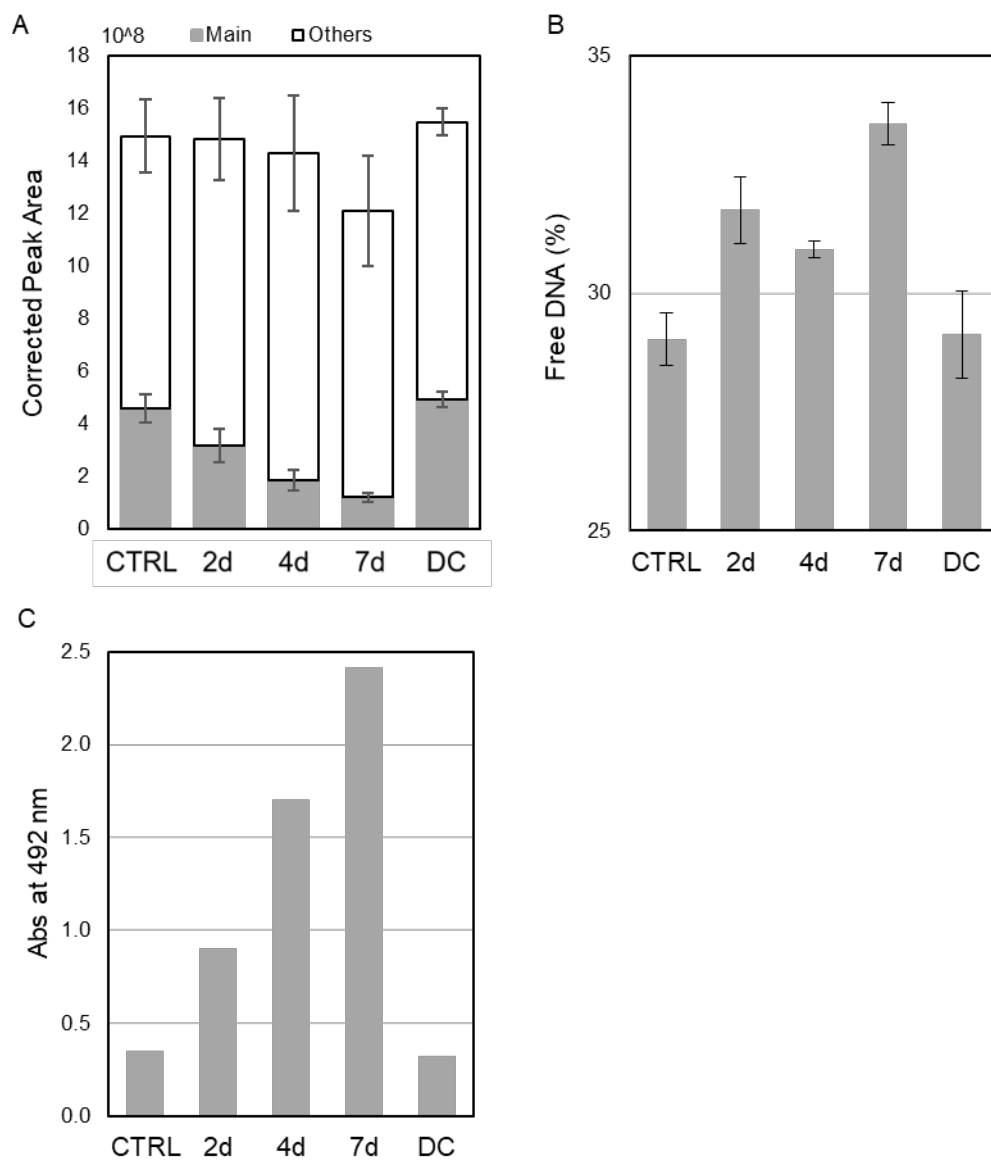


図 12 光ストレスに伴うカプシド内 DNA の変化

A) CE-LIF における CPA の変化、n=3

B) 遊離 DNA アッセイ結果、n=3

C) CPD ELISA 結果、n=1

エラーバー：三重測定標準偏差

### 2.3.5 カプシドタンパク質の光安定性評価

DNA の他に、rAAV の重要な構成要素として VP1、VP2、および VP3 からなるカプシドがある。光ストレスに対する AAV のタンパク質部分の安定性を検証するため、VP の劣化を CE-SDS および LC-MS を用いたペプチドマップ（2.3.6 に記載）により分析した。

CE-SDS の結果を図 13 に示す。光劣化サンプルにおいて、VP の構成比に変化が観察された（図 13A）。VP1 および VP3 と VP2 の間のピーク（以降、VP<sub>x</sub> とする）の CPA% は減少したが、高分子量種（HMWS）の CPA% は光曝露に伴い増加した（図 13B–D）。他のピークの光ストレスに伴う変化は認められなかった。総 CPA は 7 日間の光曝露後に 22.4% 減少しており（図 13E）、これは BS-AUC および CE-LIF で観察された減少と同様であった。なお、コントロールおよびダークコントロールサンプル間で総 CPA に有意な差は観察されなかった。

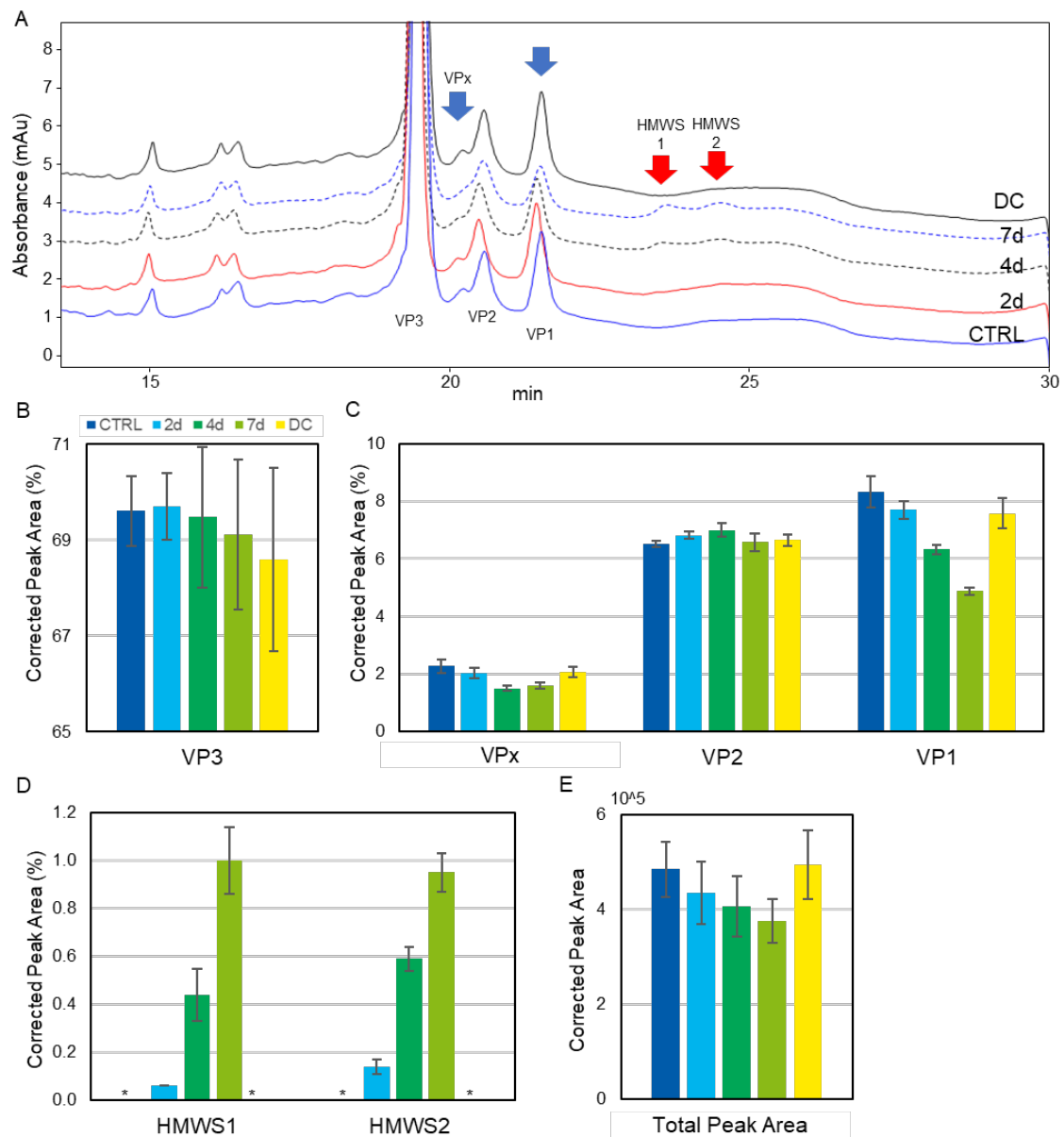


図 13 CE-SDS による VP プロファイルの変化

A) エレクトロフェログラム重ね書き、  
赤矢印：増加ピーク、青矢印：減少ピーク

B-D) 各ピーク CPA(%)の光劣化に伴う変化

E) 総 CPA の光劣化に伴う変化

青：CTRL、水色：2 日間光劣化サンプル、緑：4 日間光劣化サンプル、黄緑：7 日間光劣化サンプル、黄色：DC、n=3、エラーバー：三重測定標準偏差

観察された VPx と HMWS の詳細を明らかにするため、LC-MS による Intact MS を実施した。その結果、VP1~3 および既知の VP 変異体<sup>52</sup>が確認された（表 3 および図 S2）。各種 VP のデコンボリューション結果では+97 Da のピーク系列が観察された。コントロールサンプルと 7 日間光ストレスを受けたサンプルの MS データの比較により、7 日間の光ストレスによって減少するピークとして 61290.75 の質量をもつ成分が同定された。VP3（59518.07）と VP2（66094.93）の間の質量であり、挙動も同様であることから CE-SDS で確認された VPx であると考えられた。ペプチドは酸性条件下で DP または DG 配列において切断されることが報告されており、AAV においても同様の切断が起こることが報告されている<sup>53,54</sup>。rAAV6 のアミノ酸配列に基づいて算出した分子量と実測の質量の比較から、VPx は VP1/2 領域の D/P 配列で切断された P185-L736（分子量：61291.18 Da）であることが示唆された。CE-SDS で増加が観察された HMWS は Intact MS 分析では検出されなかったが、SDS-PAGE においては HMWS のバンドが確認された。この HMWS のバンドは他の血清型（AAV2 および AAV9）でも確認された（図 S3）。光照射に伴う VP と DNA の共有結合形成の可能性が想定されたことから、SDS-PAGE のゲルを蛍光色素で染色したところ、観察された HMWS バンドは、DNA を蛍光染色する SYBR Gold では蛍光を示さなかった。これは検出された HMWS が VP から形成されており、DNA と共有結合性のクロスリンクを有しないことを示している。

