OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

博士学位論文

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

2026 年 1 月

大阪大学　大学院工学研究科　生物工学専攻

高分子バイオテクノロジー領域　内山研究室

廣畑貴一

目次

第 1 章　序章

1-1.　遺伝子治療

遺伝子治療とは、外因性の治療用遺伝子を標的細胞に導入し、遺伝的異常や欠陥を修正または補充することで、疾患の治療または予防を行う手法である[1]。ここ数十年の進歩により、有効な治療法のなかった難治性疾患や先天性疾患、希少疾患に対して開発が進み[2-4]、特にがんおよび単一遺伝子疾患は、遺伝子治療において現在最も臨床研究が進んでいる領域であり、根本的治療法として大きな治療可能性を示している[5]。

遺伝子治療で用いられるアプローチは、その治療機能の特性に基づいて主に Gene replacement（遺伝子置換）、Gene addition（遺伝子付加）、Gene silencing（遺伝子サイレンシング）および Gene editing（遺伝子編集）の 4 つに分類され[6]、図 1 に模式的に示すとともに以下ではそれぞれについて説明する。

1.　Gene replacement

機能喪失型変異（loss-of-function mutation）を補充する治療用遺伝子を送達することを目的とする。具体的には、疾患の原因となっている変異遺伝子はそのままに正常な機能的遺伝子を *in situ* に導入し、機能不全になっていた標的細胞においてその機能を置換し補うのに十分な特定のタンパク質などの機能的な発現産物が生成され、標的細胞を正常な状態に回復させる。タンパク質産生の正常な生理的レベルのわずかな割合の回復でも、多くの場合疾患の症状を緩和することができるため、多くの疾患では影響を受けた組織内の細胞のみに治療用遺伝子を送達する。

2.　Gene addition

単一遺伝子疾患に留まらず、複雑な疾患や後天性疾患に対する治療が可能である。特に現在は、T 細胞にがんを標的とするキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor：CAR）

遺伝子を導入した改変 T 細胞を用いる CAR-T 療法の臨床応用が進んでいる。他にも、新しい機能的なタンパク質コード遺伝子の導入、成長因子やサイトカインの発現増加、神経栄養因子の供給や心不全やがんにおけるシグナル伝達経路の調整など、細胞の機能を強化または修正することで疾患の改善が図られる。

3. Gene silencing

機能的な遺伝子を導入する Gene replacement や Gene addition では疾患の症状改善に繋がらない機能獲得型変異（gain-of-function mutation）による単一遺伝子疾患に対して採られる手法である。主に導入遺伝子として RNA を用い、RNA 干渉により細胞内に既に存在する変異遺伝子を特異的に欠失させることで発現を抑制したり、その転写の阻害により特定のタンパク質の産生量を減少させる。

4. Gene editing

急速に進化するゲノム編集技術を用いることで疾患の原因となる変異遺伝子を直接修復し機能改善を目指す。導入遺伝子は細胞内に既に存在する DNA の一部を直接編集または修正し、その結果正常なタンパク質が産生される。このアプローチは通常、ゲノム内の標的 DNA 切断の生成と、望ましい DNA 改変をもたらす DNA 修復の二段階で行われる。また、塩基編集は二本鎖 DNA 切断を生じさせることなく塩基対を直接変換する強力な Gene editing のアプローチの一つとして台頭しており、編集効率・精度・柔軟性が大幅に向上している。

ただし、これらの分類には厳密な定義がなく、Gene replacement も含めて Gene addition とよばれたり、Gene addition は Gene augmentation（遺伝子増強）、Gene silencing は Gene suppression（遺伝子抑制）などとよぶこともある。

このうち Gene replacement は劣性単一遺伝子疾患の治療に適しており、臨床的に最も成功を収めている。ただ、前述したように gain-of-function により発症する遺伝子疾患に加えて目的遺伝子の発現調節に複雑さを伴う疾患には対応できない。このような中、

近年 CRISPER/Cas システムを始めとするゲノム編集技術が急速に進歩を遂げ、ヒト細胞への遺伝子改変効率が格段に向上している。これにより、現在主流となっている Gene replacement による遺伝子治療から、Gene editing による遺伝子治療は次世代の遺伝子治療として期待され開発が進んでいる[4]。

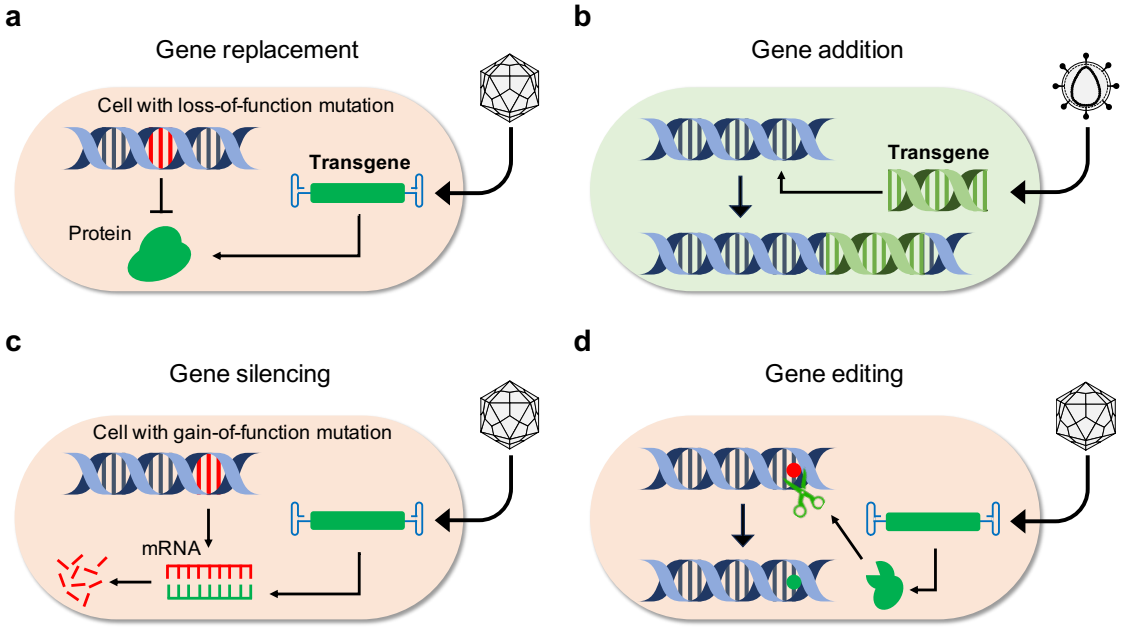


図 1.　遺伝子治療で用いられるアプローチの概略図

（a）Gene replacement

（b）Gene addition

（c）Gene silencing

（d）Gene editing

1−2.　遺伝子治療用ベクター

遺伝子治療における重要な最初のステップは、標的細胞への効率的な遺伝子導入であり、「ベクター」と呼ばれる遺伝子運搬体によって行われる[7]。このベクターとしては改変されたウイルスであるウイルスベクターが広く用いられている。これは、ウイルスが元来有する宿主細胞への侵入と自身のウイルスゲノムの導入機構を利用している。自然界に存在する野生型ウイルスのゲノムが治療用の遺伝子に置き換えられた組換え型ウイルスが作製され、様々な性質の異なるウイルスが治療の目的や標的細胞に応じて選択される。また遺伝子導入経路の違いから、患者の体内にベクターを直接導入する *in vivo* 遺伝子治療と、体外に取り出した細胞にベクターを導入した改変細胞を増殖後再び患者に投与する *ex vivo* 遺伝子治療に大別される（図 2a）[8]。ウイルスベクターを用いる *ex vivo* 遺伝子治療では、主に造血幹細胞や T 細胞などを介して遺伝子導入するため、「遺伝子治療（Gene therapy）」ではなく、「遺伝子細胞治療（Gene and cell therapy）」とよばれることも多い。

一方で、ウイルスを用いることに伴う免疫応答や染色体への組み込みによる挿入変異への懸念から、非ウイルスベクターを介した一過性遺伝子導入法も確立されている[9]。非ウイルスベクターとしては、プラスミド DNA、脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle: LNP）をはじめとしたドラッグデリバリーシステムのナノキャリアなどがある。特に LNP は COVID−19 の mRNA ワクチンのベクターとして実用化され、世界中で予防効果を示した。非ウイルスベクターはウイルスベクターに比べて、生産の簡便性と再現性、より大きなパッケージング容量という利点がある[9]。しかしながら、その遺伝子導入効率の高さからウイルスベクターの利用が進んでおり、2024 年までの承認済み遺伝子治療製品および現在臨床開発中の遺伝子治療製品のうち、遺伝子導入にウイルスベクターを利用するものの割合は 89%と報告されている[5]。また、対象疾患も腫瘍溶解性ウイルスによるがん治療から単一遺伝子疾患の治療に至るまで幅広い。

遺伝子治療用ベクターの主流であるウイルスベクターには、主にアデノウイルス（Adenovirus: Ad）、レトロウイルス、レンチウイルスおよびAAVが用いられる[5]。中でも、AAVベクターは現在*in vivo*遺伝子治療において最も用いられるウイルスベクターであり[10]、その有効性・安全性が多くの臨床試験の中で検証されている。したがって、AAVベクターは遺伝子治療用医薬品におけるリーディングプラットフォームの一つである。AAVベクターを用いた遺伝子治療用医薬品については後述する。

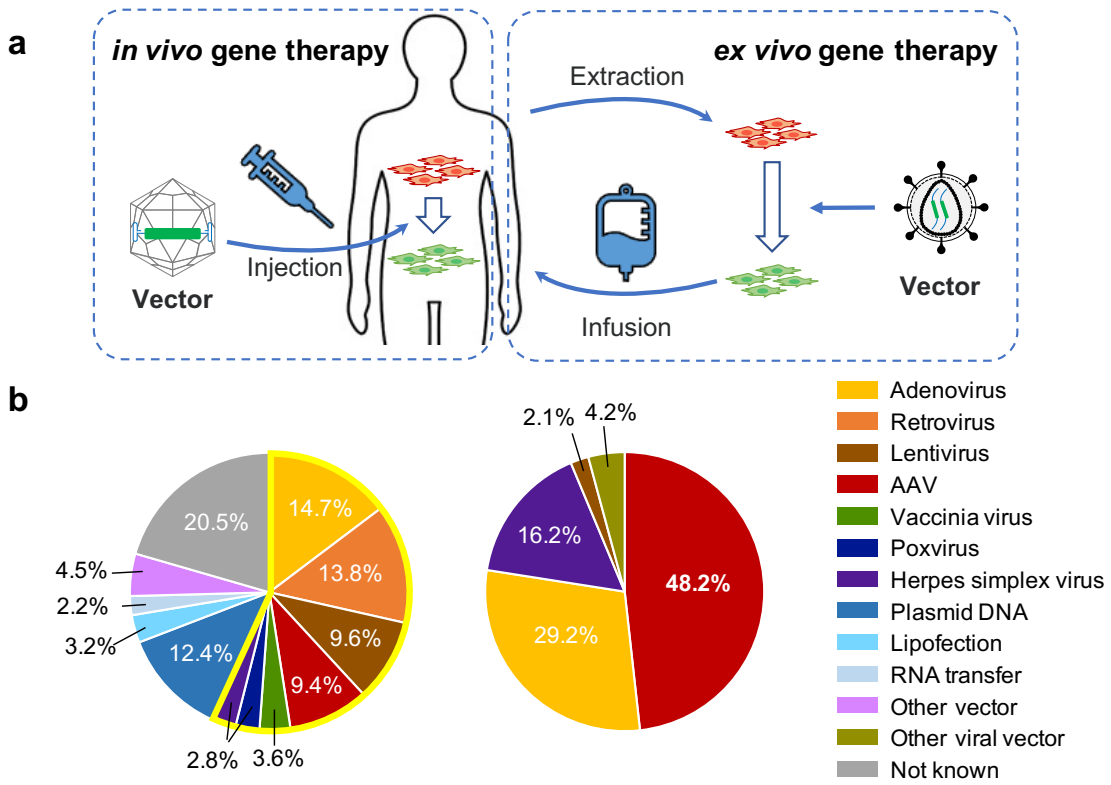


図 2.　遺伝子治療用ベクター

（a）遺伝子治療用ベクターの導入経路による分類

（b）遺伝子治療用ベクターの内訳（左）と *in vivo* 遺伝子治療に用いられるウイルスベクターの内訳（右）

引用文献 4 および 9 を元に改変・作成した。

1-3.　wtAAV のウイルス学

1-3-1.　wtAAV のウイルス学的特徴

野生型 AAV（wild-type AAV：wtAAV）は 1960 年代半ばに Ad の培養系の混入物として初めて発見された [11,12]。AAV は自律的な増殖能を欠損したウイルスであったことから、パルボウイルス科（the family *Parvoviridae*）パルボウイルス亜科（the subfamily *Parvovirinae*）デペンドパルボウイルス属（the genus *Dependoparvovirus*）に分類される [13]。AAV は直鎖状 1 本鎖 DNA ウイルスであり、エンベロープをもたず直径約 25nm の T=1 の正二十面体のカプシド構造をとる [14]。AAV は自然界に存在するごくありふれたウイルスのひとつであり、一般的に若年期の感染により、成人の多くが抗 AAV 中和抗体を有しているとされている [15,16]。抗体陽性率に関する調査は世界的に数多く行われているが幅広い結果が報告されており、地理的要因など複数の要因が影響していると考えられる [17,18]。日本においては、高齢層になるほど抗体陽性率や抗体力価が高いことが認められている [19,20]。しかし wtAAV は病原性がなく、ヒトへの感染と何かしらの病理との明確な関連はこれまで知られていない [21]。後述の通り AAV にはさまざまな血清型が存在するが、中でも AAV 2 型（AAV2）は最初にヒト血清から単離され、最も広く研究されてきている。1980 年代に wtAAV2 ゲノムのクローニングと塩基配列決定が成功して以来 [22,23]、AAV のゲノムやウイルスタンパク質、カプシド、および生活環に関する情報のほとんどが AAV2 の研究により蓄積された知見である。したがって、以下でも主に AAV2 の特徴を述べる。

wtAAV のカプシドには一本鎖 DNA （single-stranded DNA：ssDNA）の相補的なプラス鎖およびマイナス鎖がほぼ同等の頻度で個々のカプシドに内包される [24-26]。全長約 4.7kb の AAV ゲノムには *rep* 遺伝子と *cap* 遺伝子の２つの遺伝子が存在し、これらが両端の inverted terminal repeat（ITR）に挟まれている。145 塩基の ITR は逆位反復配列になっており、最初の 125 塩基が塩基対形成によりＴ字型のヘアピン構造をとる [27,28]。

このITRの二次構造は、図3に示すように長い「軸」のA−A’配列（A’配列はA配列と相補的）に組み込まれた二つの隣接した「腕」のB−B’配列およびC−C’配列からなる。ITRはflipとflopとよばれる二つの配置をとり、それぞれB−B’配列とC−C’配列が3’末端側の「腕」に最も近い位置になる[28]。ITRの残りの20塩基のD−D’配列は「軸」のA−A’配列に続くが、ゲノム全体で隔てられているため塩基対を形成しない[29]。ITRは宿主細胞内におけるゲノム複製の複製起点としての役割に加えて、ゲノムのパッケージング、転写、および部位特異的組み込みにも必須である。

*rep*遺伝子と*cap*遺伝子の2つのオープンリーディングフレーム（open reading frame: ORF）はそれぞれ、非構造タンパク質とウイルスタンパク質（viral protein：VP）をコードしている[30]。p5プロモーターからRep78およびRep68のlarge Repタンパク質が、p19プロモーターからRep 52およびRep40のsmall Repタンパク質がコードされる。これら4種類の異なるRepタンパク質は遺伝子調節、ゲノム複製、転写、カプシド形成を担う。もう一つのORFは、p40プロモーターから３つのVPを産生する[31]。これらVPは重複したリーディングフレームをもち、配列の長い順にVP1、VP2およびVP3と定義される。そのため、VP1およびVP2はC末端側にVP3共通領域としてVP3の全配列（735残基）を有する。加えてVP2はVP1/VP2共通領域と呼ばれる65残基（残基番号：138−202）のN末端配列を含み、更にVP1はこれに加えてVP1ユニーク（VP1u）領域と呼ばれる137残基のN末端配列も含まれている。カプシドはこれらVPが60個会合して形成され、およそ1：1：10のモル比、すなわち5個のVP1、5個のVP2および50個のVP3で構成されると考えられている[32,33]。

また、VPをコードする*cap*遺伝子のORFからのフレームシフトにより非典型的開始コドンから翻訳される2種類のアクセサリータンパク質も発見されている[34,35]。assembly−activating protein（AAP）は効率的なカプシド形成に不可欠であり[36]、membrane−associated accessory protein（MAAP）はAAVの分泌調節に関わると報告されている[37]。

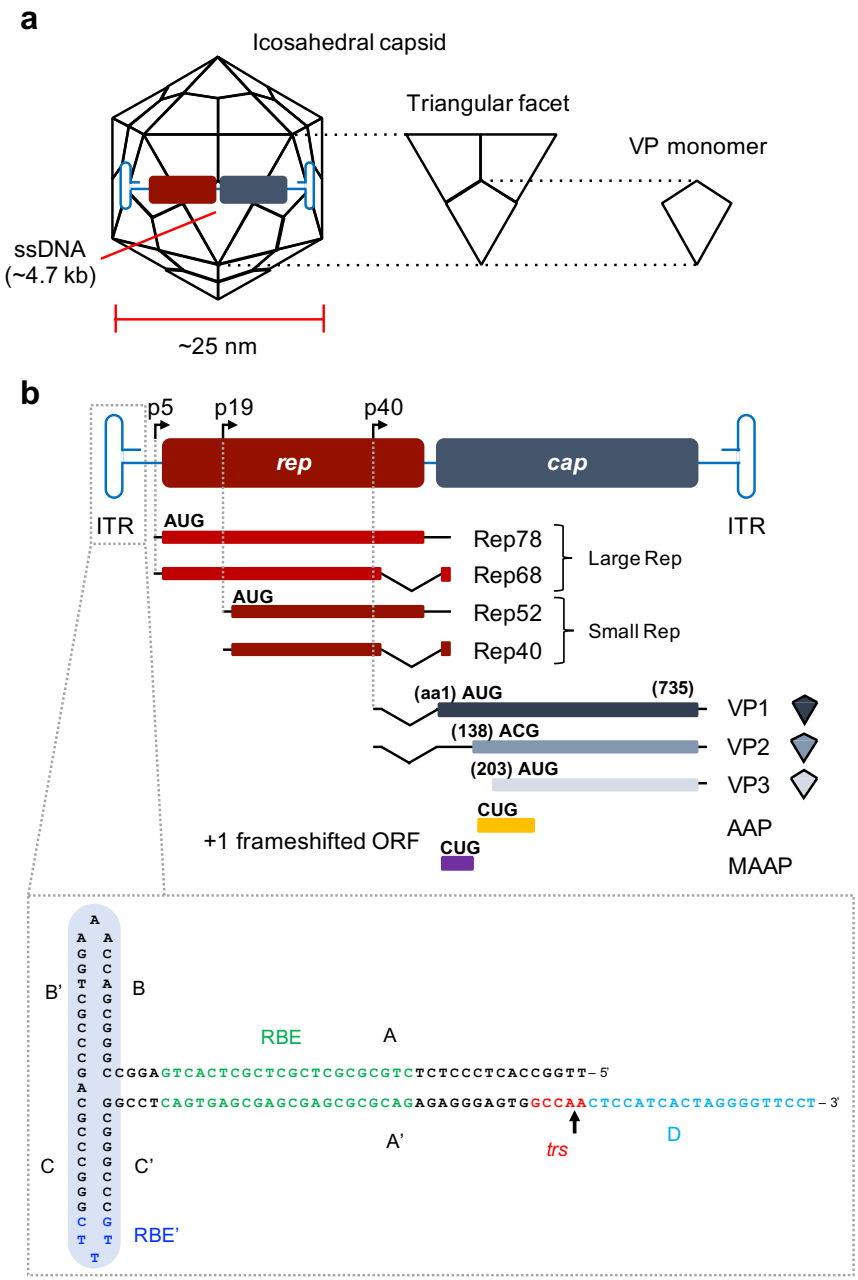


図 3.　wtAAV の構造

（a）基本構造およびカプシド構造

（b）ゲノム構造および 5' ITR の配列と flip 配置での 2 次構造

1-3-2.　wtAAV の生活環

wtAAV の生活環はヘルパーウイルスの存在の有無で大きく異なり、latent phase と lytic （productive） phase に分けられる。Ad や単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス非存在下、つまり AAV 単独で宿主細胞に感染した場合は潜伏感染となり、染色体へ部位特異的に組み込まれる。当初この組み込みはランダムに起こると考えられていたが、第 19 番染色体長腕の AAVS1 と呼ばれる領域へ組み込まれることが明らかとなり[38-40]、Rep タンパク質がこの組み込み標的化に関与することが示唆されている。ヘルパーウイルスが AAV と同時感染したり、AAV が潜伏感染している細胞に重感染する場合、AAV は増殖期に入る。その結果、AAV のゲノム複製と遺伝子発現によりウイルス粒子の産生と放出が起こる溶解感染となる。

