



Title	アデノ随伴ウイルスベクターのウイルスタンパク質と内包DNAに起因する不均一性の特性解析
Author(s)	廣畑, 貴一
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105401
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 （ 廣 畑 貴 一 ）

論文題名

アデノ随伴ウイルスベクターのウイルスタンパク質と内包DNAに起因する不均一性の特性解析

論文内容の要旨

第1章 序章

治療用遺伝子を標的細胞に導入し疾患を治療する遺伝子治療は、根本的治療法として大きな治療可能性を示している。遺伝子治療用ベクターの中で、組換え型アデノ随伴ウイルス（rAAV）はその非病原性と高い遺伝子導入効率により、遺伝子治療におけるリーディングプラットフォームの一つである。rAAVは野生型同様、正二十面体のカプシドが直鎖状一本鎖DNAを内包している。カプシドは3種類のウイルスタンパク質（VP）、VP1、VP2およびVP3が60個会合することで形成される。rAAVは主にヒト細胞を用いて製造されるが、完全長の設計DNAを内包した目的の完全粒子だけでなく、DNAを内包しない空粒子などの不純物粒子も生じることが知られている。これら不純物粒子は完全粒子と物理化学的特性が類似しており、確立された精製法を用いても完全に取り除くことは困難である。したがって、rAAVに含まれる粒子の内包DNAに起因する不均一性を正確に評価することが求められている。また近年、完全粒子のカプシドを構成するVPの化学量論比と活性との相関が報告されており、VP化学量論比の制御も重要であることが認識されている。そのため、本博士論文ではrAAVを構成するVPおよび内包DNAの両者に着目し、内包DNAだけでなくVP化学量論比にも起因する粒子の不均一性を評価できる分析法を開発した。この新規手法も用いて特性解析を行うことで、rAAVの不均一性を引き起こす要因を明らかにすることを目的とした。

第2章 超遠心分析密度勾配沈降平衡法を中心としたrAAVの特性解析

これまでに塩化セシウムを媒体として用いた密度勾配遠心（CsCl-DGUC）によるrAAV精製において、完全粒子に浮遊密度の異なる2つの粒子成分が観測されることが報告されている。しかし、僅かな物理化学的特性の差に基づくことが示唆され、長らくその構成成分の違いは不明であった。したがって、CsCl-DGUCと同じ原理に基づく超遠心分析密度勾配沈降平衡法（DGE-AUC）を確立し、さまざまなrAAVにおいてこの2種類の粒子成分が観測されることを確認した。そこで、rAAV8でこれらの粒子成分を高純度に分離・分画し、VP化学量論比と内包DNAをキャピラリーゲル電気泳動（CGE）を用いて分析した。その結果、内包DNAには差が見られなかった一方で、低浮遊密度粒子の方がVP1およびVP2の比率が高いことが示され、カプシドのVP化学量論比の違いが浮遊密度差を引き起こすことが明らかとなった。最後に、異なるVP化学量論比で構成されるカプシドのCsCl密度勾配中での浮遊密度差を議論し、内包DNAの鎖長に依存してその浮遊密度差が変化することが示された。

第3章 内包DNA鎖長の異なるrAAV8の特性解析

内包DNA鎖長の異なるrAAV8のDGE-AUCの測定結果から、第2章で示されたVP化学量論比の異なる完全粒子の浮遊密度差だけでなく、VP化学量論比の不均一性も変化していることが示唆された。そこで、内包DNA鎖長とVP化学量論比の不均一性の関係を明らかにするために系統的な比較解析を実施した。まず、元の設計DNAに2種類の長さの異なるスタッパー配列を挿入し、元の設計DNAも合わせて3種類の異なる鎖長の設計DNAを内包するrAAV8を同様の生産法で作製した。包括的な特性解析の結果、rAAV8の内包DNAの鎖長が長くなるに従い完全粒子全体のVP化学量論比の不均一性が減少していた。加えて驚くべきことに、内包DNA鎖長が短いほどカプシドを構成するVP1およびVP2の比率が高くなり、*in vitro*での遺伝子導入効率が有意に高いことが明らかとなった。最後にこれらの結果に基づき、カプシドのVP化学量論比と内包DNA鎖長が関与するパッケージングに伴う完全粒子の生成機序を提唱した。