表 3 LC-MS で検出されたデコンボリューションされた質量リスト

	Predicted amino acid sequence	Actual amino acid sequence	Theoretical mass (Da)	Control sample		7-day light-stressed sample	
				Measured mass (Da)	Mass accuracy (ppm)	Measured mass (Da)	Mass accuracy (ppm)
VP1	M1-L736	A2(Ac)-L736	81322.18	81321.40	−9.6	81322.35	2.1
VP2	T138-L736	A139-L736	66095.41	66094.90	−7.7	66095.10	−4.7
VP2 variant	P185-L736	P185-L736	61291.18	61290.20	−16.0	N.D.	N.D.
VP3	M203-L736	A204(Ac)-L736	59519.10	59518.07	−17.3	59517.74	−22.8
VP3 variant	M211-L736	A212(Ac)-L736	58890.40	58889.19	−20.5	58888.87	−26.0
VP3 fragment	M203-D626	A204(Ac)-D626	47176.23	47176.10	−2.8	47175.66	−12.1
VP3 fragment	M203-D590	A204(Ac)-D590	43221.69	43221.16	−12.3	43220.82	−20.1

N.D: not detected

### 2.3.6 光ストレスによるカプシドタンパク質の翻訳後修飾

ペプシン消化ペプチドマッピングを用いて光ストレスによる翻訳後修飾 (PTM) を評価した。9 種類の治療用タンパク質について光劣化に伴う PTM を報告した参照研究<sup>39</sup>と同様に、AAV6 でも酸化が確認された。具体的には AAV6 の 14 のメチオニン残基のうち 7 つで酸化が観察され、そのうち 3 つは光曝露依存的に増加した (図 14A)。検出された酸化レベルはメチオニン残基間で異なった。M372 および M403 での酸化レベルは光ストレス下で有意に上昇し、ダークコントロールサンプルでは安定していた。M559 も同様の傾向を示したが、増加はやや控えめだった。酸化が増加した残基はカプシドの内外表面に位置しており、他のメチオニン残基は構造内に埋もれていた (図 14B)。ヒスチジンの酸化については 16 残基のうち H628 と H630 のみが酸化され、7 日間の光ストレスに伴って酸化レベルが増加した (図 15A)。興味深いことに、ヒスチジン残基は酸化の有無に関わらずカプシドの内外の表面に位置していることから (図 15B)、カプシド外側表面への露出が酸化を左右していないことが示唆された。H628 と H630 の酸化には酸化 (+16 Da) および 2 重酸化 (+32 Da) が認められた。トリプトファン残基の酸化も検出されたが、酸化レベルはメチオニンおよびヒスチジン残基に比べて相対的に低く、光曝露の影響は不明瞭であった (図 S4)。

N57 は、VP1 の触媒ホスホリパーゼ A2 ドメイン (PLA2) に位置するため、脱アミド化によって AAV の有効性を低下させることが報告されている<sup>15,55,56</sup>。脱アミド化は熱ストレスによって進行することが知られている。光ストレスを受けた rAAV6 では N57 での脱アミド化が増加したが、ダークコントロールサンプルにおいても同様に N57 の脱アミド化がみられたことから、脱アミドは光ストレスに伴って起こった現象では無く 25°C での保存によるものと推察された。

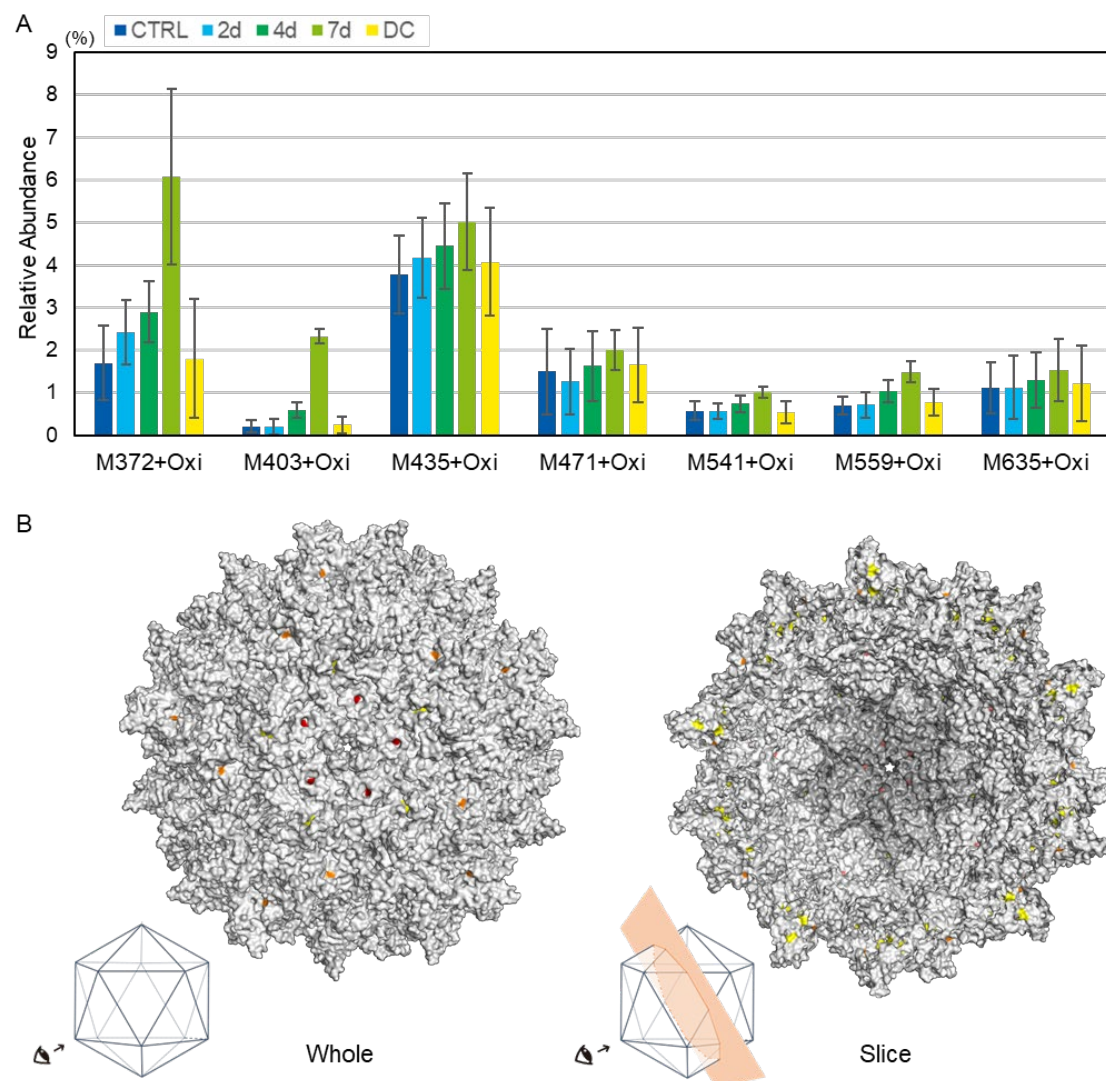


図 14 光ストレスによるメチオニン残基の酸化

A) 光劣化に伴い酸化が 1.0%を超えたメチオニン残基を示した。

青 : CTRL、水色 : 2 日間光劣化サンプル、緑 : 4 日間光劣化サンプル、黄緑 : 7 日間光劣化サンプル、黄色 : DC、n=3、エラーバー : 三重測定の標準偏差

B) カプシドにおける位置。

M372、M403、M559 をそれぞれ赤、ピンク、オレンジで示した。その他のメチオニン残基を黄色で示した。



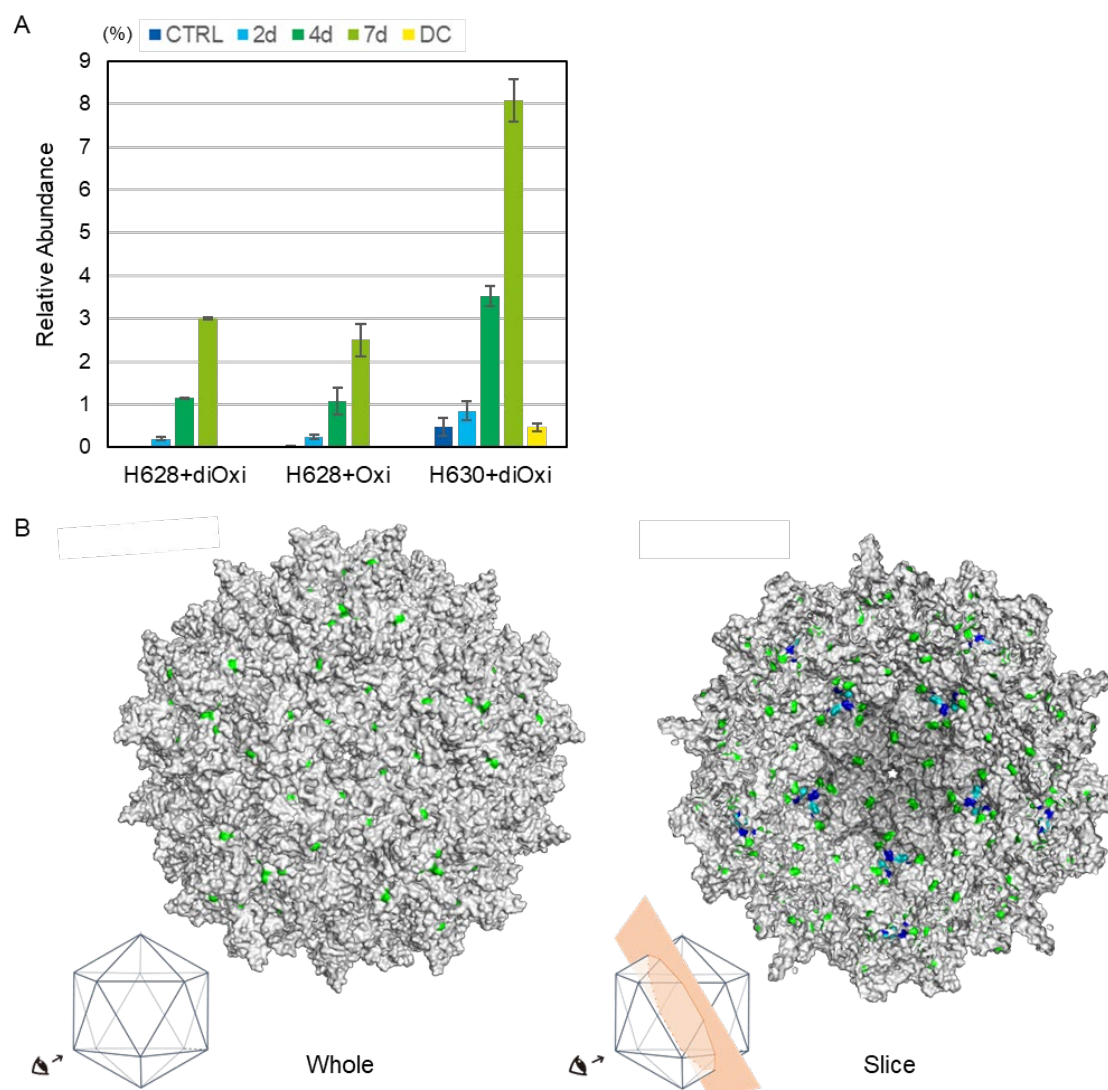


図 15 光ストレスによるヒスチジン残基の酸化

A) 光劣化に伴い酸化が 1.0%を超えたヒスチジン残基を示した。

青 : CTRL、水色 : 2 日間光劣化サンプル、緑 : 4 日間光劣化サンプル、黄緑 : 7 日間光劣化サンプル、黄色 : DC、n=3、エラーバー : 三重測定標準偏差