AAV の感染経路は主に、細胞への侵入、エンドサイトーシス経路からの脱出と核への移行（合わせて細胞内移動）、ウイルスゲノムのカプシドからの脱殻、ssDNA からの相補的な第二鎖の合成、ゲノム複製、ゲノムのパッケージングの過程に分けられる（図 4）。

AAV は主に細胞膜のプロテオグリカンや糖鎖をレセプターとして認識し、またその他さまざまなコレセプターを使用した相互作用により細胞へ侵入する。細胞内へ侵入した AAV は、エンドサイトーシス経路に沿って細胞内を移動する。通常、エンドサイトーシスによって取り込まれたタンパク質は最終的にリソソームまで運ばれて分解される。しかし、AAV は VP1u 領域に有しているホスホリパーゼ活性をもつ phospholipase A2（PLA2）ドメインによるエンドソームエスケープと呼ばれる機構によりその分解から逃れることができる。PLA2 ドメインは生理的条件下ではカプシドの内部にあるが、エンドサイトーシスの進行に伴う pH の低下により PLA2 ドメインが外在化する構造変化が生じ、エンドソームの脂質二重層の分解が誘導され、エンドソーム/リソソームの分解経路から逃れると提唱されている。その後、AAV は宿主細胞の核膜孔複合体を通って核内に

移行しssDNAであるゲノムを放出する。複数の先行研究により、AAVは細胞内に取り込まれてから数時間で核の周囲に蓄積し、ゲノムが核に放出されることが確認されている。一方で、エンドソームエスケープ後のAAVの細胞内輸送、また核内でのゲノムのカプシドからの脱殻と放出に関する詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

放出されたゲノムは宿主細胞の核で複製されるが、この複製にはRepタンパク質が中心的な役割を果たすことが知られている。wtAAV に感染した細胞において、生産的複製の最初の段階は、放出された ssDNA を転写の鋳型として機能する二本鎖 DNA（double-stranded DNA：dsDNA）へ変換することである。この複製はself-primingによる一方向の鎖置換型で行われる（図 5)。つまり、ITR のヘアピン構造が複製起点となり、宿主細胞のDNAポリメラーゼによるDNA合成のプライマーとして機能し、3’-OHからゲノムの末端まで相補的な第二鎖を伸長させる。この転写活性を有するdsDNA鋳型はreplicative form（RF）DNAと呼ばれ、転写により合成されたmRNAが細胞質へ運ばれることでRepタンパク質およびVPが産生される。ITRのA-A’配列中の5’-GNGC-3’の反復配列を含むRep binding element（RBE）にRep78およびRep68が特異的に結合する[41]。続いてこれらlarge RepのATP依存性DNAヘリカーゼ活性によりdsDNAをssDNAにほどくことで、terminal resolution site（*trs*）にlarge RepのN末端の鎖および配列特異的、すなわち部位特異的エンドヌクレアーゼ活性がはたらき、ニックが導入される。この切断部位が3’-OHを提供することで、A-A’配列から相補的なITRのDNA鎖を伸長させDNAゲノム全長の複製が完了する。この複製過程において、ITRのヘアピン構造の頂点に位置するもう一つのRep binding element（RBE’）はlarge RepとITR間の結合を安定化させ[42]、D配列もこのゲノム複製と続くパッケージングに関与している。

VPはVP1uおよびVP1/VP2共通領域に存在する核局在化シグナル（nuclear localization signal：NLS）様モチーフの塩基性領域（basic region: BR）あるいはAAPの役割により、

細胞質から宿主細胞の核へ移動する。核で VP が会合することでカプシドが形成され、Rep52 および Rep40 の small Rep が介在することで、複製されたウイルスゲノムのパッケージングが行われ、AAV が増殖する。

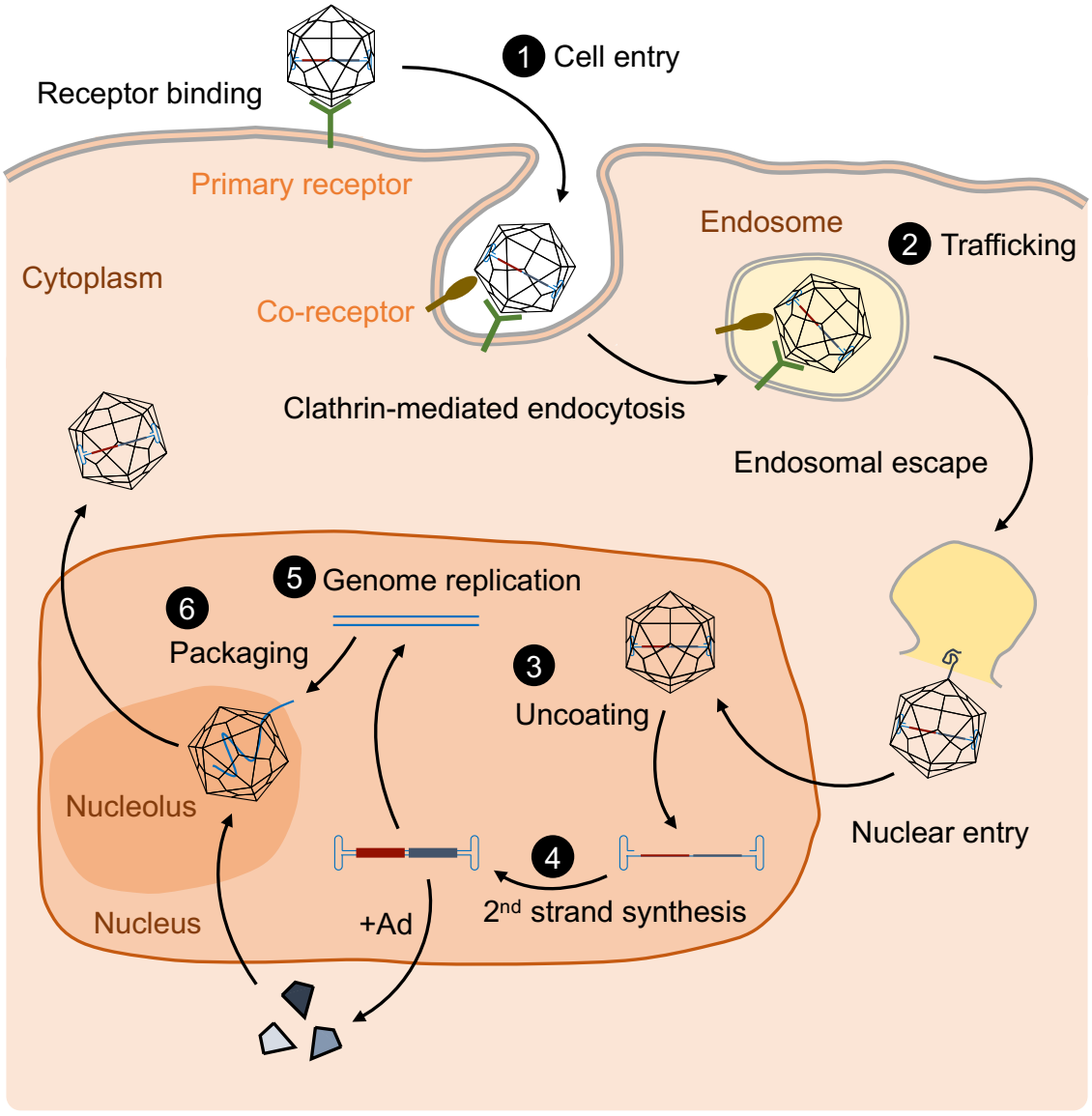


図 4.　wtAAV の生活環の概略図

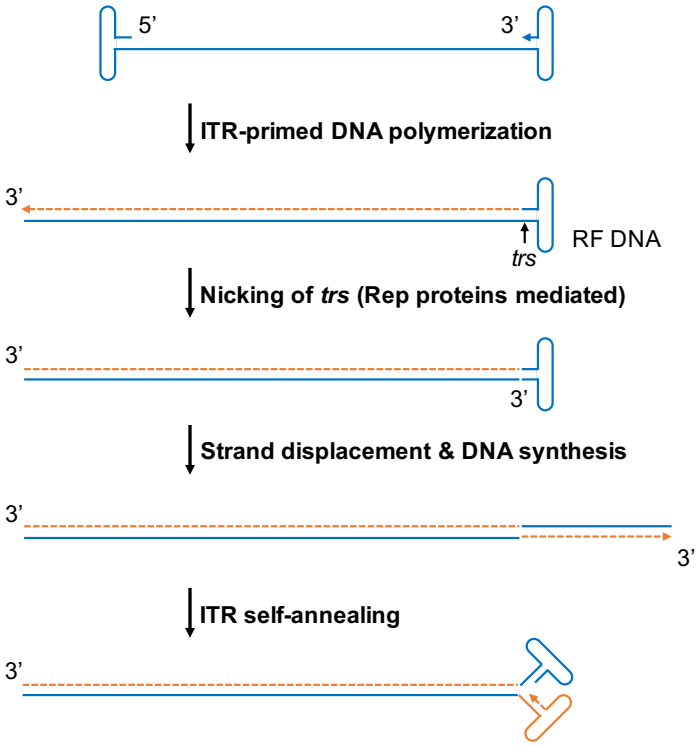


図 5.　wtAAV の DNA 複製過程

1-3-3.　wtAAV の血清型と組織指向性

wtAAV は最初の発見以来、少なくとも 13 の血清型（AAV1–AAV13）と 1000 以上の変異体が、Ad 株、ヒト／非ヒト霊長類（non-human primate：NHP）、その他の哺乳類または非哺乳類から単離・同定されている[43]。自然界に存在する霊長類 AAV は VP1 の配列に基づき系統学的にクレード A–H に分類され、AAV5 が他と異なる最も特徴的なクレードである[44,45]。デペンドパルボウイルス属は、the species *Adeno-associated dependoparvovirus* A（AAV1–AAV4 および AAV6–AAV13）と *Adeno-associated dependoparvovirus* B（AAV5、ウシ AAV および ヤギ AAV）に分類される[13]。ただし、血清型の正確な定義が、「新しく単離された血清型が，他のすべての既存の血清型に特異的な中和抗体と効率的に交差反応しない」ことには留意する必要がある。主な血清型の AAV のうち AAV2、AAV3、AAV5、AAV6 および AAV9 はヒトの血清から，他の血清型は NHP の血清から発見された。NHP の中でもアカゲザル（rhesus macaque）から単離された血清型は AAVrh10 のように表記される。血清型間のゲノム差異は主に VP 配列の可変領域、特に VP3 に認められ、細胞侵入時に結合する細胞表面受容体の種類や、ゲノムを導入する標的細胞が血清型により異なる。これがさまざまな細胞や組織に対して指向性を示すという AAV の特徴となっている。

表 1.　wtAAV の血清型の由来、受容体、ヒトに対する組織指向性

Serotype	Origin	Primary receptor	Tissue tropism in human
AAV1	NHP	N-linked sialic acid	Skeletal muscle, central nervous system, airway, retina, pancreas
AAV2	Human	Heparan sulfate proteoglycan	Retina, central nervous system
AAV3	Human	Heparan sulfate proteoglycan	Liver
AAV4	NHP	O-linked sialic acid	Lung
AAV5	Human	N-linked sialic acid	Retina, central nervous system, kidney, pancreas, liver
AAV6	Human	Heparan sulfate proteoglycan, N-linked sialic acid	Airway, central nervous system
AAV7	NHP	Unknown	Liver
AAV8	NHP	Unknown	Liver, central nervous system, retina
AAV9	Human	Galactose	Heart, central nervous system
AAV10	NHP	Unknown	Unknown
AAV11	NHP	Unknown	Unknown
AAV12	NHP	Unknown	Unknown
AAV13	NHP	Unknown	Unknown

N-linked/O-linked sialic acid： N-結合型/O-結合型糖鎖末端シアル酸、Heparan sulfate proteoglycan： ヘパラン流酸プロテオグリカン、Galactose： ガラクトース、Skeletal muscle： 骨格筋、Central nervous system： 中枢神経系、Airway： 気道、Retina： 網膜、Pancreas：膵臓、Liver：肝臓、Lung：肺、Kidney：腎臓、Heart：心臓

引用文献 41 を元に改変・作成した。

1−4.　rAAV の開発と応用展開

1−4−1.　rAAV の遺伝子治療用ベクターとしての特徴

wtAAV は 1−3 で前述した通り感染によりヒトへの病原性を示さないことから、しばらくはウイルス学的な研究対象として大きな関心は集めなかった。しかしながら、その非病原性や低い免疫原性に加えて、非分裂細胞へ効率的に遺伝子導入が可能で、長期間にわたって遺伝子発現が持続するといった遺伝子治療用ベクターに望ましい特性から、組換え型 AAV（recombinant AAV：rAAV）の研究が行われた。この研究分野は“Vectorology”と呼ばれ、wtAAV の基本的なウイルス学および生物学知見に基づき、生物工学や遺伝子工学などの技術を用いてベクターの開発が進められ、遺伝子治療への応用展開が導かれてきた[46]。

治療用遺伝子のベクターDNA の基本的な設計としては、ITR がゲノムの複製や組み込み、カプシドへのパッケージングに必須の唯一のシスエレメントであることから、wtAAV ゲノム中の両末端の ITR のみを残して、*rep*/*cap* 遺伝子を治療用遺伝子と調節エレメントに置換する。その結果、wtAAV のような染色体への部位特異的組み込みは起こらず、非分裂細胞からなる組織においては、染色体へのランダムな組み込みが極めて低頻度で起こると考えられている。*rep* 遺伝子および *cap* 遺伝子はトランスに導入可能であることから基本的にトランスに発現され、またベクターDNA と共通する塩基配列を有さないようにすることで、wtAAV のゲノムと同じく増殖能を有する（replication−competent AAV：rcAAV）の形成を防ぐ[47]。

遺伝子治療用ベクターとして AAV を用いる更なる強みは、組織指向性の異なる血清型から治療目的に応じて選択可能な点である。しかし、標的細胞への効率的な治療用遺伝子の送達が難しい場合や、用いる血清型に対する中和抗体を保有していたり、複数の血清型に対する抗体の交差反応性を考慮すると、免疫応答を誘導する懸念もあった。そこで、近年カプシドのアミノ酸配列への変異導入やアミノ酸配列の挿入といったカプシ

ド改変（カプシドエンジニアリング）が盛んに研究されており、さまざまなカプシド変異体の AAV ベクターが開発され応用範囲が更に広がっている[48]。代表的なものとしては、血液脳関門を高効率で透過できる AAV−PHP.B や[49]、改良型の AAV−PHP.eB[50]、幅広い組織と細胞種に対して高い導入効率を示す AAV−DJ[51]、高効率な逆行性遺伝子導入が可能な AAV2−retro[52]、網膜および内耳への AAV2.7m8[53]、筋肉への MyoAAV などがある[54]。

また、核内で導入遺伝子を発現するためには、wtAAV の複製時と同様、ssDNA のベクターDNA の脱殻後、第二鎖の合成による転写鋳型の RF DNA の形成が必要である。この ssDNA が転写活性をもつための律速段階をバイパスするため、改変型の自己相補性 DNA（self−complementary DNA：scDNA）が開発された[55]。これは、脱殻後直ちにベクターDNA の全長にわたって自己アニーリングし、dsDNA 鋳型を形成する。実際、scDNA の AAV ベクターは ssDNA の AAV ベクターと比較して、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても導入遺伝子発現が早期にピークに達しながら著しく増加させ、持続させることが示され、少量のベクターで高い発現レベルが得られる[56]。一方で、この大きな利点は scDNA での大幅なパッケージング容量の減少というトレードオフを伴っている。これは scDNA が実質的にベクターDNA の 2 つの相補的な配列を含むためであり、従来の ssDNA の半分程度の~2. 5 kb の小さい導入遺伝子に制限される[43]。

更に、rAAV は遺伝子治療用ベクターとしての応用だけでなく、wtAAV の感染を特徴付ける分子間相互作用を研究する強力なツールも提供してきた。例えば、カプシドに結合する因子や遺伝子導入に影響を与える因子を同定するための高スループットスクリーニングが数多く実施されている。その結果 AAV に対する知見が更に深まり、新たな知見に基づいて改良された AAV ベクターの開発が行われるというサイクルも活発化している。

1−4−2.　rAAV の生産法

遺伝子治療用 AAV ベクターの生産法にはいくつかの方法があるが、臨床応用のためには 1 治療あたり 1×10^{15}-1×10^{16} 力価すなわちベクターゲノム（vector genome：vg）のベクター量が必要とされており、大量生産が必要である[57]。そのため現在主にツマジロクサヨトウ（*spodoptera frugiperda*）由来の昆虫細胞株（Sf9 細胞）もしくはヒト胎児腎由来の細胞株である Human Embryonic Kidney（HEK）293 細胞による生産が行われている。

Sf9 細胞を用いた生産法では組換え型バキュロウイルスが Sf9 細胞に感染して rAAV を生産するため、Baculovirus Expression Vector System（BEVS）と呼ばれる[43]。第一世代の BEVS では、*rep* 遺伝子、*cap* 遺伝子およびベクターゲノムをそれぞれコードした 3 つの組換え型バキュロウイルスを Sf9 細胞に重感染させる[58]。この生産系では rAAV1 の生産に成功したものの、他の血清型の rAAV では生産性は大幅に低かった[43]。そのため、1 つの組換え型バキュロウイルスに *rep*/*cap* 遺伝子をコードすることで 2 種類に減らした組換え型バキュロウイルスが同時感染する第二世代の BEVS（two-Bac system）が確立された[59]。これにより、他の血清型への適応性が広がり現在多くの BEVS プラットフォームで主流となっている。更に、1 種類の組換え型バキュロウイルスのみで生産できるように改良された OneBac system も構築されている[60]。これは、*rep*/*cap* 遺伝子を組み込んだ改変 Sf9 細胞株が作製により、ベクターゲノムをコードする組換え型バキュロウイルスの感染のみで高収量を実現している[61]。BEVS は高収量な浮遊培養系が確立されており、スケールアップが容易で低コストである一方で、精製時に不純物のバキュロウイルスの除去が必要であること、細胞増殖に伴い組換え型バキュロウイルスが不安定であることが欠点として挙げられる[62]。

HEK293 細胞を用いた生産法においては、導入遺伝子を含むベクターゲノム、*rep*/*cap* 遺伝子、および AAV の増殖に必要なヘルパー作用を有する Ad 遺伝子をそれぞれコー