第4章 総括と展望

本博士論文では、AAVベクター中に存在するVP化学量論比および内包DNAに起因した不均一性を明らかにすることを目的とし、新規分析法DGE-AUCを確立し包括的な特性解析を実施した。その結果、VP化学量論比と内包DNA鎖長が関わる完全粒子の不均一性についての知見を得た。これまでAAVベクターの研究開発においては、カプシドのVP化学量論比の制御とベクターDNAの設計は独立に進められてきたが、本博士論文の成果は両者を統合したAAVベクターの新たな設計戦略に貢献するものである。総じて、有効性の高いAAVベクターを用いた遺伝子治療の推進と発展が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (廣 畑 貴 一)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	内山 進
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	大政 健史

論文審査の結果の要旨

治療用遺伝子を標的細胞に導入し疾患を治療する遺伝子治療は、根本的治療法として大きな治療可能性を示している。遺伝子治療用ベクターの中で、組換え型アデノ随伴ウイルス（rAAV）は遺伝子治療におけるリーディングプラットフォームの一つである。rAAVは野生型同様、正二十面体のカプシドが直鎖状一本鎖DNAを内包している。カプシドは3種類のウイルスタンパク質（VP）、VP1、VP2およびVP3が60個会合することで形成される。rAAVは主にヒト細胞を用いて製造されるが、完全長の設計DNAを内包した目的の完全粒子だけでなく、DNAを内包しない空粒子などの不純物粒子も生じることが知られている。これら不純物粒子は完全粒子と物理化学的特性が類似しており、確立された精製法を用いても完全に取り除くことは困難である。したがって、rAAVに含まれる粒子の内包DNAに起因する不均一性の正確な評価が求められている。また近年、完全粒子のカプシドを構成するVPの化学量論比と活性との相関が報告されており、VP化学量論比の制御も重要であることが認識されている。

そこで本博士論文ではrAAVを構成するVPおよび内包DNAの両者に着目し、内包DNAだけでなくVP化学量論比にも起因する粒子の不均一性を評価できる分析法を開発している。rAAV精製にも用いられる塩化セシウムを媒体とする密度勾配遠心（CsCl-DGUC）と同じ原理に基づく超遠心分析密度勾配沈降平衡法（DGE-AUC）を確立し、先行研究において報告されているCsCl-DGUC精製における完全粒子に浮遊密度の異なる2つの粒子成分を様々なrAAVで確認するとともに、rAAV8を用いた詳細な特性解析から、カプシドのVP化学量論比の違いが浮遊密度差を引き起こすことを明らかにしている。これにより、異なるVP化学量論比で構成されるカプシドのCsCl密度勾配中での浮遊密度差を議論し、内包DNAの鎖長に依存した浮遊密度差の変化に関する体系的な理解に至っている。また、上記の結果から示唆された、内包DNA鎖長に依存した完全粒子中のVP化学量論比の不均一性の変化について、内包DNA鎖長の異なるrAAV8を作製し、系統的な比較解析を行なっている。その結果、rAAV8の内包DNAの鎖長が長くなるに従い完全粒子のVP化学量論比の不均一性が減少し、内包DNA鎖長が短いほどカプシドを構成するVP1およびVP2の比率が高く、*in vitro*での遺伝子導入効率も有意に高いことを実証している。これらの結果に基づき最後に、rAAVの不均一性を引き起こす、カプシドのVP化学量論比と内包DNA鎖長が関与するパッケージングに伴う完全粒子の生成機序を提唱している。

以上のように本博士論文では、AAVベクター中に存在するVP化学量論比および内包DNAに起因した不均一性を明らかにすることを目的とし、新規分析法DGE-AUCを確立し包括的な特性解析を実施した結果、VP化学量論比と内包DNA鎖長が関わる完全粒子の不均一性についての知見を得ている。これまでAAVベクターの研究開発においては、カプシドのVP化学量論比の制御とベクターDNAの設計は独立に進められてきたが、本博士論文の成果は両者を統合したAAVベクターの新たな設計戦略に貢献するものである。総じて、有効性の高いAAVベクターを用いた遺伝子治療の推進と発展が期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。