B) カプシドにおける位置。

H628 と H630 をそれぞれ青と水色で示した。その他のヒスチジン残基を緑で示した。

## 第3章 rAAV の光劣化経路

### 3.1 緒言

第 2 章では、光ストレスによる大幅な形質導入効率の低下と様々な構造上の変化が観察された。1.4 に記載した通り、rAAV の光ストレスに伴う構造的な変化について報告された例はこれまでにない。さらに、rAAV の作用機序は複雑で、構造上の変化がどのように形質導入プロセスに影響を与えるのか、未解明な部分も多い。したがって、光ストレスによる機能低下を引き起こす主たる構造上の変化を特定し、rAAV の光劣化経路を解明することで、未だ完全には特定されていない rAAV の CQA に新たな知見をもたらすことができると考えた。

本章では、光ストレスによる rAAV の光劣化経路の解明として、第 2 章で観察された rAAV6 の光ストレスに伴う変化を考察し、生物学的活性の顕著な低下につながる rAAV6 の構造上の変化を特定することを目指した。さらに、本研究で得られた知見が今後の rAAV 開発に普遍的に適用できる知見となりうるか、用いた安定性試験条件と検体の血清型について考察した。

### 3.2 rAAV6 の機能に対する光ストレスの影響

UV 曝露での形質導入効率の低下を報告した先行研究<sup>31,32</sup>と一致して、D65 ランプを光源とした光安定性試験においても rAAV6 の形質導入効率の顕著な低下が観察された。

MOI :  $1 \times 10^5$  で感染させた場合の劣化サンプルのコントロールサンプルに対する形質導入効率の低下は MOI :  $5 \times 10^4$  で感染させた場合より少なかった。これはウイルスベクターによる形質導入の用量反応曲線がシグモイドカーブを描くことに起因し、検証する MOI によって応答が線形に変化しないためと考えられる。そのため、より定量的に導入効率の低下を評価するには、各劣化サンプルを用いて用量反応曲線を描き、その EC50 を比較することが望ましい。しかし、rAAV の分析ではサンプル量の制限が大きな問題であり、全ての劣化サンプルにおいて用量反応曲線を得ることは容易ではない。非劣化サンプルの用量反応曲線のプラトー濃度またはそれに近い濃度で評価することで、今回のような活性低下の程度を予測するのが難しい状況でも、簡便に生物活性を評価可能であることが示された。

ICH における光安定性試験は、その物質の全般的な光感受性を評価することを目的とする強制分解試験と包装形態や取り扱いについての要件を明確にする確証試験からなり、確証試験では標準的な実験室環境 (1000 lx) を例にすると 50 日間の曝光に相当する総照度 120 万 lx・hr に対する安定性を評価することが求められている。バイオ医薬品においては総照度 120 万 lx・hr は苛烈なストレスであり、凝集体、断片体を伴って生物活性の低下が起こることが多い。本研究で調製した光劣化サンプルの総照度は 7 日間で 672000 lx・hr であり、ICH に規定される 120 万 lx・hr の半分程度で rAAV6 の有効性が大幅に失われたことになる。

### 3.3 rAAV6 の構造に対する光ストレスの影響

#### 3.3.1 粒子損失

BS-AUC の結果は、FP<sub>app</sub> の量が約 20%減少したことを示した。この減少は、CE-SDS による VP 量の減少および CE-LIF による内包核酸量の減少と一致して定量的に確認された。この約 20%の減少は、大きな凝集体の形成に起因すると推定された。BS-AUC 測定で用いられた回転速度では、大きな凝集体は初回スキューンの前に沈降するため、正確なサイズや量を測定することが難しかったと考えられる。DLS の結果は、光の曝露に依存して凝集体が増加することを示したが、DLS は定量性が低く、数量の直接比較は困難である。タンパク質医薬品において凝集体は人体に投与した際の免疫応答を引き起こす要因として知られ、注意すべき不純物として取り扱われる。rAAV がタンパク質と DNA から構成されることを考慮すると、今回観察されたような 1000 nm を超える大きな凝集体は安全性上の懸念となる。投与濃度および投与量、投与経路によってはフィルターの使用が困難なケースも多いため、適切な管理を行うことで凝集体を形成させないことが肝要である。

また、劣化経路として特筆すべきは、BS-AUC の結果が遺伝子放出による FP<sub>app</sub> から EP<sub>app</sub> への変換がほとんど発生していないことを示している点である。光曝露後の FP<sub>app</sub> の濃度は EP<sub>app</sub> よりもかなり高く、F/E 比は初期条件下と実質的に同じであったため、これらの結果は FP<sub>app</sub> が EP<sub>app</sub> よりも失われやすいことを示している。F/E 比は rAAV ベクターの品質の一般的な指標であるが、安定性研究のように全体の粒子量が増加する際には影響を過小評価していないか、慎重に検証する必要がある。ゲノム濃度は 57.4%減少し、これは粒子濃度の減少(約 20%)と一致しなかった。測定方法の差異を考慮しても、この結果は PCR に干渉する DNA の更なる減少または劣化の可能性を示唆している。BS-AUC の結果が光ス

トレスによる  $EP_{app}$  の増加を示さなかったこと、および ddPCR の前にサンプルは DNase で処理されることを考慮すると、この劣化は  $FP_{app}$  のサイズ、密度および形状に変化を起こさない、カプシド内 DNA で生じた変化と推察できる。

### 3.3.2 DNA の光分解

CE-LIF 分析は、主ピークの CPA が有意に減少したことを示したが、総 CPA の減少は AUC で観察された  $FP_{app}$  の減少に近いことが確認された。この結果は、約 20% の  $FP_{app}$  損失の主な原因である凝集体由来の DNA が CE-LIF で分析されなかったことを示唆しており、光ストレスを受けたサンプルの主ピーク CPA の減少には、 $FP_{app}$  の損失による測定溶液の濃度差も含まれている。したがって、主ピークの 74.0% の CPA の減少のうち 19.0% は凝集による減少である。コントロールサンプルにおける  $FP_{app}$  のうち、55.0% が DNA 損傷していることになる。これにより、凝集体しなかった粒子から得られた DNA も大きく損傷を受けていることが明らかになった。さらに、ベンゾナーゼ処理を行わなかったサンプルでも同様に主ピークの CPA% が減っていた。これは、rAAV6 DNA 部分の主な光分解がカプシド内 DNA の放出ではない、というこれまでの結果を支持している。CPD ELISA アッセイによって、カプシド内 DNA が光曝露に伴いピリミジン二量体を形成することを明らかにした。CPD 形成は UVA (320–400 nm) によって誘導されることが報告されており<sup>33,34</sup>、本研究で用いた D65 ランプ (300 nm 以上の波長をもつ) の光でも同様に誘導された。CPD のような共有結合やその他の光誘導性劣化は、カプシド内 DNA の配列全長にわたって発生すると考えられる。こうした DNA 損傷により一本鎖 DNA の構造が変化し、CE-LIF 分析中の移動時間の変化を引き起こしたと考えられる。2.2.5 で説明されているように、ddPCR で使用されるプライマーやプローブがターゲットとする配列には、連続

したピリミジン塩基配列を含む。これらのプライマーもしくはプローブ、またはその両方がターゲット配列にアニーリングできず、適切に増幅できなかったことが ddPCR によるゲノム濃度測定でより顕著な AAV 濃度の低下を示した要因だと考えられる。遊離 DNA アッセイでは、rAAV6 の光劣化サンプルにおいて遊離 DNA が約 4%増加したことを示したが、他の血清型 (rAAV9) ではほとんど変化が見られなかった。(図 S5)。本研究で使用した rAAV6 には、短い DNA がカプシド内に含まれ、カプシド内 DNA 純度としては rAAV9 より低かった。短い DNA 断片はより容易に放出されることが報告されている<sup>57</sup>。そのため、本研究で観察された差異が血清型に依存するのか、サンプル純度に依存するのか、は不明瞭である。しかし、遊離 DNA の増加が観察された rAAV6 においても、その程度は他の変化に比べると低レベルであった。

### 3.3.3 タンパク質の光分解

タンパク質の劣化を評価するために CE-SDS、Intact MS、およびペプチドマッピングを実施した。その結果、VP1 および VP2 断片体 (VPx) の選択的な減少、HMWS の形成、アミノ酸残基の酸化レベルの増加が観察された。VPx は、劣化挙動が VP1 に類似していたため、当初、VP1u 領域を含む VP1 断片であると想定された。しかし、VP1 領域を含む配列は特定されなかった。質量から特定された VP2 断片体は、酸性条件下で切断されやすい配列 (D/P) の切断によって形成されたと推察される<sup>53,54</sup>。サンプル調製中には酸性条件下に置けないことを考慮すると、VP2 断片は製造時に生成された可能性が考えられる。最も可能性が高いのは、酸性溶出を伴うアフィニティクロマトグラフィである。興味深いことに、光ストレスによる VP2 の変化は CE-SDS では確認されなかった。VPx と VP2 の挙動の差異から、VPx は VP1 としてカプシドを構成した後に切断された成分で

ある可能性と、光劣化における VP1 および VPx の減少は VP1/2 領域の微細な構造に依存する可能性が示唆された。

Intact MS 分析において確認された各 VP の+97 Da ピーク系列は、移動相に DMSO を添加した場合にのみ観察されたため、DMSO 関連の付加物である可能性が高く、分析の際に注意が必要である。また、SDS-PAGE と CE-SDS で確認された HMWS は、Intact MS のクロマトグラフィーのプロファイルからは確認できなかった。SDS-PAGE および CE-SDS のサンプル調製工程を考慮すると、これらは 20%の凝集した FP<sub>app</sub> 由来の VP が SDS によりわずかに可溶化され検出へとつながった可能性がある。なお、観察された HMWS は DNA を含まないタンパク質からなる成分であったが、使用した SDS-PAGE のゲルの分離範囲が 3.5–260 kDa であることから、全ての分子量が大きな成分が検出されたとは言い切れず、DNA と VP が多重に架橋されたより大きな HMWS が存在する可能性は否定できない。