ドする 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞に導入する、一過性トリプルトランスフェクション生産系が現在でも最も利用されている[63]。なお、AAV の複製にヘルパー活性を有するいくつかのウイルスの中で Ad が最も高い AAV 収量をもたらすことから、当初は Ad を同時感染させる系が利用されていた。しかし BEVS でのバキュロウイルスと同様 Ad を用いた場合、精製時に不純物の Ad の除去が必要であるという課題があった。Ad のヘルパー作用をもつ遺伝子領域（E1A、E1B、E2A、E4orf6、VA1 RNA）が特定されたことにより[64]、Ad ヘルパープラスミドが作製され Ad フリーシステムとなった[65,66]。E1A は p5 および p19 プロモーターをトランスに活性化し、E1B は mRNA の安定化並びに核から細胞質への mRNA の移行などを促進する。また、E1B と E4orf6 産物の複合体が ssDNA からの第二鎖の合成を促進する。E2A 産物と VA1 RNA は p40 プロモーターからの翻訳を促進する[67]。このうち、HEK293 細胞は元来 E1A および E1B を発現するため、残りの E2A、E4orf6、VA1 RNA がヘルパープラスミドにコードされている。HEK293 細胞による生産はプラスミド構築が容易であり種々のカプシドや導入遺伝子の rAAV の生産に柔軟な点が利点としてあげられる。また接着細胞だけでなく浮遊細胞を用いた生産系も確立されとことにより、かなりの程度までスケールアップや収量の向上が実現されている。一方で、バッチ間の品質、力価、純度にばらつきが生じることや生産過程が煩雑なため労働集約的でありコストが高いという欠点がある[43]。

本研究においても実施した HEK293 細胞へのトリプルトランスフェクションによる rAAV の生産を図 6a に模式的に示している。この生産プロセスは、図 4 に示した wtAAV 感染後の核内での DNA 複製経路と類似している。主な相違点としては、rAAV 生産では 3 種類のプラスミドが細胞内の核に異所的に導入され、*rep*/*cap* 遺伝子をコードしたパッケージングプラスミドから Rep タンパク質が発現されることで、別のプラスミドにコードされたベクターゲノムの複製とパッケージングが直ちに開始できる点である。一般的に、ベクターゲノムには wtAAV2 由来の ITR が用いられ、パッケージングプラス

ミドも wtAAV2 由来の *rep* 遺伝子がコードされている[68]。そのため、*rep* 遺伝子の下流の *cap* 遺伝子が産生する rAAV のカプシドの種類に応じて変更される。したがって、AAV ベクターの血清型を示す場合、例えば AAV2/8 のように、慣例的に最初の数字が *rep* 遺伝子の血清型（wtAAV2）、2 番目の数字が *cap* 遺伝子の血清型（wtAAV8）と表記される。しかしながら、先述の通り多くの場合 wtAAV2 由来の *rep* 遺伝子を使用しているため、最初の「2/」は省略され単に AAV8 と表記される。したがって、本博士論文の中でもこの表記に従うこととする。

標的細胞における rAAV の遺伝子導入（図 6b）に関しても wtAAV の感染プロセスと類似しているもののいくつかの相違点がある。一つは、非分裂細胞におけるベクターゲノムから転写用の dsDNA 鋳型合成が、wtAAV での第二鎖合成とは異なり、主に個々の rAAV カプシドから脱殻し核内で共存するプラス鎖とマイナス鎖の鎖間アニーリングを経て達成されると考えられている。もう一つは、dsDNA 鋳型となったベクターゲノムは ITR 領域の再結合を通じて、コンカテマーとなることである[69]。これらは、核内の染色体外で転写活性を有する環状 2 本鎖 DNA（エピソーム）として長期に持続させることができる[70]。コンカテマーの形成やその持続性に関わるメカニズムや因子はほとんど解明されておらず、また各細胞内に保持されるエピソームの数やコンカテマー内で同時に発現する導入遺伝子の数に関しても不明である[67]。なお、導入遺伝子の発現はコンカテマーに加えて dsDNA 鋳型となった単一のベクターゲノムからも起こることが知られている。

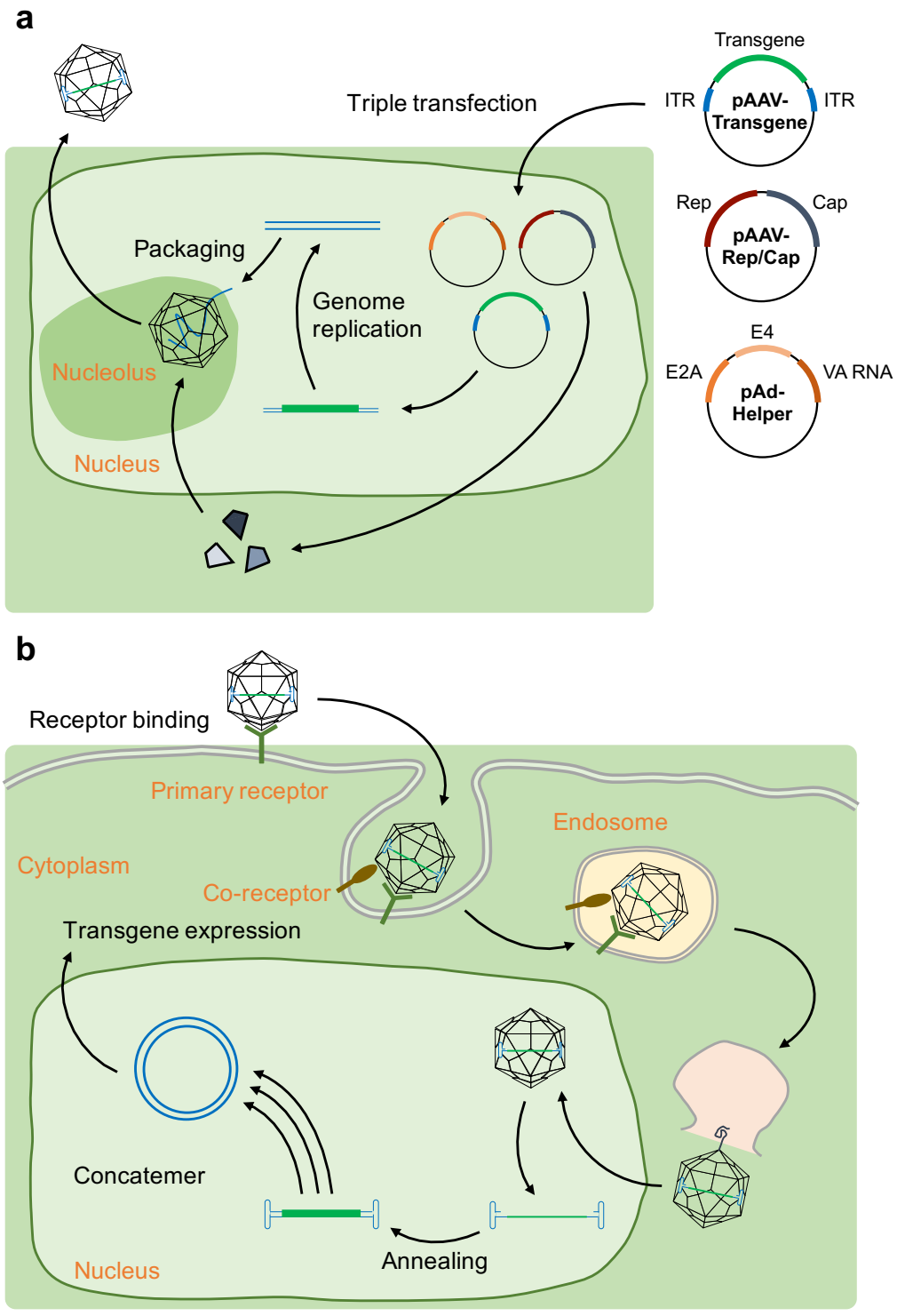


図 6.　rAAV の（a）生産と（b）遺伝子導入の概念図

1−4−3.　rAAV の精製法

前節で詳述した手法で産生された rAAV 粒子を生産細胞から回収し、生産プロセス由来の不純物や目的の粒子とは異なる形態の目的物由来不純物から、完全長のベクターDNA を内包した目的の完全粒子（Full）を分離する方法論はこれまで数多く報告されている[71]。特に rAAV 産生中に多量に生じるベクターDNA を内包しない空粒子（Empty）は、AAV ベクター中に含まれると、標的細胞において Full と競合し遺伝子導入効率を低下させたり免疫原性を有することから[72]、Empty を分離し純度の高い Full を回収することが主たる目的となる[71,73]。

多くの血清型の AAV が生産細胞中から放出され培養培地に存在することから[74]、生産細胞を溶解させ、ベンゾナーゼを加えた後遠心により細胞ペレットと分離し（凍結融解などにより細胞破砕を行う場合もある）、限外濾過に通すことで粗な rAAV を回収する。回収した rAAV の精製には、最も古典的なウイルスの精製法である密度勾配遠心法（density gradient ultracentrifugation：DGUC）が現在まで広く用いられている。DGUC は密度勾配中での Full と Empty の浮遊密度（buoyant density）や沈降係数の違いに基づいて分離が達成され、rAAV の血清型（カプシドの種類）やベクターDNA の種類に関わらず汎用的に用いることができる[71,75]。密度勾配を形成する媒体として塩化セシウム（Cesium chloride：CsCl）だけでなく、イオジキサノール（Iodixanol）やショ糖（スクロース）も用いられている[75−77]。異なる媒体による rAAV 精製の比較も行われており、CsCl を用いた DGUC はイオジキサノールを用いた場合と比べて、必要な工程数が多く長時間を要する一方で Full と Empty の分離がよく、回収した Full が高純度であることが確認されている[78]。DGUC を用いることで高純度な Full や Empty が回収できるため、ラボスケールでの基礎研究や種々の特性の比較研究などのための精製法として選択されている。また、分取用遠心機のスケールアウトにより前臨床試験の必要量程度まで扱うことが可能である。

しかしながら、臨床や商業応用を目的としたより大規模生産のためにはスケールアップに限界があり、またスループットが低いことから、近年はカラムクロマトグラフィーによる精製法の開発が盛んに行われている[71, 79]。この手法では、宿主細胞タンパク質・DNA、残留プラスミドなどの生産プロセス由来の不純物からrAAV粒子を効果的に分離することが可能である。rAAV の精製では主に、アフィニティークロマトグラフィー（affinity chromatography： AC）やイオン交換クロマトグラフィー（ion exchange chromatography：IEC）が利用されている。ACカラムの樹脂には、rAAVのカプシドに特異的に結合するアフィニティーリガンドが固定化されている。最も初期のACカラムにはAAVのレセプターとしてHSPGが同定されていたことから、ヘパリンアフィニティ樹脂が採用された[57]。最近では、幅広い血清型の AAV のカプシドへの親和性を有する抗体由来のリガンドが、AAV 結合の特異性と汎用性の点から主流となっている。特にラクダ科のラマの単一ドメインの（VHH）フラグメント抗体であるナノボディはその安定性に加え、多くの血清型のAAVだけでなく改変されたAAV カプシドも高い回収率で精製可能である[80, 81]。IEC では、rAAV 粒子表面の正味電荷とカラムに固定化されたイオン樹脂の静電的相互作用によってカラムマトリックスと相互作用する。また、Fullと Emptyの等電点（isoelectric point: pI）の差（Full: pI = ~5.9、Empty: pI = ~6.3）に基づき、Full を効率的に回収できる[71]。特に、陰イオン交換クロマトグラフィー（anion exchange chromatography：AEX）は高効率に純度の高いFullを回収可能である。これらカラムクロマトグラフィー法によるrAAV 精製は、堅牢で再現性が高く、自動化やスケールアップが可能であるといった利点がある。しかしながら、AC では、Full と Empty を選択的に分離することはできず分離のためにはプロセス条件の検討が必要であることや、IEC の分離はrAAVの pIと緩衝液の pHに影響される相互作用により行われるため、rAAVの血清型や改変カプシドおよびベクターDNAの種類に応じて最適化する必要がある。これらの背景を踏まえた上で本研究においては、スケールアップへの柔軟性

も考慮しつつ、純度の高い rAAV 粒子を回収できることから、AC と DGUC を組み合わせた精製を採用した。

1-4-4.　rAAV を用いた遺伝子治療用医薬品

現在までに日本を含めて欧米で承認された 8 品目の AAV ベクターを用いた遺伝子治療用医薬品を表 2 にまとめた[47,82,83]。AAV ベクターを用いた初めての遺伝子治療用医薬品である Glybera は、欧米で初めて承認された遺伝子治療用医薬品でもある。第一世代の BEVS に基づいて製造されたことが知られており[57,58]、AAV1 にリポタンパク質リパーゼ欠損症の治療のために LPL をコードする遺伝子の高活性変異体を送達する。米国で初めて承認された AAV ベクターを用いた遺伝子治療用医薬品の Luxturna および続く Zolgensma は日本でも承認されている。Upstaza は Luxturna 同様初期に研究が進んだ AAV2 を用いた遺伝子治療用医薬品であり、Glybera、Luxturna および Upstaza はそれぞれ脚の筋組織、網膜、および被殻内への局所投与の投与方法を採っている。Zoigensma は静脈注射による全身投与であるが、中枢神経への指向性が高い AAV9 や遺伝子発現を促進する scDNA が用いられている[47]。これらの AAV ベクターは CMV のような最も強力なユビキタスプロモーターを採用している。実際、これらのユビキタスプロモーターは *in vitro*/*ex vivo*/*in vivo* およびヒト臨床試験での AAV 導入遺伝子の発現にも広く利用されている[6]。しかし近年では、組織あるいは細胞特異的プロモーターの使用が増加している。実際、Roctavian 以降は組織特異的プロモーターが採用されており、Roctavian、Hemgenix および Beqvez では肝臓特異的プロモーター、日本でも承認された Elevidys はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療のための短縮型ジストロフィン(マイクロジストロフィン）遺伝子が骨格筋, 心筋で高発現するプロモーターを用いている。そのため、いずれも静脈注射による全身投与となっている。また、Elevidys はヒト由来の AAV ベクターよりも免疫原性が低いアカゲザル由来の AAVrh74 ベクターであり、Beqvez ではこの AAVrh74 の改変カプシドが使用されている。このような承認済 AAV ベクターでのベクターDNA の設計の最適化や改変カプシドの使用は生物学的な知見の蓄積と遺伝子工学の革新的な進歩が臨床研究にも応用され実用化に繋がっていることを明確に示し

ている。また、承認された AAV ベクターを用いた遺伝子治療用医薬品は全て Gene replacement による単一の（劣性）遺伝子疾患の治療を目的としたものであるが、Gene addition、RNA を標的としたタンパク質発現の制御や標的ゲノム改変のための Gene editing など、多様な治療アプローチによる遺伝子治療の臨床試験が進行している[84]。

表 2.　現在までに承認されている AAV ベクターを用いた遺伝子治療用医薬品

Drug	Manufacturer	Approval year	Indication	Administration route	Capsid	Promotor	Transgene	Production
Glybera	uniQure	2012[1)]	LPLD	Intramuscular injection	AAV1	CMV	LPL	BEVS
Luxturna	Spark Therapeutics	2017[2)] 2018[1)] 2023[3)]	Retinal dystrophy (biallelic RPE65 mutation)	Subretinal injection	AAV2	CβA	RPE65	Adherent HEK293/transient triple transfection
Zolgensma	Novartis (AveXis)	2019[2)] 2020[1), 3)]	SMA	Intravenous injection	AAV9	CβA	SMN1	HEK293/triple transfection
Upstaza	PTC Therapeutics	2022[1)] 2024[2)]	AADCD	Intraparenchymal injection	AAV2	CMV	DDC	–
Roctavian	BioMarin	2022[1)] 2023[2)]	Hemophilia A	Intravenous injection	AAV5	HLP	FVIII-SQ	BEVS
Hemgenix	CSL Behring	2022[2)] 2023[1)]	Hemophilia B	Intravenous injection	AAV5	LP1	FIX-Padua	BEVS
Elevidys	Sarepta Therapeutics	2023[2)] 2025[3)]	DMD	Intravenous injection	AAVrh74	MHCK7	Micro-dystrophin	HEK293/ transfection
Beqvez	Pfizer	2024[1), 2)]	Hemophilia B	Intravenous injection	AAVRh74var	ApoE/hAAT	FIX-Padua	–

1）欧州医薬品庁、2）米国食品医薬品局、3）医薬品医療機器総合機構、LPLD：リポタンパク質リパーゼ欠損症、Retinal dystrophy：網膜ジストロフィー、SMA：脊髄性筋萎縮症、AADCD：芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、Hemophilia A/B：血友病 A/B、DMD：デュシェンヌ型筋ジストロフィー、Intramuscular/Subretinal/Intraparenchymal/Intravenous injection：筋肉内/網膜下/実質内/静脈内投与

引用文献 45、80 および 81 を元に改変・作成した。

1−5.　本博士論文の構成

これまでに述べたように、遺伝子治療の分野においてAAVベクターの実用化は急速に進んでいる。AAV は単純な構成からなるウイルスではあるが、現在世界の医薬品の売上の上位を占める抗体と比較すると、核酸タンパク質からなる非常に複雑な高次構造体である。そのため、前述したように生産細胞を用いたAAVベクターの製造では、目的のFullだけでなく多量のEmptyも生じる。加えて、近年の分析技術の進歩に伴いEmptyの他にも目的物由来の不純物として、断片 DNA を内包した部分粒子（partially filled: Partial）や総じて完全長のベクターDNAより長いDNAを内包した過剰充填粒子（extra filled: Extra）および凝集体などが確認され、AAVベクター中の多様な粒子成分の存在が明らかになっている[85–88]。これら不純物粒子はFullと物理化学的特性が類似しているため、確立されている精製法を用いても完全に取り除くことは困難である。その結果、特に Empty が最終製品に含まれることで投与されるカプシド総量の増加に繋がり、AAVベクターの安全性と有効性への影響が懸念されている[89]。近年の静脈注射による投与では高用量のAAVベクターが用いられており、局所投与では顕在化していなかった免疫応答や肝毒性などによる重篤な有害事象が報告されるようになっている[90, 91]。実際、Elevidysは1.33×10^{13} vg/kgと投与量が多く[82]、患者への投与後の死亡との関連の指摘により米国での出荷が停止され、日本でも承認された後の薬価収載は見送りとなっている。また、Glyberaの薬価が1億円以上と高額で上市後の投与が増えず2017年に販売が終了され、Zolgensmaは約1億6700万円で薬価収載され国内で最高額の薬価となり、今年に入ってからはBeqvezも高額であることから需要が見込めず販売が中止されている。このようにAAVベクターを用いた遺伝子治療用医薬品が高額になるのは、製造工程が多く複雑で、製造効率が悪いことから高コストになることが一因として挙げられる。したがって、有効性と安全性を担保しながらも効率の良いベクター製造を実現するための技術開発が求められている。

以上の背景から、本博士論文では rAAV を構成する VP および内包 DNA の両者に着目して rAAV の不均一性を正確に評価できる分析手法を開発し、この新規手法も用いて特性解析を行うことで、rAAV 中に生じる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 章では、rAAV 中の異なる浮遊密度の粒子成分の特性解析を行い、rAAV に含まれる粒子の包括的な分析を行った。過去の複数の報告において、AAV の DGUC 精製中に Full と考えられる粒子に相当する成分が 2 つのバンドとして観測されていた。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、実験手法の不足および実験精度の限界から長らくその構成成分の違いは不明であった。本研究では、AAV ベクター精製に用いられる CsCl を媒体として用いた DGUC（CsCl-DGUC）が浮遊密度差を利用して高分解能に分離分析が可能であることから、この CsCl-DGUC を分析用遠心機に適用した分析手法を開発した。更に、Full と考えられる浮遊密度の異なる 2 成分を CsCl-DGUC により分画し、それぞれの粒子成分について VP 化学量論比と内包 DNA をキャピラリーゲル電気泳動（capillary gel electrophoresis：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高浮遊密度粒子に比べて VP1 および VP2 の比率が高いことが示され、Full のカプシドの 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。そこで、この浮遊密度の異なる Full も含めた成分同定を可能にするワークフローを構築し、Ful/Empty 比も含めた定量性についての議論も行うことで、AAV ベクターの粒度分析のための超遠心分析密度勾配沈降平衡法（density gradient equilibrium analytical ultracentrifugation：DGE-AUC）を確立した。最後に、想定される VP 化学量論比で構成されるカプシドについて CsCl 密度勾配中での浮遊密度の不均一性を議論し、体系的な理解に至った。

第 3 章では、異なる鎖長の設計 DNA を内包した Full を作製し、VP 化学量論比および内包 DNA に着目した包括的な特性解析を試みた。第 2 章での複数の rAAV を用いた

DGE−AUC の測定結果と考察から、Full のカプシドの VP 化学量論比の違いによる浮遊密度差が内包 DNA の鎖長に依存して大きくなることが明らかとなった。これに加えて、実測の結果においては Full の浮遊密度の異なる成分の量比、すなわち不均一性も内包 DNA の鎖長依存的に変化することが示唆された。そこで系統的な比較を行うために、元の設計 DNA のプラスミドに異なる長さのスタッファー配列を挿入することでカプシドに内包される DNA の全長を変化させた 2 種類の新たな設計 DNA のプラスミドを調製した。元のプラスミドも合わせて 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。その結果、内包 DNA の鎖長が長くなるにしたがって、Full/Empty 比が減少していることが認められた。また、いずれの鎖長の DNA を内包した Full においても予想通り、VP 化学量論比の異なる低浮遊密度および高浮遊密度の粒子成分が観測された。一方で、内包 DNA の鎖長が長くなるに従い Full 全体の不均一性が減少していることが確認された。加えて驚くべきことに、内包 DNA 鎖長が短いほどカプシドの 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、パッケージングに関わる機序を考察した。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章で示した結果を総括するとともに、遺伝子治療用 AAV ベクターの開発の推進と発展に貢献しうる本研究の意義と今後の展望について記述した。

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

2-1.　緒言

ウイルスの精製に広く用いられる CsCl-DGUC は 1957 年に新規手法として報告された[92]。媒体である CsCl が遠心力場において自ら遠心力方向に濃度（密度）勾配が形成される。そのため、高分子量成分は、CsCl の密度勾配の形成とともに溶液中を移動し、最終的に粒子固有の浮遊密度と溶液密度が等しくなる等密度点でバンドを形成する平衡状態となる。これは等密度勾配遠心とよばれ、~0.001 g/cm^3 の浮遊密度差の高分子量成分をも分離することができる。精製手法として CsCl-DGUC が wtAAV の精製にも初めて用いられ[93]、以降 wtAAV および rAAV の精製に広く使用されている。その中で、さまざまな血清型の wtAAV および rAAV において、浮遊密度の異なる 2 種類の Full と考えられる粒子成分が観察されていたが、これらの粒子間の DNA/タンパク質比や感染性などについては異なる、あるいは相反する結論が導かれていた[32,94-98]。近年の Wang らの研究では、scDNA を内包する rAAV8 の 2 種類の Full は同様の内包ゲノム DNA を含んでいたが、高浮遊密度粒子は低浮遊密度粒子よりも DNA/タンパク質比が高く、VP1 と VP2 の比率が低いことが示唆された[98]。wtAAV の VP 化学量論比は VP1：VP2：VP3=5：5：50 であるが、rAAV の生産ではこの VP 化学量論比は生産系によって異なることが知られており、例えば、HEK 生産系に比べて BEVS では VP1 の比率が低く、VP3 の比率が高い傾向にある[58,99]。ただし、wtAAV の VP 化学量論比を含め、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（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis：SDS-PAGE）を用いて分離された各 VP の銀染色後のデンシトメトリー（densitometry）の結果から導かれており、その定量性には疑義が残っていた。しかし最近尾山らにより CGE を用いた VP 化学量論比の正確な定量手法が報告された[100]。したがって、最近の質量分析法による分析で示唆された個々のカプシドの VP 化学量論比の不均一性が反映された各粒子成分の VP 化学量論比の評価も可能で

あると考えられる[77, 101]。

また、CsCl−DGUC は分離精製法として確立された翌年の 1958 年に Meselson−Stahl の実験で分析用遠心機 Model-E を用いた分析法として応用された[102]。2 本鎖の ^{14}N−DNA と ^{15}N−DNA および複製過程で生じる両者を 1 本ずつ含む 2 本鎖 DNA を異なるバンドのピークとして観測できるほど非常に高分解能であり、これにより DNA の半保存的複製が証明された[102]。以来、分離精製法としては広範に用いられてきたが、分析法としての応用は少なく、Ad ベクターの分析に用いた報告などに限られ[103−105]、AAV ベクターの分析手法としても確立されていなかった。

これらの背景から、本章ではまず異なる生産系で産生された様々な血清型および設計 DNA を内包する rAAV を超遠心分析（analytical ultracentrifugation：AUC）により分析した。DGE-AUC に加えて、粒度分布を包括的かつ定量的に評価できる超遠心分析沈降速度法（sedimentation velocity AUC：SV−AUC）および必要サンプル量を低減した超遠心分析バンド沈降速度法（band sedimentation AUC：BS−AUC）を用いた[87, 106]。測定した rAAV においても過去報告と同様に異なる浮遊密度を有する 2 種類の Full と考えられる成分を確認した。そこで、作製した rAAV8 からこれらの粒子成分を分画し CGE を用いた特性解析を行うことで、CsCl 密度勾配中での rAAV 中に含まれる粒子成分の同定を可能にし、DGE−AUC による分析手法を確立した。

2-2.　実験材料および実験方法

2-2-1.　細胞株および細胞培養

rAAV 作製には HEK293T および HEK293F （Viral Production Cells 2.0, Thermo FisherScientific, Waltham, MA, USA）浮遊細胞を用いた。BalanCD HEK293（FUJIFILM Irvine Scientific, Inc., Santa Ana, CA）に L-グルタミン（FUJIFILM Wako Pure Chemical, 大阪, 日本）および炭酸水素ナトリウム（FUJIFILM Wako Pure Chemical）を添加し、37℃、5% CO_2 で維持培養した。生存細胞数は Vi-CELL BLU（Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を用いて計測した。

2-2-2.　rAAV 作製

HEK293T および HEK293F 細胞を用いて rAAV8 をトリプルトランスフェクション法により作製した。具体的には、pAAV-Transgene（CMV-EGFP）、pAAV-*rep*/*cap* および pAd-Helper を、フラスコ培養中の浮遊細胞に 1:1:1 の重量比でコトランスフェクションした。トランスフェクション試薬には FectoVIR-AAV（Polyplus, Illkirch, France）を用いた。トランスフェクションから 72 時間後、細胞を溶解させ凍結融解後 0.22 μm フィルターを通して粗な rAAV を回収した。次に、AAVX カラム（Thermo Fisher Scientific）を用いた AC 精製を行い、目的の画分を回収した。rAAV8 ではこの画分を 13.2 mL Open-Top Thinwall Ultra-Clear Tube（Beckman Coulter）を用いて、5M CsCl を混合した 0.001% w/v Poloxamer 188（BASF Japan, 東京, 日本）を含む PBS（Thermo Fisher Scientific）緩衝液の上に重層し、混合溶液の CsCl 終濃度が 2.5 M、最終容量 12 mL になるように調製した。Optima XE-90 および SW 41 Ti ローター（Beckman Coulter）を用いて 20℃、34,000rpm で 72 時間遠心した。形成された Full のバンドを Triax Flow Cell（BioComp Instruments, Fredericton, Canada）を備えた Piston Gradient Fractionator（BioComp

Instruments)を用いて UV 260 および 280 nm でモニタリングしながら回収した。これを再び 13. 2 mL Open−Top Thinwall Ultra−Clear Tube 内で 5M CsCl/PBS + 0. 001% w/v Poloxamer 188 緩衝液の上に重層し、混合溶液の CsCl 終濃度が 2. 5 M、最終容量 12 mL になるように調製した。20℃、24, 000rpm で 72 時間遠心した後、形成された Full のバンドを Piston Gradient Fractionator で回収した。最後に、Slide−A−Lyzer 10K（Thermo Fisher Scientific）を用いて透析し、200 mM NaCl（FUJIFILM Wako Pure Chemical）および 0. 001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 緩衝液とした。rAAV2 では AC 後の画分を Optima XE−90、SW 41 Ti ローターおよび 13. 2 mL Open−Top Thinwall Ultra−Clear Tube（Beckman Coulter）を用いた 2 回の CsCl−DGUC で精製した。CsCl−DGUC は 16℃、18, 000 rpm、24−72 時間の条件で行なった。Empty および Full のバンドを Piston Gradient Fractionator を用いて回収した後、Slide−A−Lyzer MINI Dialysis Devices（Thermo Fisher Scientific）を用いて透析して rAAV8 と同様の緩衝液に交換した。

また、ラボグレードの rAAV2、rAAV6 および rAAV8 は、Vector Builder（Chicago, IL）および Addgene（Watertown, MA）より購入した。rAAV5 は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合（Manufacturing Technology Association of Biologics: MAB）（東京, 日本）より提供された。これらの rAAV の詳細は表 S1 にまとめた。用いる rAAV に、イオジキサノールが残留している場合は、Amicon Ultra−0. 5 centrifugal filter unit, 100 kDa MWCO（Merck Millipore, Burlington, MA）を用いて遠心分離し、0. 001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 緩衝液と交換した。

2−2−3. AAV の分子量および偏比容の計算

Empty の理論分子量（Molecular weight: Mw）および水中での偏比容（partial−specific volume: *vbar*）は、各 VP のアミノ酸組成を用い、カプシドの VP 化学量論比を VP1：VP2：VP3=5：5：50 と仮定して SEDNTERP により決定した。SEDNTERP における

vbar の計算は、タンパク質の *vbar* が高次構造の影響を受けにくいという実験的事実に基づいて、そのアミノ酸組成から理論値を算出している。また、設計 DNA の配列から Mw を求め、Empty の Mw との和により Full の Mw を求めた。また、*vbar* は過去報告に基づいて以下の計算式から算出した [87]。

$$vbar_{Full} = \frac{vbar_{Empty} \times Mw_{Empty} + vbar_{ssDNA} \times Mw_{ssDNA}}{Mw_{Empty} + Mw_{ssDNA}} \quad (1)$$

ここで、$vbar_{Full}$、$vbar_{Empty}$、および $vbar_{ssDNA}$ は、それぞれ Full、Empty、および ssDNA の偏比容である。$vbar_{ssDNA}$ の値は先行研究に基づき 0.52 cm^3/g を用いた [87]。Mw_{Full}、Mw_{Empty}、および Mw_{ssDNA} は、それぞれ Full、Empty、および ssDNA の分子量である。

また、BS-AUC で得られた Full と Empty の沈降係数からの分子量を算出には以下の Svedberg の式を用いた。Full と Empty の拡散係数の値は先行研究の値を用いた [87]。

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1-vbar\rho)}{RT} \quad (2)$$

ここで、s は沈降係数、D は拡散係数、M は分子量、*vbar* は偏比容、ρ は溶媒密度、R は気体定数、T は絶対温度である。

2-2-4. CsCl 混合緩衝液の密度および屈折率測定

異なる濃度で CsCl を混合した 0.001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 緩衝液の密度並びに屈折率を実測した。密度測定には DMA 4500M（Anton Paar, Graz, Austria）、屈折率測定には Abbemat 200（Anton Paar）を用い、いずれも Milli-Q 水を用いて校正を実施した。

2-2-5. DGE-AUC

DGE-AUC および後述の SV-AUC、BS-AUC の前に UV-1900（Shimadzu, 京都, 日本）あるいは BioMate160 UV-Vis spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific）を用いて

rAAV 原液の UV 測定を実施した。1 cm 光路長のキュベットを用いて 210−350 nm を 1 nm 間隔でデータ収集した。rAAV は、0. 001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS に CsCl（Nacalai Tesque, 京都, 日本）を最終濃度 2. 75M となるように混合した溶媒（密度：1. 351 g/cm^3）に溶解させ、230 nm における 1 cm 光路長での最終吸光度を約 0. 1 に調製した。この溶液 390 μL を、サファイアウインドウと 12 mm double−sector charcoal−filled epon centerpiece（Beckman Coulter）により組み立てられたセルアセンブリ中のサンプルセクターに注入した。さらに、同じ組成の溶媒 400 μL をリファレンスセクターに注入した。データは Optima AUC（Beckman Coulter）を用いて 20℃、42, 000 rpm、UV 検出システムで収集した。UV 検出波長は 230−320 nm 範囲で 5 nm 間隔、および 350 nm で行った。データは 10 μm の半径間隔で 1 時間毎に収集した。平衡状態の DGE−AUC データは OriginPro 2023（10. 0）ソフトウェア（Origin Lab, Northampton, MA）で解析した。インポートしたデータセットに対し、ピークアナライザーで“Subtract Baseline”を選択し直線ベースラインを作成した。その後、ピークトップ位置を選択しピーク関数をガウス関数に設定した上で“Multiple Peak Fit”ツールを用いてピークをフィットし、ピーク面積を算出した。

2−2−6. SV−AUC

UV 測定により、1cm 光路長で 260 nm あるいは 280 nm での最終吸光度が約 0. 25 となるように rAAV 原液を 0. 001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 溶媒で希釈した。この rAAV 溶液 390 μL をサンプルセクターに、400 μL の溶媒をリファレンスセクターに注入した。データは 20℃で Optima AUC（Beckman Coulter）を用いて 10, 000 rpm、UV およびレイリー干渉検出システムで収集した。データは 10 μm の半径間隔で収集した。沈降データは SEDFIT（version 16. 2b）の continuous $c(s)$ distribution モデルを用いて解析し、摩擦比、メニスカス、時間不変ノイズ、半径不変ノイズを正則化レベル 0. 68 で

フィッティングを行った。500 の分解能で 0-250 S の沈降係数（*s* 値）の範囲に設定し、PBS 緩衝液の密度と粘度は SEDNTERP を用いて計算した。*c*(*s*)分布図は GUSSI を用いて生成した。得られた見かけの *s* 値は必要に応じて 20℃の水中における *s* 値、$s_{20,w}$ に変換した。

2-2-7. BS-AUC

SV-AUC 同様 rAAV 溶液を調製した。次に、rAAV 溶液と溶媒を 15 μL ずつ、12-mm band forming centerpiece（Spin Analytical, Berwick, ME)により組み立てられたセルアセンブリ中のサンプルまたはリファレンスリザーバーウェルに注入した。サンプルセクターおよびリファレンスセクターには、^{18}O が 98 原子%以上に同位体濃縮された $H_2{}^{18}O$（Rotem, Arava, Israel)で調製した 0.001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 緩衝液をそれぞれ 240 μL と 250 μL 注入した。データは Optima AUC（Beckman Coulter）を用いて 20℃、20,000 rpm、UV 検出システムで収集した。データは 10 μm の半径間隔で収集した。沈降データは SEDFIT（version 16.2b）の analytical zone centrifugation *c*(*s*)モデルで解析され、ラメラ幅、摩擦比、メニスカス、時間不変ノイズ、半径不変ノイズは正則化レベル 0.68 でフィッティングされた。350 の分解能で 0-175 S の *s* 値の範囲に設定し、PBS/$H_2{}^{18}O$ 緩衝液の密度と粘度は SEDNTERP を用いて計算した。*c*(*s*)分布図は SV-AUC と同じく GUSSI を用いて生成した。

2-2-8. CGE による VP 分析

1 μg の rAAV を含む原液を、10% SDS（NIPPON GENE, 東京, 日本）14.4 μL および 2-メルカプトエタノール（Nacalai Tesque）4.83 μL と混合した。Milli-Q 水で総量を 80 μL にした後、70℃で 3 分間インキュベートした。この溶液を、3.5% 2-メルカプトエタ

ノールおよび 0.033% SDS から構成される 70% マトリックス交換溶液で、Amicon（Merck Millipore, Burlington, MA, USA）を用いて 2 回交換した。回収したサンプルを 70℃で 3 分間インキュベートした。次に、20 倍希釈した 10 KD Internal Standard（SCIEX, Framingham, MA, USA）を 1 μL 混合し、Milli-Q 水で総量を 70 μL とした。PA800 Plus CE system（SCIEX）を使用し、分離には bare-fused silica capillary（内径 50 μm、全長 30 cm、SCIEX）を用いた。データの取得にはフォトダイオードアレイ検出器（214 nm）を、解析は 32 Karat software（version 10.3、Build 20）を用いて行った。先行研究と同様に、変性条件下での UV 214 nm におけるモル吸光係数を用いて各 VP のピーク面積から VP 化学量論比を算出した[100]。VP 化学量論比ならびに SD は 3 回の実験から算出した。

2-2-9. CGE による ssDNA 分析

各サンプルの核酸は 500 mM EDTA 10 μL、0.001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 55 μL、および 20 mg/mL Proteinase K（QIAGEN, Venlo, Netherlands）5 μL を加え、総量 100 μL とした。この溶液を 55℃で 60 分間インキュベートした後、95℃で 20 分間加熱し DNA を抽出した。抽出した DNA は QIAquick PCR 精製キット（QIAGEN）で精製した。精製後の DNA はレーザー誘導蛍光検出器を備えた PA800 Plus system（SCIEX）で分析した。蛍光は励起波長 488 nm、発光波長 520 nm で検出された。分離には bare-fused silica capillary（SCIEX）を使用し、Nucleic Acid Extended Range Gel（SCIEX）および SYBR Green Ⅱ RNA Gel Stain（SCIEX）を含む走査緩衝液を用いた。サイズ標準として一本鎖 DNA 7-K Ladder （PerkinElmer, Shelton, CT, USA）を用いた。取得したエレクトロフェログラムは 32 Karat software により解析した。内包 DNA 鎖長ならびに SD は 3 回の実験から算出した。

2-3. 結果

2-3-1. DGE-AUC 測定条件の最適化

rAAV 精製において、DGUC は遠心チューブ内で形成される密度勾配中での各成分の浮遊密度差により分離され、rAAV のカプシドや設計 DNA に依らず汎用的に用いられる。しかし、DGUC のチューブにおける長い沈降距離での分離を、AUC で用いるセルアセンブリ中の 1cm 程度の非常に短い沈降距離で実現するためには最適化が必須である。前述の通り、rAAV 精製の場面では媒体として CsCl、イオジキサノールやショ糖が採用されているが、等密度勾配遠心の CsCl- DGUC が最も高分解能である。また、イオジキサノールやショ糖を媒体としたゾーン移動密度勾配遠心では遠心前に重層あるいは密度勾配を形成する必要があることも考慮して DGE-AUC では媒体として CsCl を用いることとした。

次に、媒体の CsCl の拡散と沈降の平衡を考慮した濃度分布を表す以下の式により、設定条件下での平衡状態における CsCl の密度勾配を求めることを試みた。

$$c(r) = c(r_0)exp\left[M(1 - vbar\rho)\frac{\omega^2}{2RT}(r^2 - r_0^2)\right] \qquad (3)$$