ペプチドマップによるアミノ酸残基の酸化レベルの評価では、予想通りの結果と予期しない結果の両方が観察された。メチオニン残基の酸化は、光劣化において一般的に報告される反応であり、予想通りの結果であった。メチオニン残基の光酸化は活性酸素種に依存することが知られている。今回使用した COP バイアルはガラスバイアルと比較して、耐久性が高いこと、低吸着・不活性であること、等の利点を持つが、一方で気体透過率が高く、酸素量を制御できないという欠点を持つ<sup>58</sup>。カプシド表面に存在するメチオニン残基が酸化されていた、という結果は、光によって生成された活性酸素がこれらの残基にアクセスできたことと一致している。一方で、ヒスチジン残基の酸化はメチオニン残基ほど頻繁には生じないため、予想外の結果であった。この点、AAV の構造を詳細に確認すると、本研究で酸化が確認された H630 は、カプシドの内表面において「DNA 結

合ポケット」を形成することが最近報告されている残基であった<sup>59</sup>。今回観察された酸化は二重酸化が主であり、ヒスチジン残基の二重酸化には一重項酸素が重要な役割を果たすことが知られている<sup>60,61</sup>。さらに、DNA は光劣化を通して一重項酸素を生成することが報告されている<sup>62</sup>。つまり、今回観測された H630 の酸化は、カプシド内の DNA が光を受け一重項酸素を生成し、その結果、H628 を含む近傍のヒスチジン残基の酸化を引き起こした可能性を示唆している。ここで、光ストレスに伴う他のヒスチジン残基の酸化について考察する。ごく最近発表された水素/重水素交換質量分析法を用いた研究では、DNA の存在下でカプシドの 5 回対称軸 (図 16) に存在するチャネル周辺のアミノ酸領域が DNA と相互作用する、もしくはその領域の立体構造が変化していることが明らかにされている<sup>63,64</sup>。したがって、DNA 結合ポケット周辺で見られたような DNA の光劣化に起因するヒスチジン残基の酸化が、チャネル周辺のヒスチジン残基にも起きる可能性がある。しかし、今回の実験では 5 回対称軸チャネル周辺のヒスチジン残基の酸化は検出されなかった。その理由としては、①先行研究で確認された DNA の有無による重水の取り込み速度の変化が、チャネルから離れた位置での DNA—カプシドタンパク質の相互作用によるチャネル周辺の遠隔的な立体構造変化によるものであり、チャネル周辺のアミノ酸残基が DNA と相互作用していなかった、もしくは、②DNA がチャネル領域でカプシドタンパク質と相互作用しているものの、ヒスチジン残基と DNA の距離が一重項酸素で酸化されるには遠かった、ことが想定されるものの現時点では不明である。一重項酸素の寿命 (約 4  $\mu$ s)<sup>65</sup> は比較的長い、DNA によって発生する一重項酸素はグアニンを酸化させることが報告されており<sup>62</sup>、発生源のすぐ近傍で消化されと考えられる。



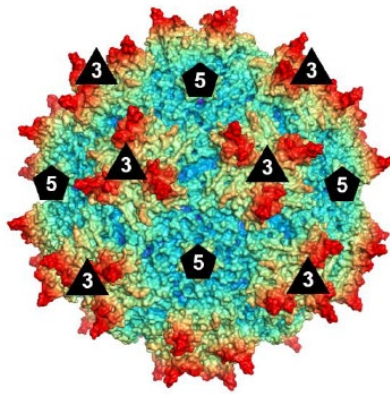


図 16 AAV カプシドの構造

中心からの距離で色分けした。各図形および数字：対称軸数を記載（三角形：3 回対称軸、五角形：5 回対称軸）

### 3.4 rAAV6 の安全性および有効性に対する光ストレスの影響

3.2 および 3.3 では、光ストレスが rAAV6 の生物学的作用および構造に与える影響をそれぞれ考察した。得られた結果から、光ストレスによって rAAV の機能（形質導入）が顕著に損なわれること、また、光ストレスによって生じる構造上の劣化には様々な経路があり、形質導入効率の低下には複数の要素が影響していることが明らかになった。具体的には、FP<sub>app</sub> は DNA 放出することなく凝集体を形成した。また、タンパク質および DNA 部分それぞれで観察された光劣化経路は既知の文献情報と一致した。その一方で、カプシドタンパク質とカプシド内 DNA が光劣化の中で相互に影響することも示唆された。これらの光劣化サンプルの包括的な品質評価によって、rAAV の光劣化経路の中ではカプシド内 DNA の損傷が最も重大であることが明確になった。コントロールサンプル中の FP<sub>app</sub> の約 20% が凝集などにより失われ、さらに 55.0% の FP<sub>app</sub> のカプシド内 DNA がピリミジン二量体等の光劣化により構造変化していることが明らかになった。結果として～25% 程度の FP<sub>app</sub> のみが主ピーク DNA を持つ非凝集粒子として残存したことになる。さらにこれらの粒子においても CE-LIF で分離されない程度の DNA 構造変化や、カプシドタンパク質への修飾といった光劣化が生じる。したがって、コントロールサンプルに対して約 10% まで低下した生物活性の結果に対し、この 2 つの要因が形質導入効率が低下した主要因であったと特定された。まず、凝集によって細胞に取り込まれるそもそもの有効濃度としての rAAV6 濃度が低下し、形質導入効率を低下させた。さらに、非凝集粒子が細胞に取り込まれ、核内に移行することができても、構造変化した DNA を持つ粒子は、その後の脱殻～mRNA 転写までの工程が DNA の構造変化によって阻害され、目的タンパク質の発現まで至らなかったと考えられる。ここまで考察してきたように、光ストレスは rAAV6 の有効性を損ねる管理すべき環境因子であることが明らか

になった。一方で、本研究で得られた結果は安全性の観点からも、光ストレスを管理する重要性を明らかにした。免疫応答を引き起こすとされる凝集体を形成すること、また、構造変化した DNA が宿主細胞の DNA 修復機構を利用してタンパク質発現まで至った場合においても、目的タンパク質とは異なるタンパク質を発現する可能性もあり、安全性への懸念となる。

### 3.5 異なる照度における光劣化の推測

本研究において適用した照度は 4000 lx であり、標準的な実験室環境(1000 lx)より強いストレスである。一方で ICH Q1B では総照度（照度×時間）の規定はあるが照度の規定はない。したがって照度を強く設定すれば短期間で光安定性検体を得ることが可能である。モノクローナル抗体を用いた光安定性試験においては、光劣化が照度ではなく総照度に依存することが報告されているが<sup>66</sup>、DNA とタンパク質からなる rAAV においても同様にストレスの強度ではなくストレスの積算に依存する劣化挙動であるのか、を検証した。具体的には、生物活性とカプシド DNA の CE-LIF 分析および CPD ELISA の結果を一次反応式に回帰させた（表 4 および図 17）。これにより、これらの光劣化が、サンプルが曝された総照度に対する擬一次反応として回帰可能であることが明らかになった。

実際には生物活性の規格は製造や分析法のバラツキ、設定された貯法での安定性などを考慮して設定されるが、暫定的な規格として 70%~130%の相対活性を規格設定した場合、得られた反応速度定数（k）に基づくと、rAAV6 の許容される最大曝露量は 135940.5 lx·hr であることが分かった。これは標準的な実験室環境において約 136 時間に相当し、医薬品の製造から供給までの時間を考慮すると注意すべき短さである。本研究では、rAAV6 の光劣化が総照度に対する擬一次反応として回帰可能であることを明らかにし、実施した光安定性試験条件から管理すべき総照度の閾値を推測することを可能にした。

表 4 光ストレスによる各劣化反応の一次反応定数

	First reaction constant k ( $10^{-6} \text{ lx}^{-1}$ )	Changes after 24-h storage in a normal environment (1000 lx/h)
Relative potency (%)	2.82 ( $\pm 0.18$ )	-6.7
DNA main peak area (%)	1.92 ( $\pm 0.12$ )	-1.4
CPD ELISA	1.44 ( $\pm 1.24$ )	+0.13

括弧内：標準誤差

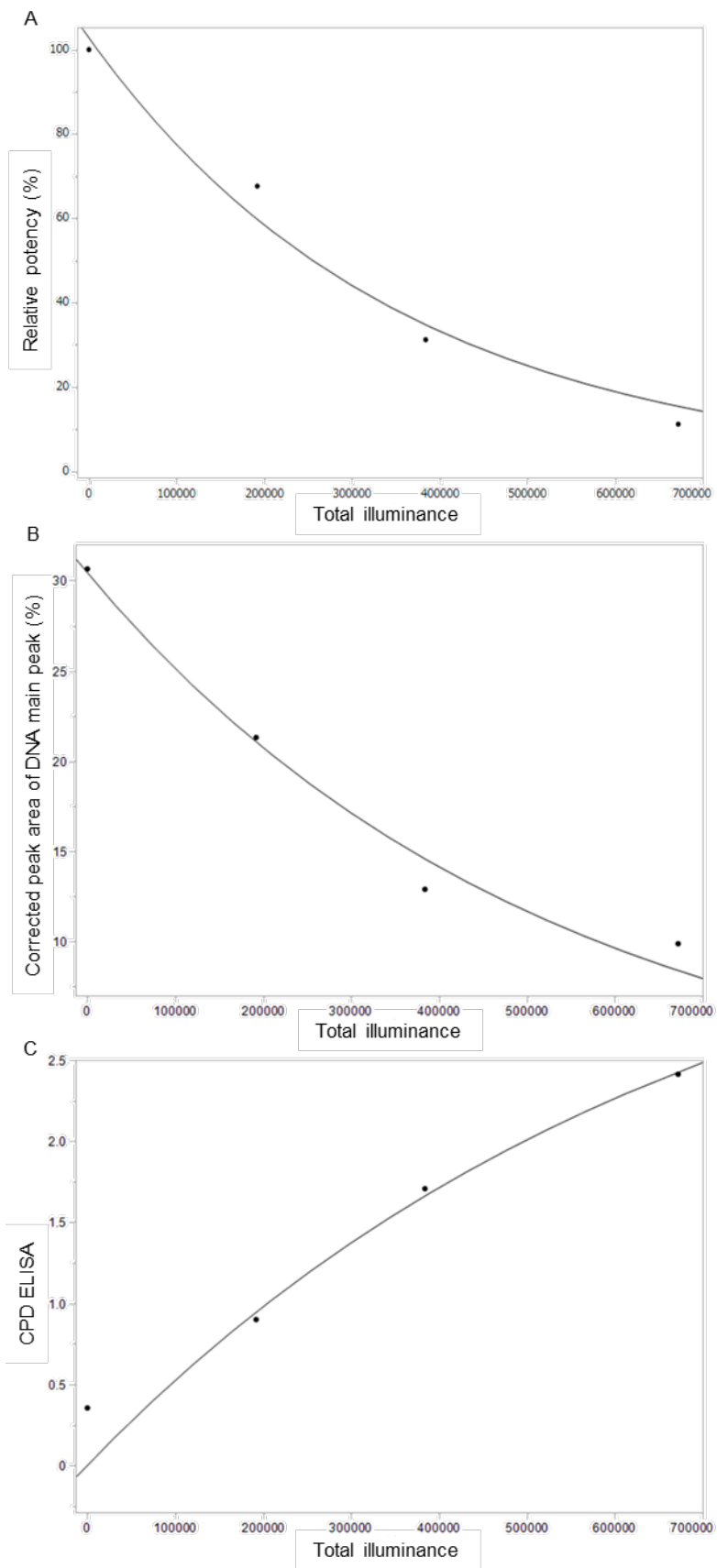


図 17 光ストレスによる変化の一次反応への回帰分析

- A) 生物活性(%)
- B) CE-LIF における主ピークの CPA (%)
- C) CPD ELISA

各結果を一次反応式に回帰して解析した。生物学的活性(%)および DNA 主ピーク(%)については、 $c = A_0 \cdot e^{-kt}$ 。CPD ELISA では、 $c = A_0 \cdot (1 - e^{-kt})$ 。c は分解後の各レベル、 $A_0$  は各項目の初期レベル、k は一次反応定数 ( $\text{lx}^{-1}$ )、t は総照度 ( $\text{lx} \cdot \text{hr}$ ) である。