ここで、r は回転中心からの半径、r_0 は任意の基準半径、M および *vbar* はそれぞれ CsCl の分子量および偏比容、ρ は溶液密度、ω はローターの角速度、R は気体定数、T は絶対温度である。式 3 を CsCl の濃度勾配に適用する場合、基準半径における濃度 $c(r_0)$ のみが未知である。ここで、DGE-AUC 測定系では、AUC セル内の CsCl 総量は保存される。つまり、遠心前のセル内にわたる均一 CsCl 濃度および遠心開始後平衡状態に達した CsCl 濃度勾配での CsCl 総量は等しくなる。この関係により、例えば勾配形成後に遠心前の均一 CsCl 濃度と等しくなる等濃度点（isoconcentration point： ri）を任意の r_0 と設定し $c(r_0)$ を導くことができる。用いる 0. 001% w/v Poloxamer 188 を含む PBS 緩衝液に混合した CsCl 濃度と密度および屈折率の関係を得るために、混合する CsCl 濃度を

ふった緩衝液を調製し、密度と屈折率を実測してこれらの関係式を得た（図 S1）。以上より、CsCl 濃度勾配を密度勾配に変換でき、過去の報告で示された Full や Empty の密度値から最適条件決定のための事前検討を行なった。その後、いくつかの rAAV を用いた測定により、さまざまな rAAV に汎用的に使用できる CsCl 濃度（2. 75 M）と回転数（42, 000 rpm）の組み合わせを最適条件とした。

更に、分析用遠心機では測定中リアルタイムでセル内の UV 吸収プロファイルを取得できる。そこで先行研究を参考に [107]、2 時間間隔で取得した DGE−AUC プロファイル間の二乗平均平方根偏差（root−mean−square deviation：RMSD）を算出し、CsCl 密度勾配が平衡状態に達するまでの時間を評価した。異なる血清型および設計 DNA の rAAV について、測定開始後 24 時間までの RMSD を図 7 に示す。RMSD は血清型や設計 DNA に依存せず約 12 時間でほぼゼロとなり、CsCl の濃度勾配形成とそれに伴う rAAV 中の各成分の移動が 12 時間で平衡に達したことが示された。したがって、本研究では遠心開始後 12 時間以降に取得した結果を DGE−AUC の平衡プロファイルとした。

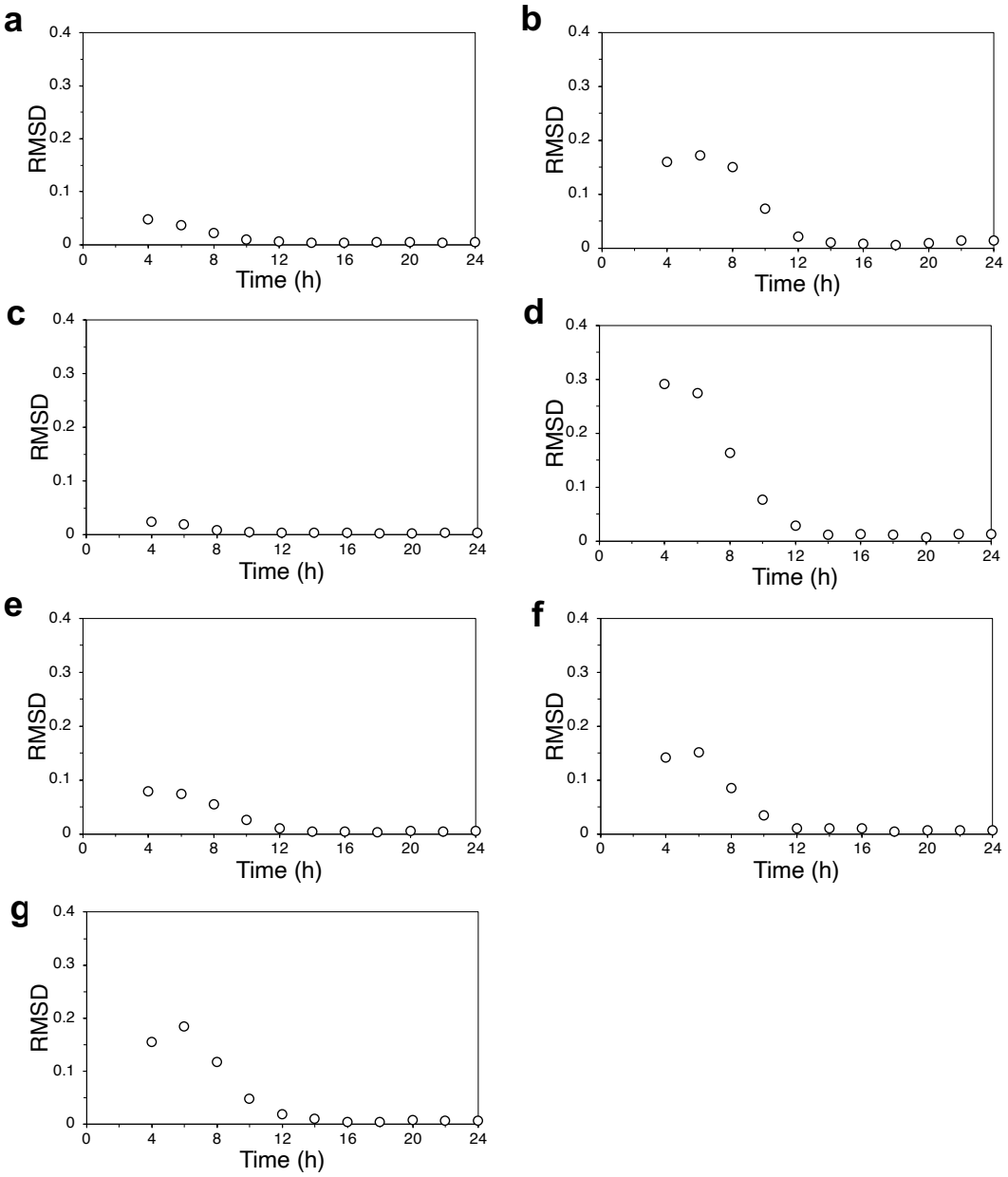


図 7.　さまざまな rAAV の測定開始後 24 時間後までの DGE−AUC プロファイルの時間変動（a）AAV2-EGFP（b）AAV5-ZsGreen1（c）AAV6-EGFP（d）AAV8-H4C1（e）AAV8-EGFP（f）AAV8-oScarlet（g）AAV8-mCherry-EGFP

2-3-2.　Full の低浮遊密度および高浮遊密度成分の特性解析

最適化された条件での DGE-AUC により AAV2-EGFP の分析を行なった。平衡プロファイル（図 8a）では、回転中心から順に 3 つのピークが観察された。一方、SV-AUC により得られた $c(s)$ 分布は、$s_{20,w}$ で 68.5 S および 95.0 S に 2 つの主ピークを示した（図 8b）。AAV2 の Empty および Full（AAV2-EGFP）は、過去報告の AAV5 の Empty（67.3 S）および Full（AAV5-ZsGreen1）（93.7 S）[87] よりも理論分子量がわずかに大きいため、これらのピークは、それぞれ Empty および Full に対応すると結論づけた。Optima AUC の UV 検出系は、高感度であることに加えて多波長（multi-wavelength：MW）検出が可能であることから、DGE-AUC の平衡プロファイルを 230-320 nm の 5 nm 間隔で取得し、それぞれの検出波長での 3 つのピークのピーク面積を算出した。ここで、いずれの波長の平衡プロファイルにおいても、回転軸からの半径の増加に従ってベースラインが徐々に増加していた。この現象は、低分子量種（low molecular weight species: LMWS）が CsCl と同様の濃度勾配を形成する不純物の存在に起因すると考えられる。ベースラインの増加はピーク面積の正確な推定を妨げるため、実験方法に記載の手順でデータ解析時にベースラインを補正した。また、SV-AUC においても MW 検出の手法が確立されているため [87]、230-280 nm の 5 nm 間隔で取得した結果から Empty と Full のピーク面積を算出した。ピーク 1 と Empty は 280 nm、ピーク 2 および 3 と Full は 260 nm でのピーク面積値で規格化して重ね合わせると、ピーク 1 は Empty と、ピーク 2 および 3 は Full と同じ吸収特性を示した（図 8c）。この結果からピーク 1 は Empty とピーク 2 および 3 は Full と同じ核酸/タンパク質比から構成されることが示唆された。尚且つ、式 3 を用いて各ピークトップ位置から算出される浮遊密度（ピーク 1：1.33 g/cm^3、ピーク 2：1.35 g/cm^3、ピーク 3：1.36 g/cm^3）が設計 DNA 鎖長も考慮すると、以前の報告 [98] と比較しピーク 1 は Empty と、ピーク 2 および 3 は Full と近い値であった。以上から、DGE-AUC で観測されたピーク 1 は Empty、ピーク 2 および 3 は Full と結論づけた。

SV−AUC で得られた *c*(*s*) 分布における~110 S および 132. 5 S のマイナーピークを、DGE−AUC の平衡プロファイルのピークに明確に割り当てることは困難であったが、次のように解釈した。~110 S の成分には Extra または Empty−Full の二量体（約 6. 55cm に位置する）、あるいは両方の成分を含む可能性がある。先行研究の *s* 値と内包 DNA 鎖長の関係に基づくと [108]、およそ 4.8 kb の DNA を内包すると推定され、平衡プロファイルでは約 7. 07cm に位置することになる。Empty−Full の二量体の場合は、浮遊密度から約 6. 55cm に位置することが考えられる。一般的に二量体と単量体の *s* 値の比は 1. 45 であるため、132. 5 S の成分は Full の二量体に対応する。そのため、平衡プロファイルではピーク 2 または 3 と重なっていると考えられる。

AAV2−EGFPでFullに浮遊密度の異なる粒子成分が存在することは、これまでの報告と一致するものである。また、分析したAAV2−EGFP だけでなく例えばAAV5−ZsGreen1（図S2）など他の血清型および内包DNAのrAAVにおいても、DGE−AUCでFullに対応する2つの主ピークの存在が確認された。したがって、これらの物理化学的特性の差を明らかにするため、AAV8−EGFPを作製して浮遊密度の異なる2つの粒子成分を分離・分画し、カプシドおよび内包DNAの特性解析を行うこととした。そこで、実験方法に記載したように、最適化した2回のCsCl−DGUC精製によりこれらの粒子成分の分離・分画を可能にした。1回目のCsCl−DGUCで多量に含まれるEmptyを取り除き、合わせてFullの低浮遊密度および高浮遊密度成分もこの段階で大まかに分離・分画した（図S3)。そして、これらを2回目のCsCl−DGUCで別々の遠心チューブにアプライすることで、それぞれを高純度に回収した。このCsCl−DGUC精製を経て回収したFullの低浮遊密度および高浮遊密度成分をそれぞれF1およびF2とした。

DGE−AUCにより、分離・分画前のFullでは2つのピークが観測されていたのが、F1とF2では、それぞれ低浮遊密度および高浮遊密度に対応するピークが主成分となっていることが確認された（図9a)。CGEを用いたカプシドおよび内包DNAの特性評価の結果

を図9b−dに示す。F1とF2の間で内包されたDNA鎖長に明確な差は確認されなかった。一方で、図9cのエレクトロフェログラムにおける各VP成分のピーク面積から決定されたVP化学量論比は、F1ではVP1：VP2：VP3 ＝ 6. 3：7. 9：45. 8、F2ではVP1：VP2：VP3 ＝ 5. 3：7. 2：47. 5であった。したがって、F1とF2の浮遊密度差はVP化学量論比の違いに起因していると結論づけた。

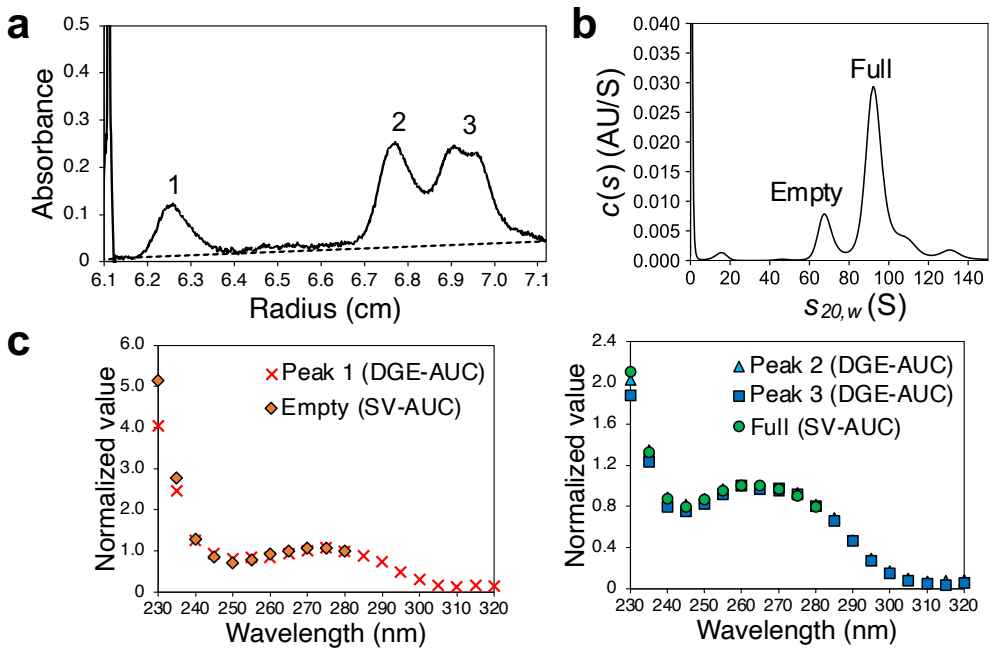


図 8.　DGE−AUC および SV−AUC による AAV2−EGFP の特性解析

（a）230 nm での DGE-AUC 平衡プロファイル

（b）SV−AUC により得られた 230 nm での *c*(*s*)分布

（c）SV−AUC で同定された Empty と DGE-AUC で観測されたピーク 1 の吸収特性（左）と SV−AUC で同定された Full と DGE-AUC で観測されたピーク 2 および 3 の吸光特性（右）。それぞれ 280 nm および 260 nm の値で規格化した。

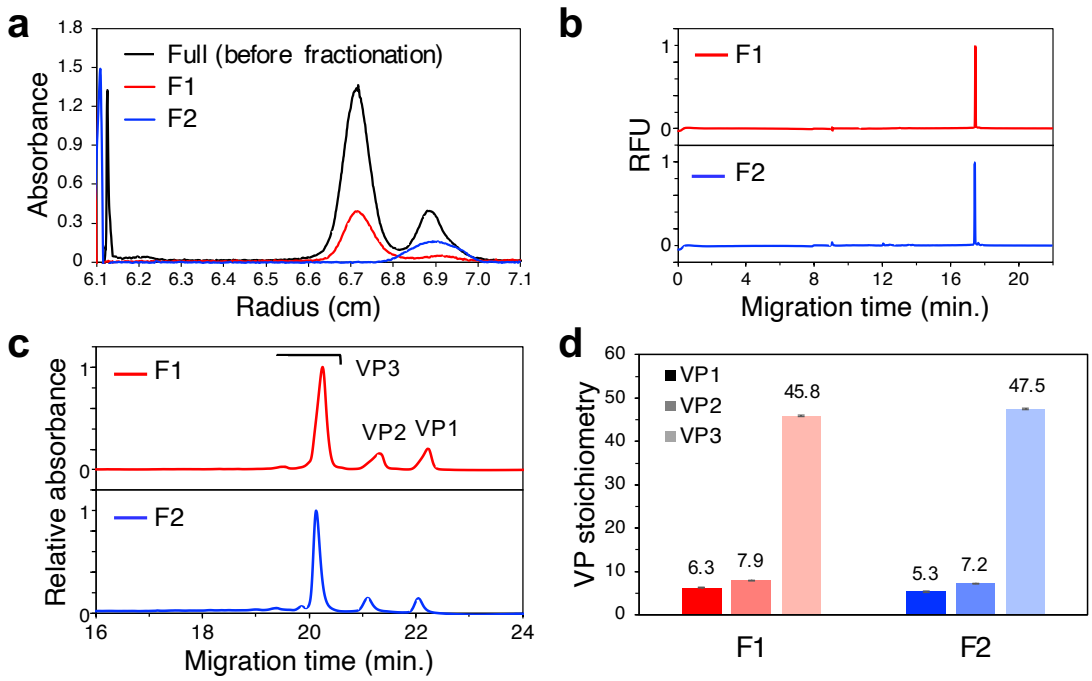


図 9.　AAV8-EGFP の低浮遊密度および高浮遊密度成分の特性解析

（a）分画前の Full、F1 および F2 の 230 nm での DGE-AUC 平衡プロファイル

（b）F1 および F2 の内包 DNA の CGE エレクトロフェログラム

（c）F1 および F2 のカプシドの CGE エレクトロフェログラム

（d）（c）の結果から算出された F1 および F2 の VP 化学量論比

2-3-3.　DGE-AUC による定量的成分同定手法の確立

DGE-AUC は Full の VP 化学量論比、浮遊密度の異なる成分も含めた AAV ベクターの特性評価が可能な有用な分析法であることが示唆された。そこで、定量的かつ包括的な成分同定の検討を行うこととした。

Full/Empty 比は AAV ベクターの重要品質特性（critical quality attributes：CQAs）の一つで、SV-AUC はこの Full/Empty 比決定のゴールドスタンダードである。そこで、AAV2 の Empty と Full（AAV2-EGFP）を異なる比率で混合して調製して、DGE-AUC による Full/Empty 比の定量性を検証した。まず、実験方法に記載した手順で算出したピーク面積を図 S4 に示す AUC セルのセンターピースのセクター形状を考慮して補正した。続いて、先行研究で示された Empty と Full のモル吸光係数の値と計算方法[87]に基づいて Full/Empty 比を決定した。ここで、Full の量は異なる VP 化学量論比を持つ Full の総量とした。混合前の Empty と Full の SV-AUC の測定結果から予測される Full/Empty 比と比較すると、DGE-AUC と SV-AUC 間の Full/Empty 比は直線的相関を示した（図 10）。したがって DGE-AUC は Full/Empty 比決定のための定量的分析法として SV-AUC と同等であると考えられた。

次に、DGE-AUC での包括的な成分同定のためのワークフローを構築した。平衡プロファイルにおいて形成された密度勾配は式 3 から決定されるため、観測されたピークトップ位置から対応する粒子成分の浮遊密度が算出できる。求められた浮遊密度の逆数は、対応する粒子成分の等密度点の CsCl 濃度における *vbar*（$vbar_{[csCl]}$）となる。これは式 1 から導出される、20ºC の水中（すなわち、溶液密度 = 0.99820 g/cm^3）における *vbar*（$vbar_{aq}$）とは異なることに注意が必要である。そのため、*vbar* の溶液密度依存性を考慮した上での内包 DNA 鎖長との関係を表す相関式の導出を試みた。AAV2-EGFP、AAV5-ZsGreen1、AAV8-FIXp、AAV8-oScarlet、AAV8-mCherry-EGFP について、MW 検出での DGE-AUC と SV-AUC あるいは BS-AUC 測定を実施した。得られた結果におい

てピーク面積および 260 nm および 280 nm での吸光度の比（A260/A280）の値を照らし DGE-AUC の平衡プロファイルで Empty と Full に対応するピークを決定した。これにより等密度点の CsCl 濃度と$vbar_{[CsCl]}$を算出し、実験方法に記載の方法で計算した各成分の$vbar_{aq}$と合わせて、$vbar$ の溶液密度依存性を示した（図 11a）。ここで、AAV2-EGFP および AAV5-ZsGreen1 の Full の$vbar_{[CsCl]}$には、Full の低浮遊密度および高浮遊密度成分の$vbar_{[CsCl]}$の平均値を用いた。溶液密度と$vbar_{[CsCl]}$の間に線形関係があると仮定すると、rAAV に含まれる種々の成分のその溶液密度における$vbar_{[CsCl]}$を計算することができる。例えば、AAV8-H4C1 の平衡プロファイル（図 13）のピーク 4 は回転中心から 6.80 cm の半径位置が等密度点であり、溶液密度は 1.356 g/cm^3（CsCl 濃度 2.790 M）である。これはピーク 4 に対応する粒子成分の$vbar_{[CsCl]=2.790\ M}$が 0.7375 cm^3/g であることを意味する。したがって、図 11b に示すように溶液密度 1.356 g/cm^{3}における$vbar_{[CsCl]=2.790\ M}$と DNA 鎖長の関係から、ピーク 4 の DNA 鎖長は 2818 base と算出される。これにより、ピーク 4 は Extra と割り当てられた。加えて、A260/A280 値はピークアサインの妥当性を判断するために用い、ピーク 4 の A260/A280=1.28 は Extra との成分同定を支持するものである。図 12 にこの一連の DGE-AUC を用いた成分同定のためのワークフローを示した。