### 3.6 rAAV の光安定性

本博士論文における実験は主に rAAV6 を用いて実施した。前述のように rAAV の作用機序の詳細や熱安定性は血清型によって異なることが報告されている。rAAV は、血清型によって VP のアミノ酸配列が異なり、カプシド構造の細部も少しずつ異なる。各血清型の VP1 のアミノ酸配列を図 18 に示す。rAAV6 で観察された光劣化経路が血清型に共通した現象であるか否かを明らかにするため、今回得られた結果から、rAAV の血清型に共通する光安定性と、血清型依存的な光安定性について構造の比較から検証し、安全性および有効性面への影響を考察する。

本研究では、光ストレスがカプシド内 DNA に光劣化を引き起こすことが明確になった。血清型によるアミノ酸配列およびカプシド構造細部の差異はあるが、血清型によってカプシドのサイズや全体的な構造に大きな差は見られないため、カプシド内 DNA が受ける光ストレスは血清型に共通すると考えられる。図 S6 に示すように、同じ DNA を内包する rAAV2 を用いた光安定性試験においても、カプシド内 DNA の主ピークに相当するバンドのシグナルは顕著に低下した。内包される DNA は、開発品のコンセプトや GOI によって、一本鎖 DNA か自己相補性 DNA か、また、配列や長さも異なるが、DNA の光劣化は図 3 に示したように複数の塩基に起こるため、構造や配列によって回避することは難しい。さらにカプシドタンパク質分析において示唆された DNA 由来の一重項酸素は、DNA 自身の光劣化も引き起こすため、今回確認しなかった塩基の酸化等の DNA 光劣化も発生していることが想定される。したがって、本研究で見られたカプシド内 DNA の光劣化は血清型共通、かつ DNA 配列非依存的に生じる可能性が高い。

タンパク質の光劣化について、HMWS 形成は rAAV2 および rAAV9 でも確認された。AAV6 とのアミノ酸配列の相同性は AAV2 : 83.4%、AAV9 : 82.5%であ



り、アミノ酸配列から得られた系統図（図 18）からは多くの血清型に共通すると推察される。したがって、光ストレスに伴う粒子の凝集体形成はある程度普遍的に発生する現象と考えられる。一方で、精製に由来すると考えられる VPx は本研究で使用したサンプルに特異的な成分であり、血清型による差異は不明である。図 18 に示すように、rAAV5 以外は同じ位置に D/P または D/G 配列を持つため、精製の条件によっては切断体が形成される可能性があると考えられる。

アミノ酸残基の酸化については、本研究結果から光ストレスによる rAAV のメチオニン残基の酸化はカプシド内外の表面への露出に依存していることが明確になった。したがって、他の血清型においても、カプシド内外の表面に位置するメチオニン残基は酸化すると考えられる。図 18 に示すように、今回酸化が確認されたメチオニン残基は rAAV5 を除く血清型で広く保存されていた。また、DNA の光劣化との相互作用が示唆されたヒスチジン残基（H628 および H630）は、図 18 に示すように H630 は広く保存されているのに対し、H628 は rAAV7～rAAV10 ではアスパラギン残基に置き換わっていた。H630 は DNA 結合ポケットを作る配列として報告されており、その機能が血清型に依らず保持されていることが分かる。したがって、DNA 光酸化によって仲介されるヒスチジン残基の酸化は H630 に関しては血清型に関わらず生じる可能性が高い。

AAV1 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP 150

AAV2 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEVPKTAAGKKRPVEHSP 150

AAV3 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDNRRLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAAGKKRPVEQSP 150

AAV4 1 MTDGYPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDNRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAGETAAGKKRPLESP 149

AAV5 1 MSFVDHPPDWLEE-VGEGLEFLGLEAGPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPFGNLDKGEFVNRADEVAREHDSYNEQLEAGDNFYLRYNHADAEFQERLADDTSGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPTGRIDDHFP 149

AAV6 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSP 150

AAV7 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDNRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSP 150

AAV8 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSP 150

AAV9 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDNRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAAGKKRPVEQSP 150

AAV10 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNAAAADAAAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAAGKKRPVEQSP 150

AAV1 151 Q-EPDSSSGIGKGTQQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-AAVGPTTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 297

AAV2 151 V-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDPQLGPPAAP-SGLGTNTMATSGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWMDRVIITSTRTALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 296

AAV3 151 Q-EPDSSSGVGKSGKQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-TSLGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSQWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 296

AAV4 150 Q-QPDSSTGIGKKGQPAKKKLVF---EDETGAGDGPPEGSTSGAM-SDDSEMRAPAGGAA--YEGQGAGDGVGNASGDWCHDSTWSEGHVITSTRTALPTYNNHLYKRLG-----ESLQSNYNGFSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 287

AAV5 150 KKKKART---EEDSKFSTS---SDAAGPSGSGQQLIPAGPASLGDITMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGDWCHDSTWMDRVIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 287

AAV6 151 Q-EPDSSSGIGKGTQQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-AAVGPTTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 297

AAV7 151 QRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-SSVGSSTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-GSNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 298

AAV8 151 QRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-SGVGNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-GSNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 299

AAV9 151 Q-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-SGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSQWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-SGSSNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 298

AAV10 151 QRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPATP-SGLGSSTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRIITSTRTALPTYNNHLYKQISSAST-SGSSNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDW 299

AAV1 298 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 444

AAV2 297 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 443

AAV3 297 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 443

AAV4 288 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 444

AAV5 288 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 444

AAV6 298 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 444

AAV7 298 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 445

AAV8 300 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 446

AAV9 299 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 445

AAV10 300 QRLINNNGWFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGS---QAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNNFTFSYTFEEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPIDQYLY 446

AAV1 445 YLNRTQ-NQSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN----NNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 585

AAV2 444 YLSRTN-TPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADN----NNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 584

AAV3 444 YLNRTQGTTSQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADN----NNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 585

AAV4 438 GLQSTTTGTTLNAGTATNFTKLRPTNFSNFKKNWLPGPSIKQGGFSKANTANQYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTGPFPMTAGPADSKF--SNSQLIFAGPKQNGTATVP--GTLIFTSEEEIATNATDTMDWGNLPGGDQ 583

AAV5 437 RFVSTN-TTGG-----VQFNKNLAGRYANTYKNWFPQPMGRTPQGNLGSVGN----RASVSATFATNMELEGASVQVPPQNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQ 574

AAV6 445 YLNRTQ-NQSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN----NNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 585

AAV7 446 YLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN----NNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 586

AAV8 447 YLSRTQ-TTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQN----NNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEERFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 587

AAV9 446 YLSRTI--NGSGNQQTQKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGSPYRQQRVSTTTVQN----NNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEERFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 585

AAV10 447 YLSRTQ-STGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQN----NNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEERFFBSSGVMLF-GKESAGASNTAL--DNVMTDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ 587



図 18 主な血清型の VP1 アミノ酸配列アライメントと系統樹

赤枠：VP2 切断部位、黄枠：酸化が確認されなかった Met 残基、薄黄：酸化が見られた Met 残基、黄：光ストレスに伴う酸化の増加が見られた Met 残基、青：光ストレスに伴う酸化の増加が見られた His 残基

アライメントおよび系統樹の作成には Muscle 及び UPGMA 法を用いた。

上記の考察を踏まえると、rAAV6 で確認された主な光劣化経路である、カプシド内 DNA の光劣化と粒子の凝集体形成は血清型に共通して生じる光劣化である。したがって、光ストレスによって rAAV 全般において有効性の低下と安全性の懸念が生じる。実際に図 S7 に示すように rAAV2 においても光ストレスによって顕著な有効性の低下を認めた。ただし、凝集体の形成メカニズムは本研究では未解明であり、rAAV6 で観察された、DNA 放出を伴わずに大きな凝集体を形成する、という現象が血清型によらず生じるかは不明である。

これらの考察から、rAAV の光安定性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、本研究で観察された有効性および安全性に影響を与える主な光劣化経路については血清型に共通する現象といえる。

## 第4章 総括

rAAV ベクターを利用した遺伝子治療用医薬品は近年盛んに臨床研究が進む一方で、有効性および安全性を担保した医薬品開発を進めるにあたり必須である安定性に関する知見が不十分であった。本研究では、その中でもほとんど知見が得られていない、rAAV の光安定性に着目し、D65 ランプを用いた rAAV6 の光安定性の解明に取り組んだ。

第2章では、ICH Q1B のオプション1の条件に従った光安定性試験を実施し、光ストレスによる rAAV6 の品質特性の変化を評価した。光ストレスによって rAAV6 の形質導入効率が顕著に低下することを明らかにした。また、カプシド内 DNA では CPD 形成、カプシドタンパク質ではアミノ酸残基の酸化といった既知の典型的な光劣化が発生することを明らかにした。さらに光ストレスによって rAAV6 粒子の凝集体が形成されることを明らかにした。

第3章では、光ストレスによる機能低下を引き起こす主たる構造上の変化を特定し、血清型に依存しない rAAV の光劣化経路を明らかにした。主要な光劣化経路として、有効性の低下と安全性の懸念を引き起こす2つの要因（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。これまでの rAAV の CQA 研究においてはあまり重視されていなかったが、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であることが明らかになった。さらに、rAAV6 の FP<sub>app</sub> が DNA 放出することなく凝集体を形成したという今回の結果は rAAV の凝集に関する研究に新しい知見となることが期待される。また、rAAV の光劣化挙動が曝露した総照度に依存する擬一次反応として回帰可能であることを明らかにし、今回実施した安定性試験を基に規格値から許容最大曝露量を推定可能であることを示した。