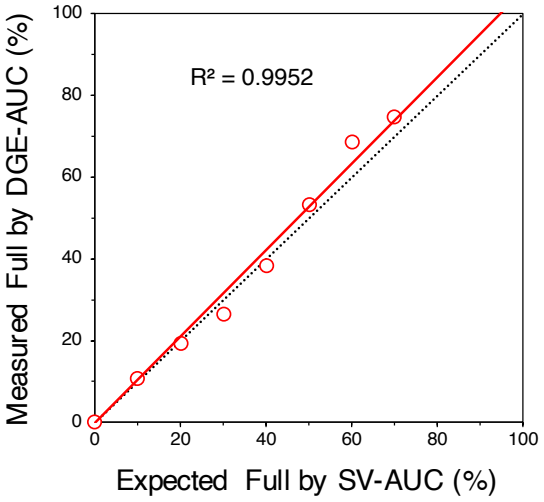


図 10.　DGE-AUC の Full/Empty 比の定量性

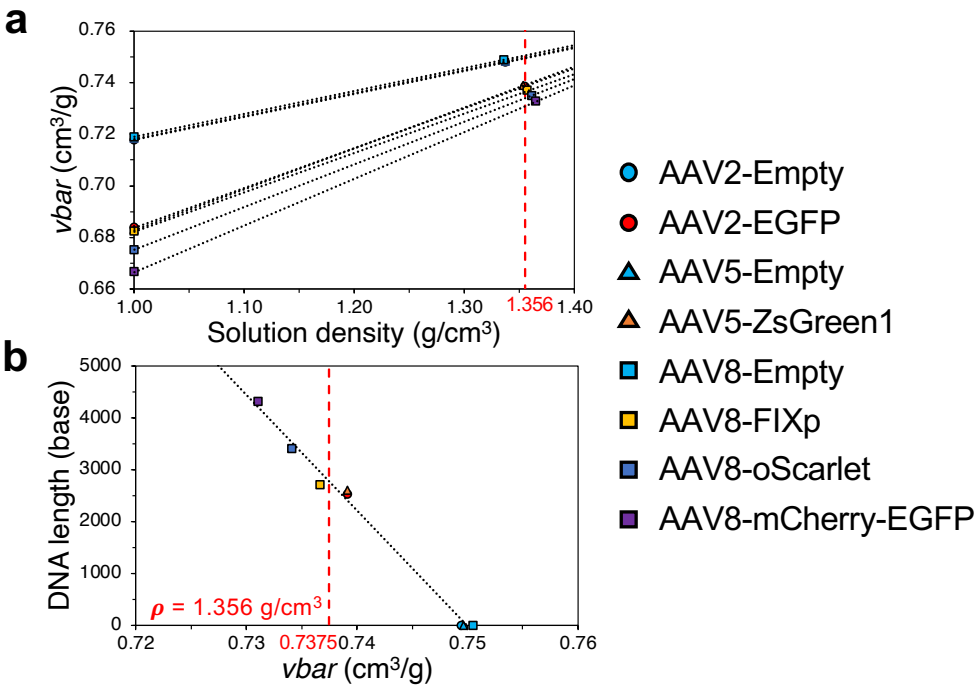


図 11.　(a) さまざまな rAAV の *vbar* の溶液密度依存性

(b) 溶液密度 1.356 g/cm³ における *vbar* と内包 DNA 鎖長の関係

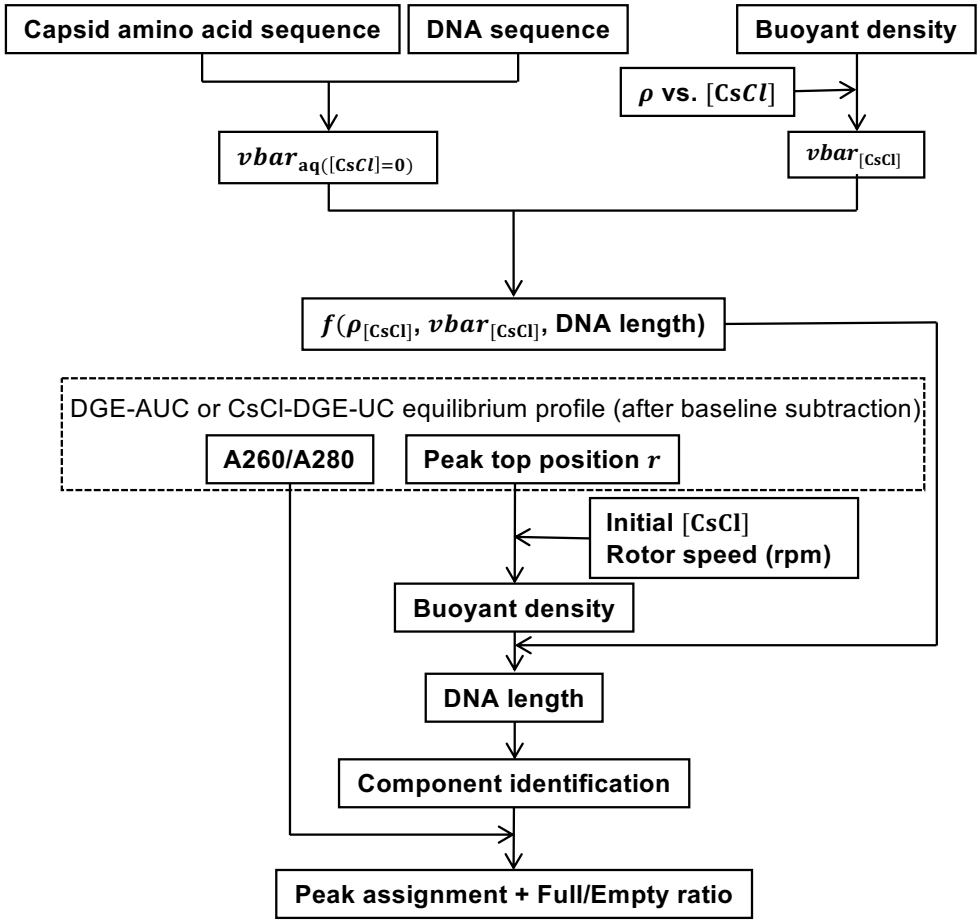


図 12.　DGE−AUC の成分同定ワークフロー

2-3-4.　DGE-AUC による rAAV8 の分析

前節で構築した成分同定ワークフローの妥当性を検証するため、異なる設計 DNA の rAAV8 を用いて得られた結果を BS-AUC と比較した。BS-AUC の $c(s)$ 分布と、先行研究[106]で示された検出限界（limit of detection: LOD）以上のピークの成分同定結果をそれぞれ図 13 および表 3 にまとめた。全ての rAAV8 の~45 S ピークは、その s 値と式 2 を用いて求められた Mw と Empty の理論 Mw との比較により、Empty とアサインした。同様に、全ての rAAV8 の Empty を除いた主ピークの Mw を算出し、Full の理論 Mw との比較から Full とアサインした。この Full のアサインの結果から、s 値を内包 DNA 鎖長に対してプロットすると線形相関が得られた（図 S5）。s 値が Empty と Full の間、または Full を超えるピークは、MW 検出により得られた A260/A280 値も考慮してそれぞれ Partial および Extra とアサインした。BS-AUC において、最大の s 値を示す成分の A260/A280 値は不正確になることが先行研究から示唆される点は留意すべきである[106]。最後に、Empty の s 値より小さい s 値のピークは LMWS とアサインした。DGE-AUC の平衡プロファイルと図 12 のワークフローにしたがって得られた成分同定の結果をそれぞれ図 14 および表 4 にまとめた。

AAV8-H4C1 の BS-AUC では Empty と Full に加え、設計 DNA の 2 倍あるいは 3 倍の鎖長に相当する DNA を内包する 2 つの Extra の存在が示された。DGE-AUC では、表 4 に示すようにピーク 1-5 がそれぞれ Empty、Partial、Full および 2 つの Extra として同定された。しかしピーク 2 に関しては、BS-AUC から Partial が同定されなかったことを考慮すると、Partial とは異なる成分に由来するピークの可能性が考えられた。また、ピーク 6 は A260/A280 値が高く、DNA を多量に含む不純物と考えられた。DGE-AUC では、ピーク 3 と 4 のような隣接ピークは十分に分離されていないが、ガウス分布を仮定したピークフィッティングは各成分の量比の決定に有効である。実際、Full/Empty 比（59.1%）は、BS-AUC から得られた値（56.6%）と良好な一致を示した。

AAV8-FIXp の BS-AUC から、Empty と Full に加えて Partial および Extra を含むことが確認された。DGE-AUC においては、ピーク 1 および 2 はそれぞれ Empty および Full としてアサインされた。これより決定された Full/Empty 比（61.4%）は、BS-AUC から得られる Full/Empty 比（67.7%）よりわずかに低かった。これは A260/A280 値も考慮すると、ピーク 3 および 4 が Full および Extra が重なったピークに対応している可能性を示唆している。BS-AUC で検出された Partial は、平衡プロファイルでは Empty と Full の間に位置するはずであるが、存在量が少ないためか明確なピークとしては検出されなかった。

AAV8-oScarlet の BS-AUC により、Empty および Full に加えて Partial が含まれていることが明らかになった。DGE-AUC では、ピーク 1 と 2 はそれぞれ Empty と Full と同定されたが、Partial は存在量が少ないため明確なピークとして検出されなかったと考えられる。また、7.15 cm 付近に非常に小さいピークが確認された。DGE-AUC より求められた Full/Empty 比（94.4%）は、BS-AUC で得られた Full/Empty 比（91.2%）と良好な一致を示した。

最後に、AAV8-mCherry-EGFP の BS-AUC から、Empty および Full に加え、内包 DNA 鎖長が異なる 3 つの Partial が含まれることが示された。DGE-AUC では、ピーク 1 と 3 がそれぞれ Empty および Full と同定された。Partial にアサインされたピーク 2 は Empty と Full の間にブロードなピークとして検出され、$c(s)$分布における Partial の複数成分を反映したものであると考えられる。

いずれの rAAV8 においても BS-AUC から凝集体は同定されなかったが、凝集体の$vbar_{[CsCl]}$は凝集体の組成に依存して Empty や Partial または Full の値に類似する場合があり、凝集体は Empty や Partial または Full と同じ等密度点に位置することとなる。このピークの重なりにより、Full/Empty 比が過大あるいは過小評価される可能性があることには留意する必要がある。

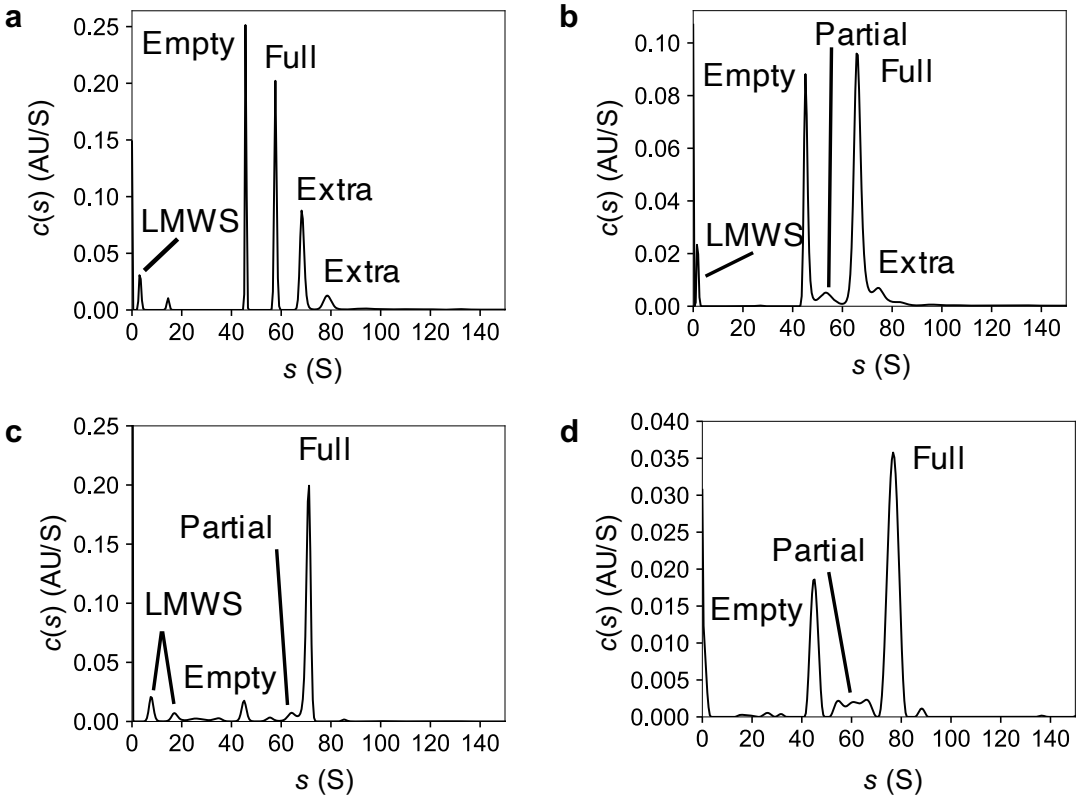


図 13.　rAAV8 の BS−AUC により得られた 230 nm での *c*(*s*)分布

（a）AAV8-H4C1（b）AAV8−FIXp（c）AAV8-oScarlet（d）AAV8-mCherry-EGFP

表 3.　rAAV8 の BS-AUC による成分同定結果

AAV8-H4C1 (1487 base)	Component	LMWS	Empty	Full	Extra	
	s (S)	3.3	45.8	57.7	68.5	78.9
	Mw (kDa)		3684.2 (3735.3)	4363.6 (4195.5)		
	A260/A280	0.92	0.58	1.10	1.28	1.29
	Peak area (%)	5.4	26.1	34.0	26.9	7.7
AAV8-FIXp (2712 base)	Component	LMWS	Empty	Partial	Full	Extra
	s (S)	1.8	45.5	53.8	66.2	75.4
	Mw (kDa)		3660.1 (3735.3)		4651.8 (4575.8)	
	A260/A280	0.90	0.62	1.03	1.28	1.40
	Peak area (%)	3.9	27.2	5.4	56.9	6.6
AAV8-oScarlet (3408 base)	Component	LMWS	LMWS	Empty	Partial	Full
	s (S)	7.8	17.4	45.0	64.2	70.8
	Mw (kDa)			3619.8 (3735.3)		4812.0 (4788.2)
	A260/A280	N.D.	0.92	0.61	1.10	1.30
	Peak area (%)	7.9	4.1	7.3	5.3	75.4
AAV8-mCherry-EGFP (4319 base)	Component	Empty		Partial		Full
	s (S)	45.0	55.2	60.8	65.9	76.7
	Mw (kDa)	3619.8 (3735.3)				5016.5 (5069.6)
	A260/A280	0.67	N.D.	N.D.	N.D.	1.26
	Peak area (%)	23.9	3.5 *	3.7 *	3.8 *	65.2

N.D.: not detected, * LOD 以下のピーク

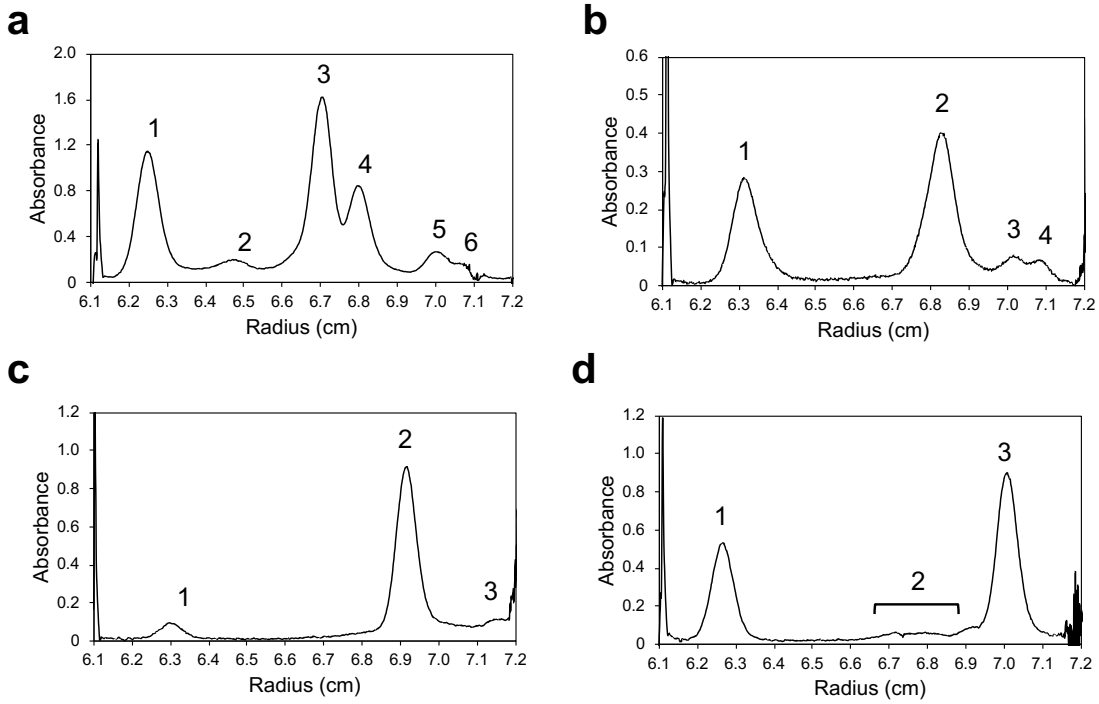


図 14.　rAAV8 の 230 nm での DGE−AUC 平衡プロファイル

（a）AAV8-H4C1（b）AAV8−FIXp（c）AAV8-oScarlet（d）AAV8-mCherry-EGFP

表 4.　rAAV8 の DGE−AUC の成分同定結果

AAV8-H4C1	Peak No.	1	2	3	4	5	6
	DNA length	-32	905	2187	2818	4172	4648
	A260/A280	0.56	0.97	1.10	1.28	1.37	1.49
	Peak area (%)	29.8	1.3	43.1	21.0	4.1	0.7
	Assignment	Empty	Partial	Full	Extra	Extra	—
AAV8-FIXp	Peak No.	1	2	3	4		
	DNA length	266	3020	4275	4719		
	A260/A280	0.61	1.29	1.31	1.31		
	Peak area (%)	33.3	52.9	10.2	3.7		
	Assignment	Empty	Full	Full + Extra			
AAV8-oScarlet	Peak No.	1	2	3			
	DNA length	197	3570	—			
	A260/A280	0.71	1.30	N.D.			
	Peak area (%)	5.6	94.4	—			
	Assignment	Empty	Full	—			
AAV8-mCherry-EGFP	Peak No.	1	2				
	DNA length	39	4172				
	A260/A280	0.58	1.33				
	Peak area (%)	37.3	62.7				
	Assignment	Empty	Full				

2-4. 考察

本章の研究では、AAV8-EGFP の Full の異なる浮遊密度の F1 と F2 を CsCl-DGUC 精製により高純度に分画後、特性解析を実施した。その結果、カプシドを構成する VP 化学量論比が異なり、低浮遊密度成分の F1 が高浮遊密度成分の F2 に比べて VP1 および VP2 の比率が高いことが示された。最近の大西らの研究においても、CGE を用いて AAV2-EGFP の Full の浮遊密度の異なる 2 成分間で同様の結論を導き [110]、本研究で得られた結果を支持する。また、Full の低浮遊密度成分の方が高浮遊密度成分に比べて *in vitro* での遺伝子導入効率が高いことも示された [110]。この結果は、いくつかの先行研究において報告された VP 化学量論比と遺伝子導入効率あるいは感染性との間の相関関係とも一致する。特に、各 VP の発現が影響することで BEVS により産生された rAAV は HEK 生産系で産生された rAAV に比べて VP1 の比率が低く VP3 の比率が高くなる傾向にあり、全体での VP 化学量論比が wtAAV での VP1∶VP2∶VP3=5∶5∶50 から外れることで、活性の低下を引き起こすと考えられている [99]。この rAAV 生産系による VP 化学量論比の変動は長らく、古典的なタンパク質の定量法であるデンシトメトリーにより評価されていた。しかし最近 Wörner らは、オービトラップ超高質量範囲分析を用いて、異なる血清型の rAAV（AAV1、AAV5、AAV8、AAV9）について高分解能ネイティブ MS を実施し、いずれの rAAV でも個々のカプシドの VP 化学量論比が不均一な粒子集団からなることを発見した [77]。この研究で提唱された確率的アセンブリーモデルによると、最も豊富な VP 化学量論比からなるカプシドでさえ、全てのカプシドのごく一部を占めるに過ぎないことが示唆された。

しかしながら、CsCl 密度勾配中での異なる VP 化学量論比から構成されるカプシドの分離に関する理論的説明は不足している。更に、Empty も Full と同様に異なる VP 化学量論比の粒子成分の分布の存在が考えられるが、Full とは異なりいずれの rAAV においても観測されなかった。そこで、異なる VP 化学量論比のカプシドからなる Empty と

Full について、Mw と$vbar_{aq}$の理論値を計算した。検討対象は AAV8 の Empty（AAV8−Empty）、AAV8−EGFP（設計 DNA 鎖長：2. 5 kb）および設計 DNA 鎖長 4. 7 kb（GC 含量 50%）の Full（AAV8−Full）とした。Mw および$vbar_{aq}$は、VP1 の比率が 0−10、VP2 の比率が 2−20、VP3 の比率が 35−55 の範囲で異なる VP 化学量論比の、合計 188 種類のカプシドについて算出された。この VP 化学量論比の範囲は Wörner らの研究に基づき、想定される大多数のカプシドを網羅するものである [77]。実験方法に記載の通り理論値を計算した結果を表 S2 にまとめた。図 15a には、これら異なる VP 化学量論比を有するカプシドから構成された AAV8− Empty、AAV8−EGFP、AAV8−Full の$vbar_{aq}$値のプロットを示す。$vbar_{aq}$値の変動幅は、AAV8−Full、AAV8−EGFP、AAV8− Empty の順に大きかった。さらに、いずれも異なる VP 化学量論比のカプシドの中で同じ$vbar_{aq}$値を有するものがあった。ここで、$vbar_{aq}$はアミノ酸および DNA 組成から決定可能であるが、実際の溶媒条件下では緩衝液中の溶媒組成に依存した溶媒和やイオン結合により $vbar$ が変化することに留意すべきである。したがって、CsCl 密度勾配における浮遊密度は、$vbar_{aq}$の値と、CsCl 密度勾配中の緩衝液の影響を反映する定数の逆数の総和である。ここで同じ DNA がカプシドに内包されている場合、VP 化学量論比が変化しても定数は不変であると仮定すると、$vbar_{aq}$の逆数は、Empty および Full の両方について、実際の CsCl 密度勾配における浮遊密度を反映していると言える。

以上の考察に基づき、図 15b に示すように、AAV8−Full、AAV8−EGFP、AAV8− Empty の 188 個のカプシドについて、10^{-4} 毎の$1/vbar_{aq}$の値でカプシド数を積算した。その結果、$vbar_{aq}$値の変動から予想されるように不均一なガウス分布を示した。この分布の変動幅も$vbar_{aq}$値の変動幅の順となり、AAV8− Empty は狭い$1/vbar_{aq}$の範囲に分布したのに対し、AAV8−EGFP と AAV8−Full はこの順により広い分布を示した。したがって、カプシドの VP 化学量論比が完全に同一であっても、CsCl 密度勾配中では Empty が単一ピークを示すのに対し、Full はより幅広いピークを示すことが示唆された。つまり、Full

の内包 DNA の存在によって異なる VP 化学量論比による浮遊密度差が増大することが考えられた。

この結果は明らかにカプシドの種類に依存しないため、図 16 に示すような体系的な理解に達した。つまり、内包 DNA の存在は異なる VP 化学量論比を持つカプシド間の浮遊密度差を変化させ、また内包 DNA の鎖長に依存して増大する。したがって、rAAV の血清型に依らず、Full には異なる浮遊密度成分が確認され得ることが明らかとなった。これは、wtAAV も含めて、AAV 以外のパルボウイルス科のウイルスの初期研究において確認された同様の現象も説明するものであり、同じ構成成分からなるウイルスで普遍的な現象であると推察される。これまで明確な要因が明らかになっておらず、報告毎に異なる結論が得られていた理由としては、ゾーン移動密度勾配遠心を用いた分離であったり、CsCl を媒体とした等密度勾配遠心の分離であっても十分な分離が達成されていなかったことが考えられる。本研究では、2 回の最適化した CsCl-DGUC により、効果的な分離を実現し、高感度な手法を用いた特性解析による比較評価を可能にした。

また、この浮遊密度の異なる Full も含めた成分同定を可能にするワークフローを構築し、rAAV の不均一性を評価する新規手法の DGE-AUC を確立した。一般的に、平衡プロファイルにおける主成分の量比は、SV-AUC あるいは BS-AUC から決定される量比と一致していた。しかし、微量成分が存在する場合には不一致も確認されることがあった。検出波長域で吸光度が小さい、あるいは主成分と同程度の密度のこれらの微量成分は、平衡プロファイルにおいて主成分のピークと重なるかブロードなピークとして観測される可能性があり、DGE-AUC による rAAV の包括的な評価を妨げる。したがって、AAV ベクターのサイズ分布を正確かつ信頼性高く評価するには、既存の SV-AUC または BS-AUC が適している。しかし前述の通り、DGE-AUC は、F1 と F2 のような、SV-AUC や BS-AUC を含む Full/Empty 比の定量手法では分析が困難な、VP 化学量論比の異なる Full も含めて評価できる有効な手法である。VP 化学量論比は AAV ベクターの

活性に影響するため、CQA として認識されており、DGE-AUC は有用な分析法である。さらに、SV-AUC や BS-AUC はモデルフィッティングによるデータ解析を必要とするのに対し、DGE-AUC は取得データから容易に分析可能である。また、測定中に各粒子成分がバンドを形成し濃縮される特性から、AAV ベクター分析に求められる少量での評価も実現させた。総じて、これら AUC の 3 手法はカプシドや内包 DNA の種類に依らず AAV ベクターの純度を信頼性高く評価するための補完的な手法である。

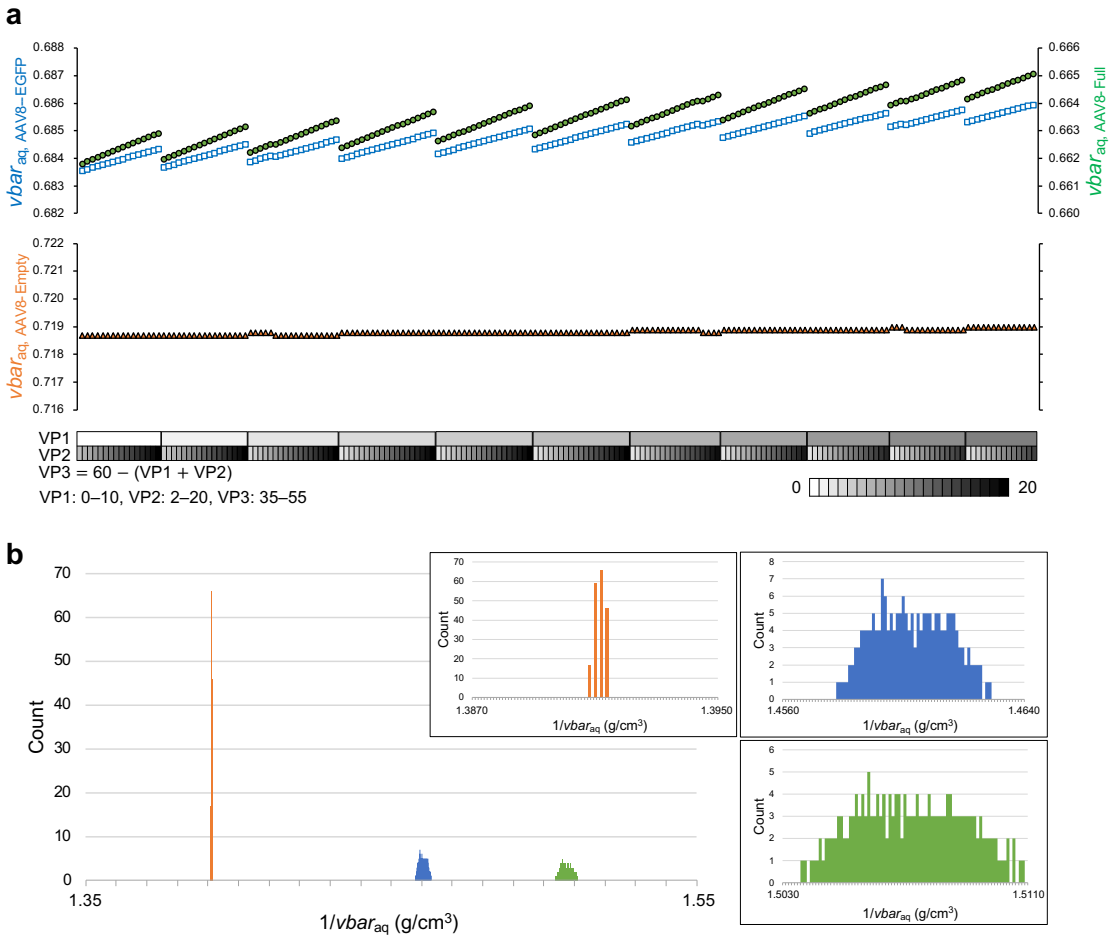


図 15.　異なる VP 化学量論比から構成されるカプシドの *vbar* および 1/*vbar* 分布

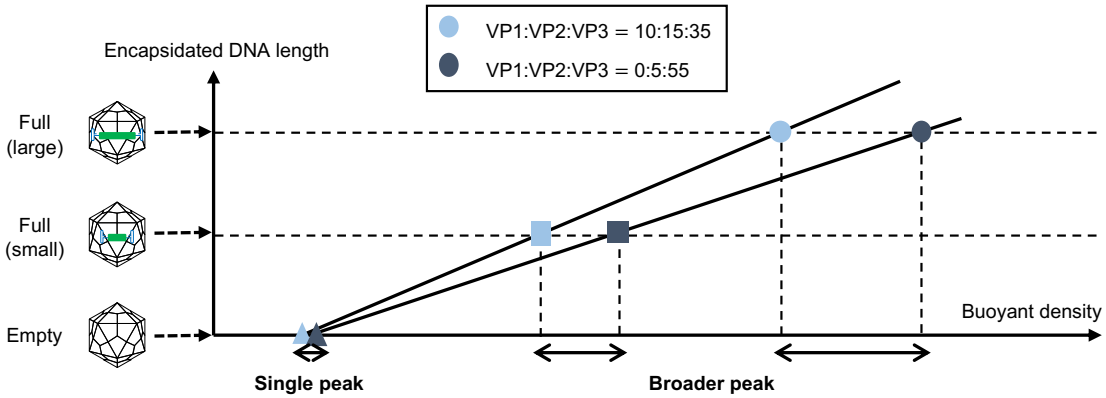


図 16.　CsCl 密度勾配中における異なる VP 化学量論比を持つカプシドの浮遊密度分布の模式図

第 3 章　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の特性解析

3-1.　緒言

治療効果を有する AAV ベクター生産のためには AAV 粒子産生後の精製工程が重要で、関心の高い研究領域である。第 2 章においてもこの観点から後半に CsCl-DGUC を用いた精製工程の検討を行った。一方で同時に、産生段階で高活性な Full が支配的となるような AAV ベクターを生産するための研究開発も盛んで、中でも VP 化学量論比の制御は重要な研究領域となっている。例えば、Bosma らは、産生された Full の VP1 や VP2 の比率が低いことが知られている BEVS において、VP1 の翻訳開始点のアミノ酸残基の置換により VP 化学量論比が変化し、感染性に影響することを報告した[99]。また、大西らも HEK 生産系において VP3 の翻訳開始点の適切なアミノ酸残基の置換により、カプシド中の VP1 および VP2 の比率が高くなり、遺伝子導入効率が向上することを見出した[110]。

更に、AAV ベクターは他のウイルスベクター、例えば Ad（~8-36 kb）やレトロウイルスおよびレンチウイルス（~8 kb）に比べてベクターDNA のパッケージング容量が小さい[111]。加えて、wtAAV の ITR はシスエレメントとして保持されるため、両端の ITR を除いた 4.5 kb 程度の範囲でベクターDNA を設計することになる。そのため、設計したベクターDNA がカプシドにパッケージングされ Full となるパッケージング効率もこれまで研究がなされてきた。初期の研究では、rAAV2 の最適な設計 DNA 鎖長は 4.1～4.9 kb と決定され、それ以上の鎖長から 5.2 kb まではパッケージング効率および *in vitro* での遺伝子発現が著しく低下することが示された[112]。別の研究では wtAAV のゲノムに 100 bp の DNA を挿入することでパッケージング容量を調べた。その結果、wtAAV と同程度の感染性 AAV を産生できる最大の DNA の鎖長は約 5.6 kb であると結論づけた[113]。以降の研究においても同様の結果が報告されており[114]、血清型に関わらず rAAV の設計 DNA 鎖長の上限は約 5 kb であると考えられている。したがって、このパッケージ

ング容量の制約の中でのベクターDNA の設計も長年にわたって精力的に研究が進められている[47]。

第 2 章における、異なる VP 化学量論比からなるカプシドの浮遊密度に関する考察から、Full のカプシドの VP 化学量論比の違いによる浮遊密度差は内包 DNA の鎖長に依存していた。しかしながら驚くべきことに、構成エレメントの違いにより全長の異なる設計 DNA の rAAV8 の DGE-AUC では、内包 DNA の鎖長に依存して Full の浮遊密度の異なる成分の量比が変化していた。この結果から、Full のカプシドの VP 化学量論比の不均一性が内包 DNA の鎖長に影響されていることが示唆された。ただ、第 2 章で用いたこれらの rAAV8 は異なる生産系あるいは精製工程を経て産生されており、系統的な比較は困難であった。また、最近までにも内包 DNA 鎖長の異なる rAAV の生産性あるいは物理化学的、生物学的特性に関する比較研究は数多く行われている[88,115–121]。しかしこれまでに VP 化学量論比と内包 DNA の鎖長の関係に着目した包括的な比較研究は報告されていない。そのため本章では、元となる設計 DNA のプラスミド中の構成エレメントはそのままに、2 種類の異なる長さのスタッファー配列を挿入したプラスミドを調製した。同じ生産方法でこれら全長の異なる設計 DNA を内包した rAAV8 を作製し、系統的かつ包括的な特性解析を実施した。第 2 章で用いた分析法に加えて、Full/Empty 比の定量にマスフォトメトリー（Mass photometry：MP）を、粒子成分の不均一性について電荷検出質量分析（Charge detection mass spectrometry：CD-MS)、および次世代シーケンシング（Next-generation sequencing：NGS）を用いた。これらの包括的な特性解析結果から、VP 化学量論比と内包 DNA 鎖長に着目したパッケージングに関わる機序を明らかにすることを目的とした。

3-2.　実験材料および実験方法

3-2-1.　プラスミド構築

全長 2.5 kb の発現カセット（pCMV-EGFP-WPRE-BGH pA）の BGH pA と 3’ITR の間に 2 種類のスタッファー（stuffer）配列を挿入して、サイズを増加させた発現カセットを設計した（図 17）。2 種類のスタッファー配列、Stuffer1.10 および Stuffer2.16 は、それぞれ全長 1.10 kb および 2.16 kb で、GC 含量が 50%で潜在的な機能要素を含まないように設計され、BLAST 配列でヒットしないことを確認した非コード DNA 配列である。GenScript においてスタッファー配列を元の発現カセットに挿入し、配列確認を行なった。それぞれの配列は図 S7 に示した。

3-2-2.　細胞株および細胞培養

rAAV ベクター作製には HEK293F（Viral Production Cells 2.0）浮遊細胞を用いた。細胞の維持培養に関する詳細は 2-2-1 と同様である。また、HeLaRC32 接着細胞を AAV の *in vitro* 遺伝子導入効率の評価に用いた。10%ウシ胎児血清（FBS, Hyclone［GE Healthcare Life Sciences］, Madison, WI）および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン（Gibco［Thermo Fisher Scientific］, Grand Island, NY）を添加した Dulbecco’s modified Eagle’s medium（Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA）を用いて 37℃、5% CO_2 で維持培養した。いずれの細胞も生存細胞数は Vi-CELL BLU（Beckman Coulter）を用いて計測した。

3-2-3.　rAAV 作製

異なる長さの 3 種類の発現カセットを内包する rAAV8（AAV8-EGFP、AAV8-EGFP-Stuffer1.10、および AAV8-EGFP-Stuffer2.16）は HEK293F 細胞を用い、トリプルトラ

ンスフェクション法により作製した。作製法および精製法の詳細は 2-2-2 と同様である。

3-2-4. qPCR による rAAV 力価の決定

rAAV ベクターは、AAVpro® Titration Kit（for Real-Time PCR）Ver. 2（Takara bio）を用いて QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）でリアルタイム定量 PCR（quantitative PCR：qPCR）により定量した。酵素の熱失活とカプシドの変性に続いて、カプシド外の DNA を消化するために DNase I 処理を行った。抽出したウイルスゲノムを希釈し、TB Green インターカレート色素を含む溶液と混合した。陽性コントロールの希釈系列（2×10^7～2×10^2 copies/ μL）を測定し、標準曲線を作成した。95℃での 2 分間の初期変性に続いて、95 ℃での 5 秒間の変性と 60 ℃、30 秒間のアニーリングを 35 サイクル行い、最終的に融解曲線を解析した。

3-2-5. MP による Full/Empty 比の決定

MP 測定は TwoMP（Refeyn，Oxford，UK）を用いて実施した。カバーガラス（24 ×50 mm precision；Thorlabs，Newton，NJ，USA）は Milli-Q 水とエタノールで洗浄して準備した。あらかじめカットした 2×3 培養ウェル用ガスケット（Grace Bio-Labs，Bend，OR，USA）をカバーガラス上に配置した。MP 測定では、1×PBS を 18 μL ガスケットで形成したウェルに注入し、焦点を自動調整した。続いて、最終体積 20 μL となるようにサンプルを 2 μL 同じウェルに添加し、ピペッティングにより混合した。次に、AcquireMP software version 2. 5. 0（Refeyn）を用いて 60 秒間の動画データを記録した。MP 動画ファイルは DiscoverMP software version 2. 5. 0（Refeyn）. で解析した。各サンプルの分子量は、BSA（Sigma-Aldrich）、アポフェリチン（Sigma-Aldrich）、サイログロ