第2章および第3章の結果から、rAAVにおいて光ストレスは製造、流通およ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が明らかになった。紙箱で遮光したダークコントロールサンプルの結果から紙箱遮光で対処可能だと考えられるが、実際の製造、流通および使用時の溶液の光曝露時間を考慮して、製造時の曝光対策や原薬のアルミ袋遮光、製剤の紙箱遮光や遮光処理されたバイアルの使用等を検討する必要がある。また、AAVの製造スケラビリティと製造費用の観点からは高い有効粒子濃度を維持することの費用対効果は大きいと考えられる。

本研究で使用した光照射条件は、ICH Q1B のオプション 1 の条件に従い、光源として D65 ランプ（標準昼光光源）を使用した。一般的に、光子エネルギーが高い UV 光などの短波長の光の方が品質に与える影響が大きく、有害波長であることが多い。そのため、光ストレスに非常に敏感な医薬品を取り扱う場合、工場や実験室の光源・窓に UV カットフィルム等を設置する場合がある。さらに、近年では UV 光を全く含まない可視光源を作製できる LED を光源として用いることも多い。したがって、本研究では具体的な有害波長を特定していないが、今後の rAAV の取り扱いや保存を考慮して、異なる波長をもつ室内照明条件下での光劣化の影響を評価することも重要である。主要な光劣化経路として特定された DNA の光劣化は、UV 光と可視光の両方で発生することが報告されているが<sup>67,68</sup>、本研究で確認したピリミジン二量体の形成は、UV 光で発生することが報告されている。このため、異なる波長をもつ室内照明条件下での AAV の光分解は、本研究の結果とは異なる結果をもたらす可能性があり、有害波長を特定することでより適切な管理が可能となる。

本研究結果は、rAAV の光安全性について新たな知見をもたらし、有効性および安全性を担保した rAAV を供給するための適切な取り扱いと保管条件を設定

することの重要性を明確にした。今後の rAAV を用いた遺伝子治療医薬品の開発において有用な情報となることが期待される。

## 補足資料

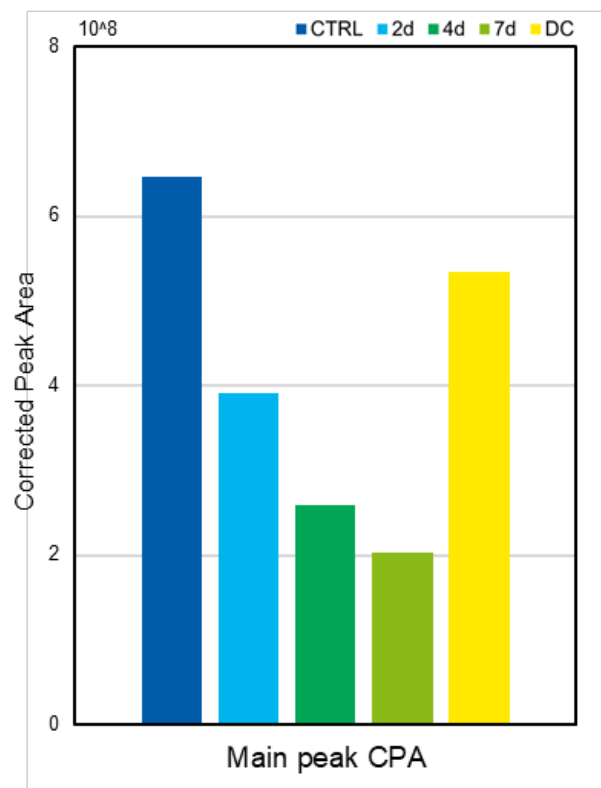


図 S1 ベンゾナーゼ処理なしの DNA 主ピークの減少

ベンゾナーゼ処理をしていないサンプルを CE-LIF で分析したところ、7 日間の光照射で主ピークの CPA が 69.5%減少した。

青 : CTRL、水色 : 2 日間光劣化サンプル、緑 : 4 日間光劣化サンプル、黄緑 : 7 日間光劣化サンプル、黄色 : DC



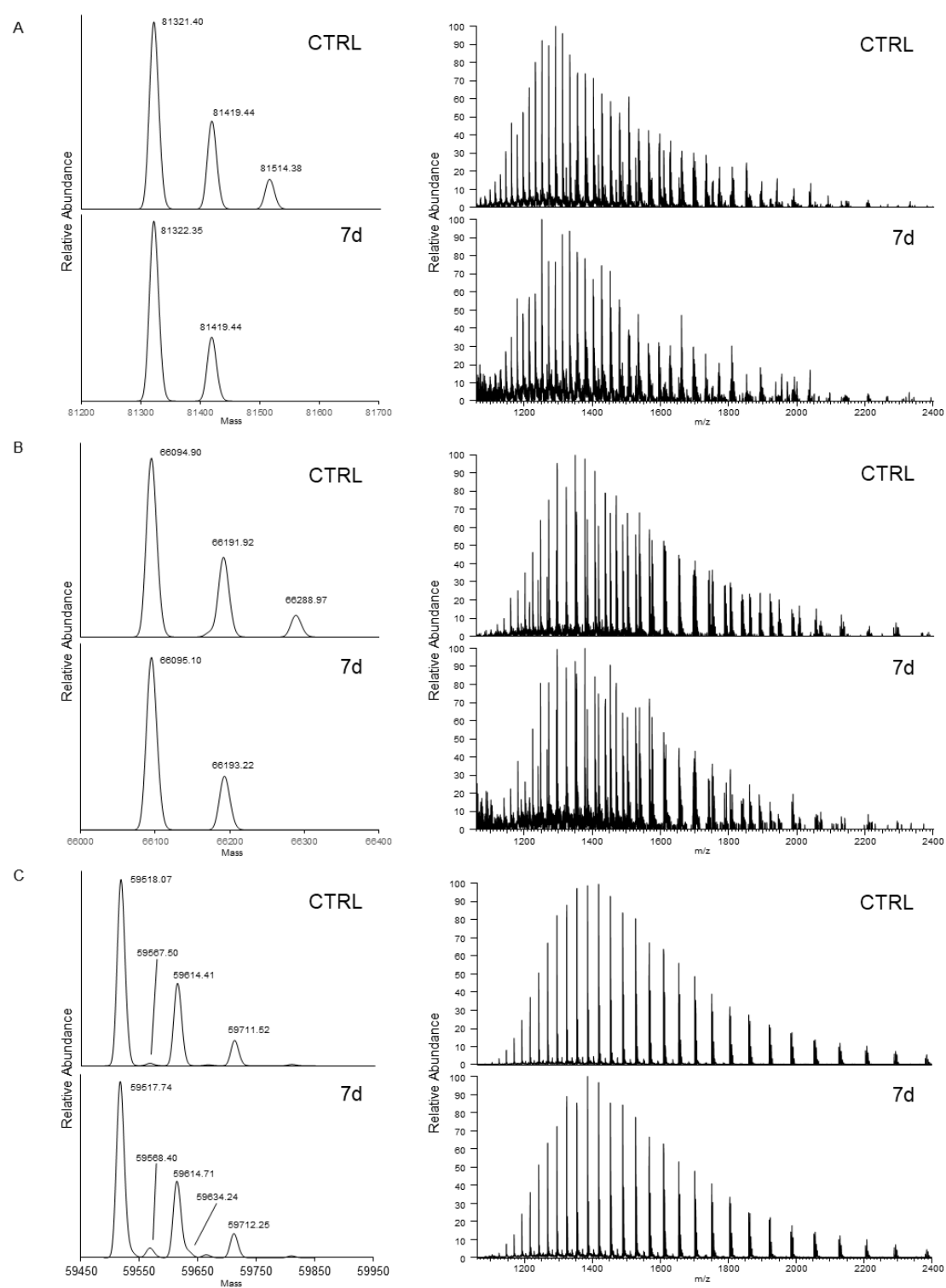


図 S2 照射後の rAAV6 の intact MS 分析

VP1 (A)、VP2 (B)、VP3 (C) のデコンボリューション結果およびマススペクトルを示す。CTRL (下) と 7 日間光劣化サンプル (上) を各パネルに示す。

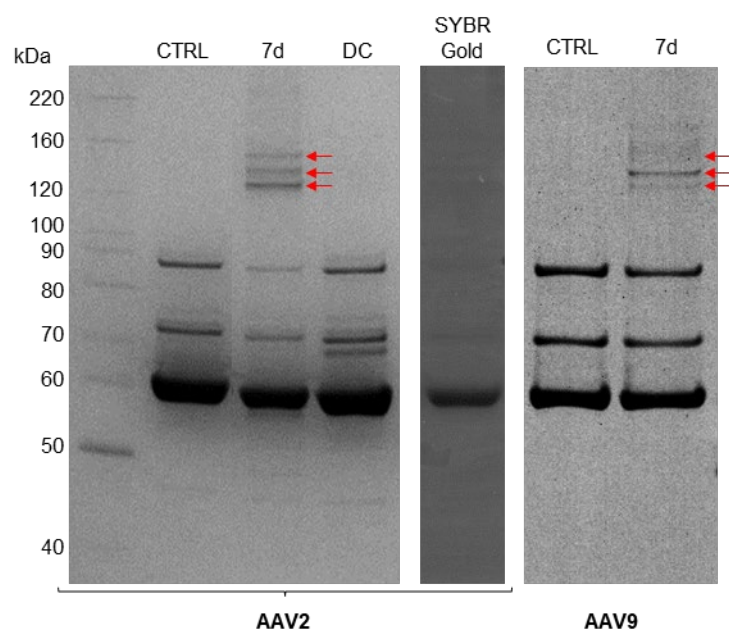


図 S3 SDS-PAGE による光劣化サンプルの VP 解析

赤矢印：HMWS

SDS-PAGE 分析により、rAAV2 と rAAV9 においても 7 日間の光曝露後に HMWS を形成することが示された。SYBR Gold 染色では蛍光バンドは検出されず、HMWS 形成における DNA の共有結合性の相互作用がないことが示された。

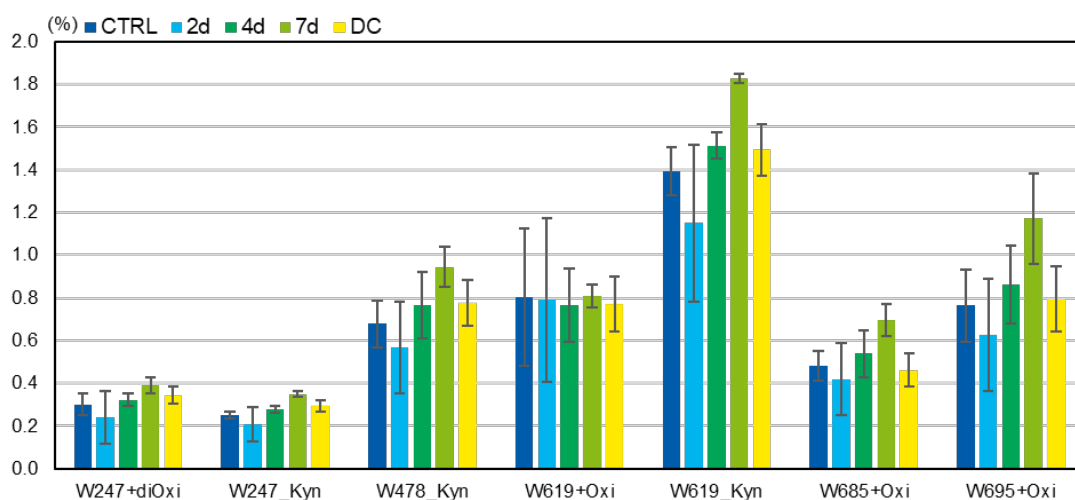


図 S4 光ストレスによるトリプトファン残基の酸化

0.2%を超えて検出された酸化をまとめた。W619 と W695 のみが 7 日間の光ストレスサンプルで 1.0%以上の酸化を示した。青：CTRL、水色：2 日間光劣化サンプル、緑：4 日間光劣化サンプル、黄緑：7 日間光劣化サンプル、黄色：DC、エラーバー：三重測定標準偏差、Kyn：Kynurenine

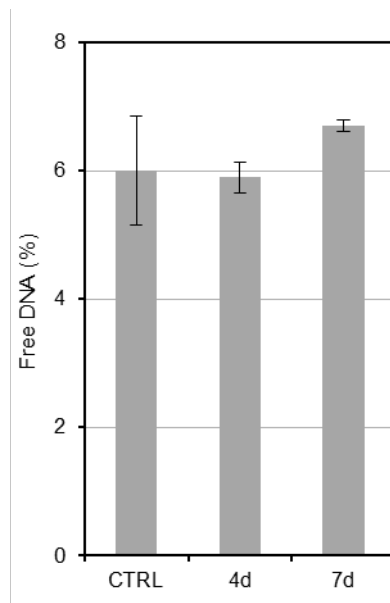


図 S5 光ストレスによる rAAV9 の DNA 漏出

rAAV9 の遊離 DNA (%) は、7 日間の光曝露後も安定していた。

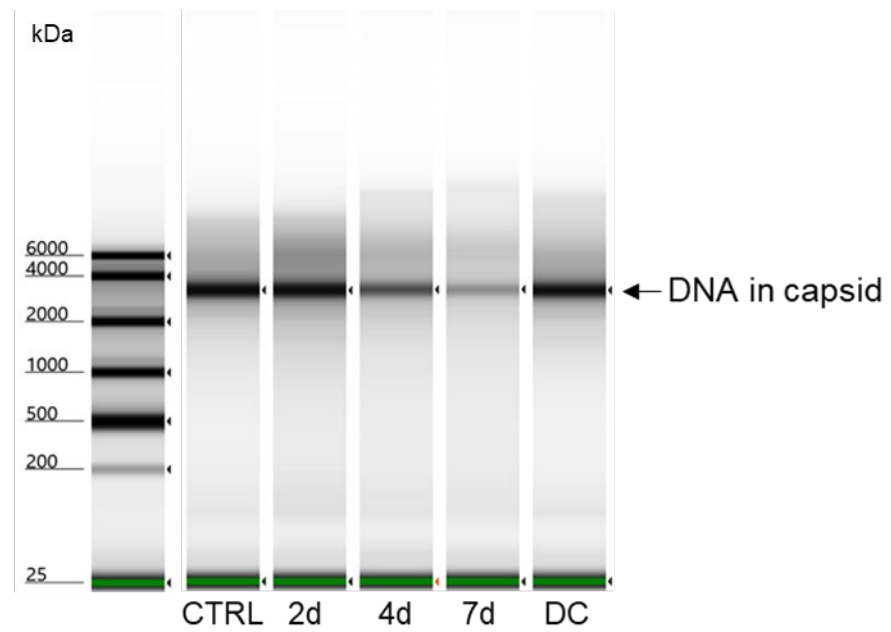


図 S6 光ストレスによる rAAV2 のカプシド内 DNA の劣化

4150 TapeStation システム (Agilent) による電気泳動図。rAAV6 と同様、CE-LIF で主ピークに相当するバンドが光曝露に伴って顕著に減少した。

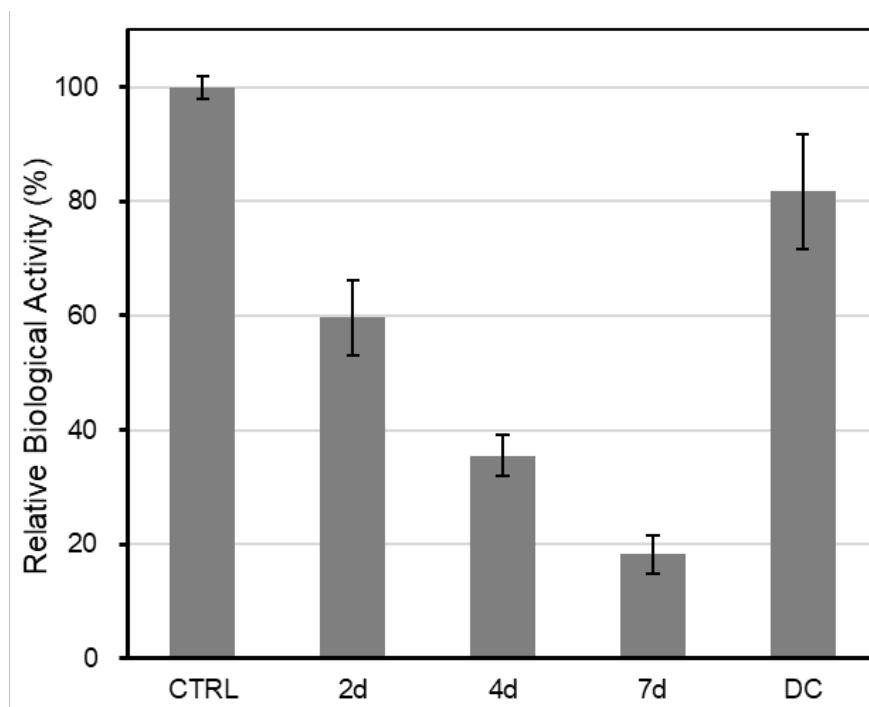


図 S7 光ストレスによる rAAV2 の形質導入効率の低下

rAAV6 と同様、光曝露に伴って形質導入効率は顕著に減少した。MOI は同様にコントロールサンプルの用量反応曲線から  $1 \times 10^4$  を採用した。7 日間光ストレスを受けたサンプルの導入効率は、非照射サンプルと比較して 18.2%だった。

## 引用文献

1. Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754–756.
2. Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., and Rowe, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 1467–1474.
3. Carter, B.J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Mol. Ther.* 10, 981–989.
4. Kumar, S.R., Markusic, D.M., Biswas, M., High, K.A., and Herzog, R.W. (2016). Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16034.
5. Alhakamy, N.A., Curiel, D.T., and Berkland, C.J. (2021). The era of gene therapy: from preclinical development to clinical application. *Drug Discov. Today* 26.
6. Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 358–378.
7. Asokan, A., Schaffer, D.V., and Jude Samulski, R. (2012). The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther.* 20, 699–708.
8. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080.
9. Wörner, T.P., Bennett, A., Habka, S., Snijder, J., Friese, O., Powers, T., Agbandje-McKenna, M., and Heck, A.J.R. (2021). Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic. *Nat. Commun.* 12, 1642.
10. Johnson, F.B., Ozer, H.L., Hoggan, M.D. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J. Virol.* 8, 860-63
11. Keeler, A.M., and Flotte, T.R. (2019). Recombinant adeno-associated virus gene therapy in light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): where are we, and how did we get here? *Annu. Rev. Virol.* 6, 601–621.
12. Shen, W., Liu, S., and Ou, L. (2022). rAAV immunogenicity, toxicity, and durability in 255 clinical trials: A meta-analysis. *Front. Immunol.* 13.
13. Riyad, J.M., and Weber, T. (2021). Intracellular trafficking of adeno-associated virus (AAV) vectors: challenges and future directions. *Gene Ther.* 28, 683-696
14. Sha, S., Maloney, A.J., Katsikis, G., Nguyen, T.N.T., Neufeld, C., Wolfrum, J., Barone, P.W., Springs, S.L., Manalis, S.R., Sinskey, A.J., et al. (2021). Cellular pathways of recombinant adeno-associated virus production for gene therapy.

Biotechnol. Adv. 49, 107764.

15. Giles, A.R., Sims, J.J., Turner, K.B., Govindasamy, L., Alvira, M.R., Lock, M., and Wilson, J.M. (2018). Deamidation of amino acids on the surface of adeno-associated virus capsids leads to charge heterogeneity and altered vector function. *Mol. Ther.* 26, 2848–2862.
16. Costa V., H., Kuranda K., Mingozzi F. (2020). AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer. *Mol. Ther.* 28, 723–746.
17. Naso M.F., Tomkowicz B., Perry W.L. 3rd, Strohl W.R. (2017) Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs.* 31, 317–334.
18. International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use. Stability Guideline Series. Accessed Dec 23, 2024. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
19. Nowak, C., K Cheung, J., M Dellatore, S., Katiyar, A., Bhat, R., Sun, J., Ponniah, G., Neill, A., Mason, B., Beck, A., et al. (2017). Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. *mAbs* 9, 1217–1230.
20. Duhamel, L., Gu, Y., Barnett, G.V., Tao, Y., Sergey Voronov, Ding, J., Mussa, N., and Zheng Jian Li (2019). Therapeutic protein purity and fragmented species characterization by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate using systematic hybrid cleavage and forced degradation. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 5617–5629.
21. Yan-chun, L., Moyle, A.B., Beaumont, V., Liu, L.L., Polleck, S., Liu, H., Shi, H., Rouse, J.C., Kim, H.-Y., Zhang, Y., et al. (2023). Characterization of higher order structural changes of a thermally stressed monoclonal antibody via mass spectrometry footprinting and other biophysical approaches. *Anal. Chem.* 95, 16840–16849.
22. Jiang, Z., and Dalby, P.A. (2023). Challenges in scaling up AAV-based gene therapy manufacturing. *Trends Biotechnol.* 41, 1268–1281.
23. Bennett, A., Patel, S., Mietzsch, M., Jose, A., Lins-Austin, B., Yu, J.C., Bothner, B., McKenna, R., and Agbandje-McKenna, M. (2017). Thermal stability as a determinant of AAV serotype identity. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 6, 171–182.
24. Horowitz, E.D., Rahman, K.S., Bower, B.D., Dismuke, D.J., Falvo, M.R., Griffith, J.D., Harvey, S.C., and Asokan, A. (2013). Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. *J. Virol.* 87, 2994–3002.
25. Bernaud, J., Rossi, A., Fis, A., Gardette, L., Aillot, L., Büning, H., Castelnovo, M., Salvetti, A., and Faivre-Moskalenko, C. (2018). Characterization of AAV vector particle stability at the single-capsid level. *J. Biol. Phys.* 44, 181–194.



26. Howard, D.B., and Harvey, B.K. (2017). Assaying the stability and inactivation of AAV serotype 1 vectors. *Hum. Gene Ther. Methods*. 28, 39–48.
27. Xu, Y., Jiang, B., Samai, P., Tank, S.-M., Shameem, M., and Liu, D. (2022). Genome DNA leakage of adeno-associated virus under freeze–thaw stress. *Int. J. Pharm.* 615, 121464.
28. Lins-Austin, B., Patel, S., Mietzsch, M., Brooke, D., Bennett, A., Venkatakrisnan, B., Van Vliet, K., Smith, A.N., Long, J.R., McKenna, R., et al. (2020). Adeno-associated virus (AAV) capsid stability and liposome remodeling during endo/lysosomal pH trafficking. *Viruses* 12, 668.
29. Gruntman, A.M., Su, L., Su, Q., Gao, G., Mueller, C., and Flotte, T.R. (2015). Stability and compatibility of recombinant adeno-associated virus under conditions commonly encountered in human gene therapy trials. *Hum. Gene Ther. Methods*. 26, 71–76.
30. Tomono, T., Hirai, Y., Chono, H., Mineno, J., Ishii, A., Onodera, M., Tamaoka, A., and Okada, T. (2019). Infectivity assessment of recombinant adeno-associated virus and wild-type adeno-associated virus exposed to various diluents and environmental conditions. *Hum. Gene Ther. Methods*. 30, 137–143.
31. Daugaard, S., Markvart, J., Bonde, J.P., Christoffersen, J., Garde, A.H., Hansen, M., Schlunssen, V., Vestergaard, J.M., Vistisen, H.T.; Kolstad, H.A. (2019). Light exposure during days with night, outdoor, and indoor work. *Ann. Work. Expo. Health*. 63, 651–665.
32. Lingfors, D., Volotinen, T. (2013). Illumination performance and energy saving of a solar fiber optic lighting system. *Opt. Express*. 21, A642–A655.
33. Khan, A.Q., Travers, J.B., and Kemp, M.G. (2018). Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 438–460.
34. Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Photochem. Photobiol. B*. 63, 88–102.
35. Schuch A.P., Da Silva Galhardo R., De Lima-Bessa K.M., Schuch N.J., Menck C.F. (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 111–120.
36. Schuch A.P., Moreno N.C., Schuch N.J., Menck C.F.M., Garcia C.C.M. (2017) Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*. 107, 110-124.
37. Schöneich, C. (2020). Photo-degradation of therapeutic proteins: mechanistic aspects. *Pharm. Res.* 37, 45
38. Mason B.D., Schöneich C., Kerwin B.A. (2012). Effect of pH and light on

- aggregation and conformation of an IgG1 mAb. *Mol Pharm.* 9, 774-90.
39. Zhang, Z., Chow, S.-Y., De Guzman, R., Joh, N.H., Joubert, M.K., Richardson, J., Shah, B., Wikström, M., Zhou, Z.S., and Wypych, J. (2022). A mass spectrometric characterization of light-induced modifications in therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* 111, 1556–1564.
  40. Hipper E., Blech M., Hinderberger D., Garidel P., Kaiser W. (2022). Photo-oxidation of therapeutic protein formulations: from radical formation to analytical techniques. *Pharmaceutics.* 14, 72.
  41. Miyahara Y., Shintani K., Hayashihara-Kakuhou K., Zukawa T., Morita Y., Nakazawa T., Yoshida T., Ohkubo T., Uchiyama S. (2020). Effect of UVC irradiation on the oxidation of histidine in monoclonal antibodies. *Sci Rep.* 10, 6333.
  42. Amano M., Kobayashi N., Yabuta M., Uchiyama S., Fukui K. Detection of histidine oxidation in a monoclonal immunoglobulin gamma (IgG) 1 antibody. (2014). *Anal. Chem.* 86, 7536-43
  43. Maruno, T., Ishii, K., Torisu, T., and Uchiyama, S. (2023). Size distribution analysis of the adeno-associated virus vector by the c(s) analysis of band sedimentation analytical ultracentrifugation with multiwavelength detection. *J. Pharm. Sci.* 112, 937–946.
  44. Maruno, T., Usami, K., Ishii, K., Torisu, T., and Uchiyama, S. (2021). Comprehensive size distribution and composition analysis of adeno-associated virus vector by multiwavelength sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *J. Pharm Sci.* 110, 3375–3384.
  45. Santos, M., Wang, F., Luo, J., and Mollah, S. (2022). Genome integrity analysis of adeno-associated viruses (AAVs) featuring the BioPhase 8800 system and the RNA 9000 Purity & Integrity kit. *SCIEX Technical Note.* RUO-MKT-02-14621-A.
  46. Bee, J.S., O’Berry, K., Zhang, Y. (Zoe), Phillippi, M.K., Kaushal, A., DePaz, R.A., and Marshall, T. (2021). Quantitation of trace levels of DNA released from disrupted adeno-associated virus gene therapy vectors. *J. Pharm. Sci.* 110, 3183–3187.
  47. Zhang, C.-X., and Meagher, M.M. (2019). Highly sensitive SDS capillary gel electrophoresis with sample stacking requiring only nanograms of adeno-associated virus capsid proteins. *Methods Mol. Biol.* 1972, 263–270.
  48. Toole, E.N., Dufresne, C., Ray, S., Schwann, A., Cook, K., and Ivanov, A.R. (2021). Rapid highly-efficient digestion and peptide mapping of adeno-associated viruses. *Anal. Chem.* 93, 10403–10410.
  49. Lock, M., Alvira, M.R., Chen, S.-J., and Wilson, J.M. (2014). Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome

- titers by droplet digital PCR. *Hum. Gene Ther. Methods*. 25, 115–125.
50. Tuisku Suoranta, Nihay Laham-Karam, and Seppo Ylä-Herttuala (2021). Optimized protocol for accurate titration of adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 32, 1270–1279.
  51. Aucoin, M.G., Perrier, M., and Kamen, A.A. (2008). Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. *Biotechnol. Adv.* 26, 73–88.
  52. Oyama, H., Ishii, K., Maruno, T., Torisu, T., and Uchiyama, S. (2021). Characterization of adeno-associated virus capsid proteins with two types of VP3-related components by capillary gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum. Gene Ther.* 32, 1403–1416.
  53. Vlasak, J., and Ionescu, R. (2011). Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 3, 253–263.
  54. Koza, S., Zhang, X., Yang, H., and Chen, W. (2020). Applying liquid chromatography (LC) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) methods to the characterization and analysis of rAAV. *LCGC N Am.* 38, 654–663.
  55. Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 14, 86–100.
  56. Popa-Wagner, R., Manvi Porwal, Kann, M., Matthias Reuß, Weimer, M., Florin, L., and Kleinschmidt, J.A. (2012). Impact of VP1-specific protein sequence motifs on adeno-associated virus type 2 intracellular trafficking and nuclear entry. *J. Virol.* 86, 9163–9174.
  57. Barnes L.F., Draper B.E., Jarrold M.F. (2022). Analysis of thermally driven structural changes, genome release, disassembly, and aggregation of recombinant AAV by CDMS. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 27, 327–336.
  58. Härdter N., Menzen T., Winter G. (2021). Minimizing oxidation of freeze-dried monoclonal antibodies in polymeric vials using a smart packaging approach. *Pharmaceutics*. 13, 1695.
  59. Mietzsch, M., Barnes, C., Hull, J.A., Chipman, P., Xie, J., Bhattacharya, N., Sousa, D., McKenna, R., Gao, G., and Agbandje-McKenna, M. (2020). Comparative analysis of the capsid structures of AAVrh.10, AAVrh.39, and AAV8. *J. Virol.* 94.
  60. Davies, M.J., and Truscott, R.J.W. (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63, 114–125.
  61. Méndez-Hurtado, J., Ramón López, Dimas Suárez, and Menéndez, I. (2012). Theoretical study of the oxidation of histidine by singlet oxygen. *Chemistry* 18, 8437–8447.

62. Yagura T., Schuch A.P., Garcia C.C.M., Rocha C.R.R., Moreno N.C., Angeli J.P.F., Mendes D., Severino D., Bianchini Sanchez A., Di Mascio P., et. al., (2017). Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation. *Free Radic Biol Med.* 108, 86-93.
63. Ikeda, T., Yamaguchi, Y., Oyama, H., Matsushita, A., Tsunaka, Y., Fukuhara, M., Torisu, T., Uchiyama, S. (2024). Higher-order structure of adeno-associated virus serotype 8 by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Viruses.* 16, 585
64. Ye, X., Hu, Y., Qiu, H., Li, N. (2024). Probe capsid structure stability and dynamics of adeno-associated virus as an important viral vector for gene therapy by hydrogen-deuterium exchange-mass spectrometry. *Protein Sci.* 33, 5074
65. Rodgers, M.A.J., Snowden, P.T. (1982). Lifetime of oxygen ( $O_2(1\Delta g)$ ) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5541– 5543
66. Kaiser W., Schultz-Fademrecht T., Blech M., Buske J., Garidel P. (2021). Investigating photodegradation of antibodies governed by the light dosage. *Int. J. Pharm.* 604, 120723.
67. Kielbassa, C., Rosa, L., and Epe, B. (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18, 811–816.
68. Ravanat, J.L., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., and Cadet, J. (2001). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 276, 6056.

発表論文

**Rie Takino**, Yuki Yamaguchi, Takahiro Maruno, Ekaputra Ramadhani, Misaki Furukawa, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama. (2024). Physicochemical and biological impacts of light stress on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, in-press, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101362> (第2章および第3章が該当)

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、厚いご指導を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域 内山 進 教授、鳥巢 哲生 准教授、山口 祐希 助教に謹んで感謝いたします。

本博士学位論文を審査して頂き、貴重なご指導およびご高閲を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 生物資源工学領域 福崎 英一郎 教授、並びに大阪大学工学研究科生物工学専攻 生物化学工学領域 大政 健史 教授に厚く感謝申し上げます。

実験データの取得やディスカッション等、研究全般を通してご尽力いただいた丸野 孝浩 特任研究員、Ekaputra Ramadhani 氏、古川 美咲 氏、研究室の先生方、学生諸氏、研究員、事務補佐、株式会社ユー・メディコの方々に心から感謝いたします。

承認申請等のプロジェクト業務が多忙な中、本研究を遂行する環境を与えてくださり、ご助言も頂きました、第一三共株式会社 大原 求 氏、上代 才 氏、鈴木 信幸 氏、岡地 隆弘 氏、大橋 潤二 氏、川邊 武史 氏、今井 英祐 氏、新木 哲也 氏、柴田 真吉 氏、並びに分析評価研究所員の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程に進学するにあたり、理解し支えてくれた家族と、応援してくれた多くの友人に深い感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。