ブリン（Sigma−Aldrich）を用いて取得したコントラスト−質量較正を適用し、MP コントラスト分布から推定した。質量分布のヒストグラムは、先行研究で用いられた Python スクリプトを用いて Empty、Full のそれぞれについてガウス関数でピークフィッティングし解析した[122]。

3−2−6.　DGE−AUC および SV−AUC

DGE−AUC および SV−AUC 測定の詳細はそれぞれ 2−2−5 と 2−2−6 と同様である。

3−2−7.　CD−MS

各サンプル（20 μL）を Micro Bio−Spin6 カラム（Bio−Rad, Hercules, CA, USA）にアプライし、pH 7.4 に調整した 200 mM 酢酸アンモニウム緩衝液に交換した。サンプル（5 μL）をガラスキャピラリーに注入し、ナノエレクトロスプレーイオン化用に in−house で金コーティングを施した。質量分析は、Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole−Orbitrap MS System（Thermo Fisher Scientific）の Direct Mass Technology mode を用いて実施した。イオン転送ターゲットと検出器は高 m/z 向けに最適化され、噴霧電圧は 1.2 kV、キャピラリー温度は 350℃、脱溶媒化電圧は −15 V であった。トラッピングガス圧は、SF6 ガスを用いて $2.50−2.77\times10^{-10}$ または $4.50−4.62\times10^{-10}$ mbar の範囲であった。データは 50 K で m/z 400 分解能、m/z 範囲 20,000-40,000（20 分間）または 10,000-40,000（30 分間）で 3 回取得され、STORIBoard softwareversion 1.0（Proteinaceous, Chicago, IL）で処理し、質量値を得るために in−house の Python 3 スクリプトを用いて解析した。

3-2-8.　CGE による VP および ssDNA 分析

CGE 測定による VP および ssDNA 分析の詳細はそれぞれ 2-2-8 と 2-2-9 と同様である。

3-2-9.　NGS

2-2-9 の CGE による ssDNA 分析と同様に DNA を抽出し、Qubit（Thermo Fisher Scientific）により、核酸濃度を決定した。ビケンバイオミクスにおいて、Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14（SQK-NBD114.24）protocol（Oxford Nanopore Technologies）に準じてライブラリーを調製した。PromethION および PromethION Flow Cell R10 （M Version）（FLO-PRO114M）（Oxford Nanopore Technologies）を使用し、シーケンシングランを実施した。測定データのベースコールは装置付属のベースコーラー Dorado Ver. 7.6 により、High-accuracy model v4.3.0, 400 bps モードで実施した。解析は Geneious を用いて解析した。

3-2-10.　dPCR による rAAV 力価の決定

rAAVにDNase I（Takara Bio，滋賀，日本）、および0.05% w/v Poloxamer 188の10x DNase I緩衝液で希釈した。この溶液を37℃で30分間インキュベートし、カプシド外部のDNAを消化した。この溶液を最終濃度50 mMのpH 8.0 EDTA（NIPPON GENE）を添加し、25℃で5分間処理してDNase Iを不活化した。その後95℃で10分間加熱し、カプシドを変性させ、0.001% w/v Poloxamer 188を含むTE緩衝液（Invitrogen，Waltham，MA，USA）で必要な濃度に希釈した。dPCRは、蛍光色素アミドイト（Hokkaido System Science、北海道、日本）を用いた ITR を標的とする特異的な順方向および逆方向プライマー（900 nM）および特異的なプローブ（250 nM）を用いた二重アッセ

イとして実施した。反応混合液は、プライマー、プローブ、nuclease−free water, および QuantStudio Absolute Q DNA Master Mix（Thermo Fisher Scientific）で構成された。dPCR は、QuantStudio Absolute Q Digital PCR System および16−well microfluidic array plates（Thermo Fisher Scientific）を用いて実施した。94℃で10分間の酵素活性化後、94℃で5秒間、54℃で30秒間の40サイクルで構成された。使用したプライマーおよびプローブは次のとおりである。ITR forward primer 5’−GGA ACC CCT AGT GAT GGAGTT−3′；ITR reverse primer 5′−CGG CCT CAG TGA GCGA−3′；ITR probe 5′−[FAM]−CAC TCC CTC TCT GCG CGCTCG［BHQ1]−3′。

3−2−11. *in vitro* での遺伝子導入効率の評価

HeLaRC32 細胞を、24well 培養プレート（Corning Inc.）に 5×10^4 cells/well となるように播種した。rAAV2 を 1×10^2、5×10^2、1×10^3、2.5×10^3、および 5×10^3 の感染多重度（multiplicity of infection: MOI）で感染させた（各条件 3 回繰り返し）。感染後 48 時間で、細胞を回収し DPBS（FUJIFILM Wako Pure Chemical）で洗浄し、TrypLE™ Select Enzyme（Thermo Fisher Scientific）を用いて剥離した。EGFP 発現の解析は、フルオレセインイソチオシアネート（励起：498 nm、発光：522 nm）チャンネルを用い、CytoFlex II Flow Cytometer（Beckman Coulter）を用いて行った。いずれの rAAV8 サンプルも MOI が 2×10^4、5×10^4、2.5×10^5、5×10^5、および 1×10^6 の MOI で感染させた（各条件 3 回繰り返し）。

3−3.　結果

3−3−1.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の生産性

実験方法に記載の通り、内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8（AAV8−EGFP、AAV8−EGFP−Stuffer1. 10、および AAV8−EGFP−Stuffer2. 16）を作製した。発現カセットのプラスミド濃度は異なっていたが、いずれも pAAV−Transgene、pAAV−*rep/cap* および pAd−Helper を、1:1:1 の重量比でコトランスフェクションした。1 回目の CsCl−DGUC 後の遠心チューブを図 18 に示す。いずれの rAAV8 においても Full と考えられる異なる浮遊密度の 2 成分に対応するバンドが確認され、これらの量比が内包 DNA の鎖長に応じて変化していることが示唆された。したがって 2−3−2 と同様に、この段階で多量に含まれる Empty を取り除き、Full の低浮遊密度および高浮遊密度成分もそれぞれ F1 および F2 として分画回収した。続く 2 回目の CsCl−DGUC で F1 と F2 を別々の遠心チューブにアプライすることで、それぞれを高純度に回収した。

また、トランスフェクション後のサンプルの qPCR 測定を実施し、生産性を比較した（図 19a）。力価は内包 DNA 鎖長が長くなるにつれて低下することが確認された。更に、AC 精製後の Full/Empty 比を決定した（図 19b）。Full/Empty 比に関しても、内包 DNA 鎖長の増加にしたがって低下することが確認された。

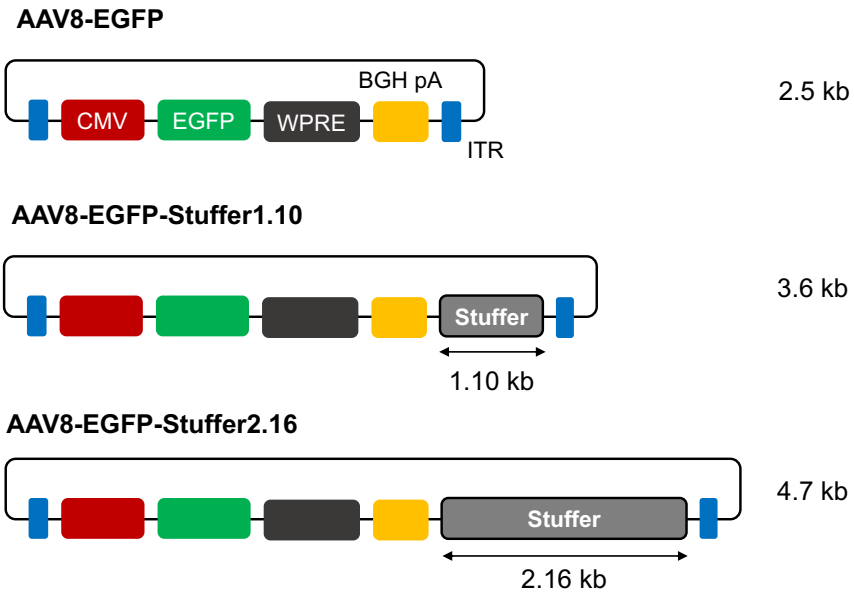


図 17.　本研究で用いた 3 種類の全長の異なる発現カセットの模式図

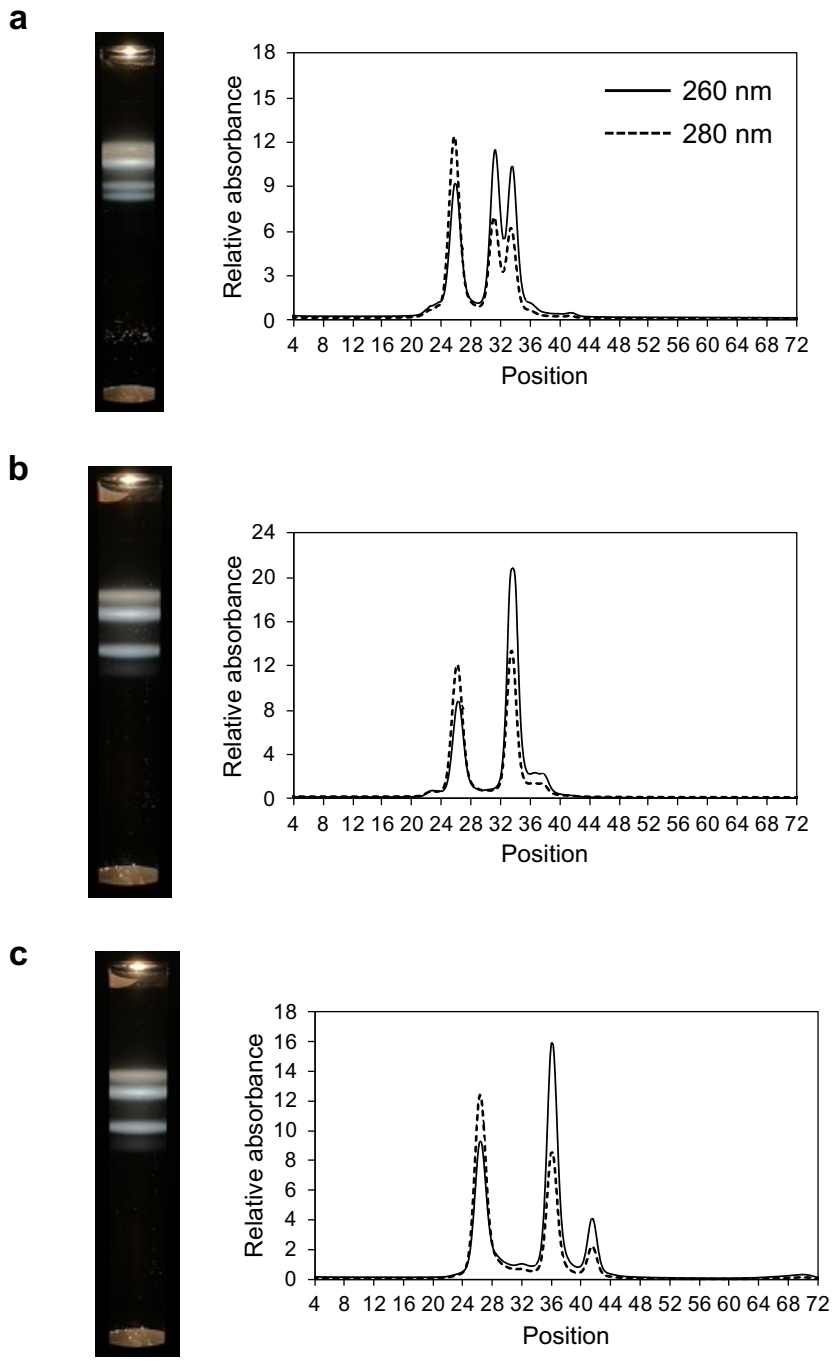


図 18.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の CsCl−DGUC による分離・分画

（a）AAV8-EGFP（2.5 kb）（b）AAV8−EGFP-Stuffer1.10（3.6 kb）（c）AAV8-EGFP-Stuffer2.16（4.7 kb）

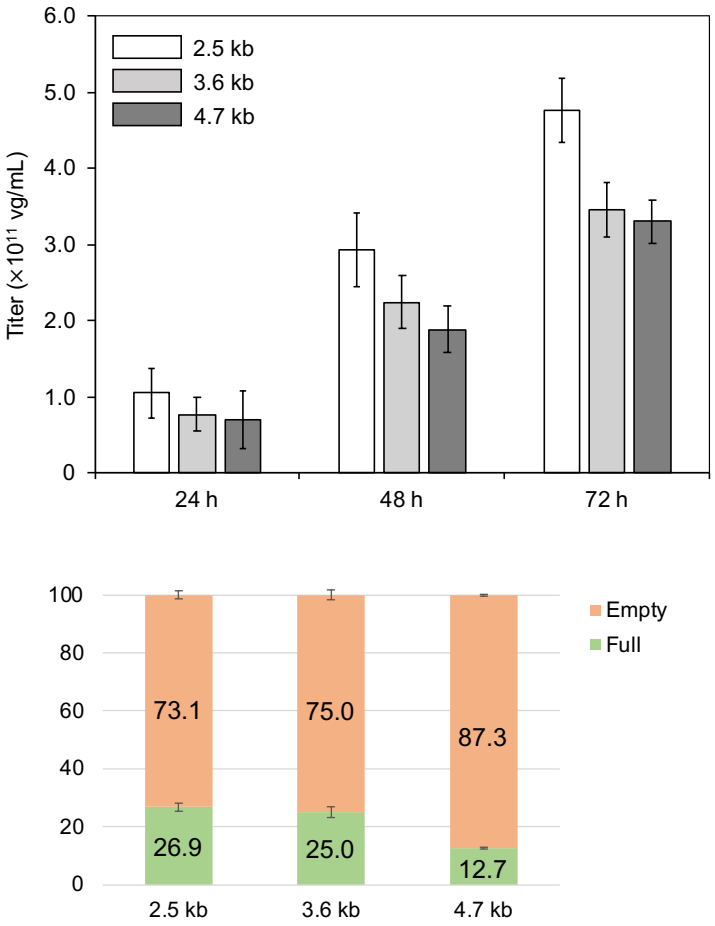


図 19.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の（a）トランスフェクション後の力価および（b）AC 精製後の Full/Empty 比

3-3-2.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の不均一性の評価

2 回の CsCl-DGUC により分離・分画された AAV8-EGFP、AAV8-EGFP-Stuffer1. 10、および AAV8-EGFP-Stuffer2. 16 のそれぞれの F1 と F2 を DGE-AUC、F1 を CD-MS により分析した（図 20）。第 2 章で確立した DGE-AUC は浮遊密度に基づいた不均一性の評価が可能で、CD-MS は、測定対象物の各イオンの m/z 比と電荷の同時測定から個々のイオンの質量を決定することで、従来の MS では測定できなかった不均一で高分子量成分の質量分布を決定することを可能にした。その結果、Full/Empty 比を含め rAAV に含まれる成分を質量に基づいて分離分析でき、DGE-AUC の直交法として使用した。両者の測定結果から、いずれの rAAV8 の F1 および F2 も純度高く回収できていることが示された。

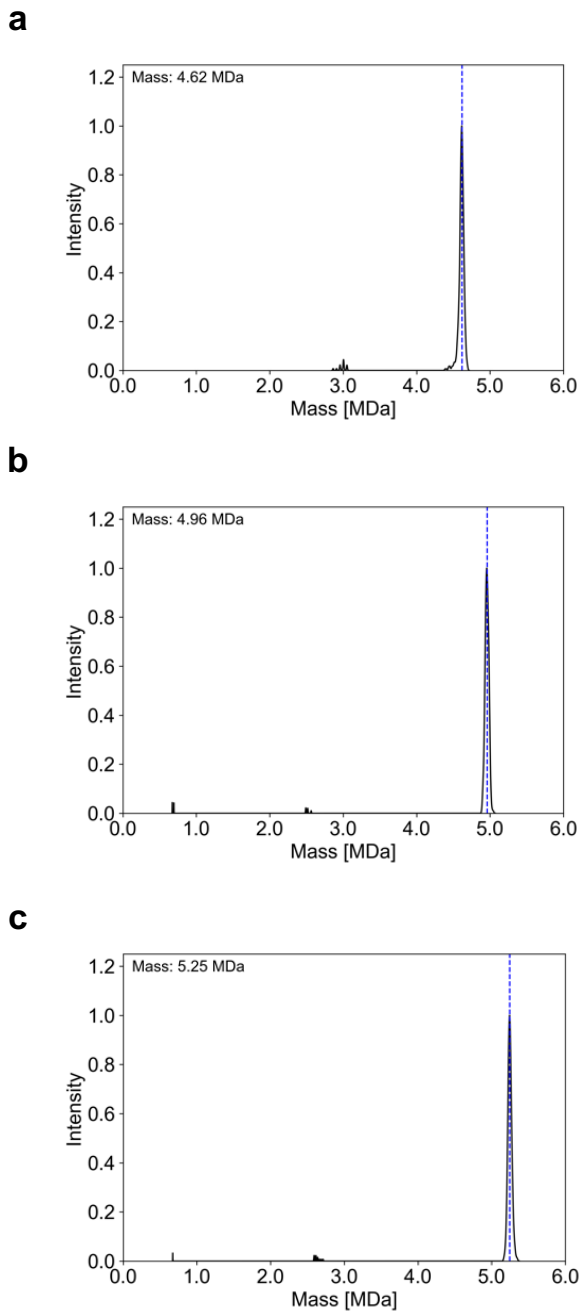


図 20. 内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の DGE−AUC および CD−MS

（a）AAV8-EGFP（2.5 kb）（b）AAV8−EGFP-Stuffer1.10（3.6 kb）（c）AAV8-EGFP-Stuffer2.16（4.7 kb）

3-3-3.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 のカプシドおよび内包 DNA の特性解析

AAV8-EGFP、AAV8-EGFP-Stuffer1. 10、および AAV8-EGFP-Stuffer2. 16 の F1 および F2 の CGE を用いた VP および内包 DNA の特性解析の結果を図 21 に示す。いずれの rAAV8 においても F1 と F2 の間で内包された DNA 鎖長に明確な差は確認されなかった（図 21a)。また、設計 DNA 鎖長よりも短い DNA の分布も確認され、全長 DNA に対する量比は内包 DNA が長い方が高かった。一方で、エレクトロフェログラムにおける VP 成分のピーク面積から決定された VP 化学量論比は、AAV8-EGFP の F1 では VP1：VP2：VP3 = 5.0：7. 2：47.8、F2 では VP1：VP2：VP3 = 3.9：6.3：49.8 であり、F1 の方が F2 に比べて VP1 および VP2 の比率が高かった。この結果は第 2 章での結果と一致しており、より内包 DNA 鎖長が長い AAV8-EGFP-Stuffer1. 10、および AAV8-EGFP-Stuffer2. 16 においても同様の結果が得られた。つまり、Full の浮遊密度の異なる 2 成分において VP 化学量論比の差が、低浮遊密度と高浮遊密度成分の分離を引き起こすことが、内包 DNA 鎖長が 2. 5　kb の場合に限らない現象であることを実証した。更に注目すべきことに、F1 と F2 のいずれも内包 DNA 鎖長が長くなるにつれて、VP1 および VP2 の比率が低くなり、VP3 の比率が高くなる傾向が確認された。

内包 DNA の特性解析には第 2 章から CGE を用いていたが、合わせて F1 について NGS による解析も実施した（図 22)。その結果、いずれの rAAV8 も設計 DNA の全長を内包していた一方で、CGE 同様設計 DNA 鎖長よりも短い DNA の分布も確認され、これは主に設計 DNA の断片であることが明らかとなった。また先行研究で設計 DNA が長くなると断片 DNA がパッケージングされやすくなることが報告されており [121]、本研究での結果と一致していた。

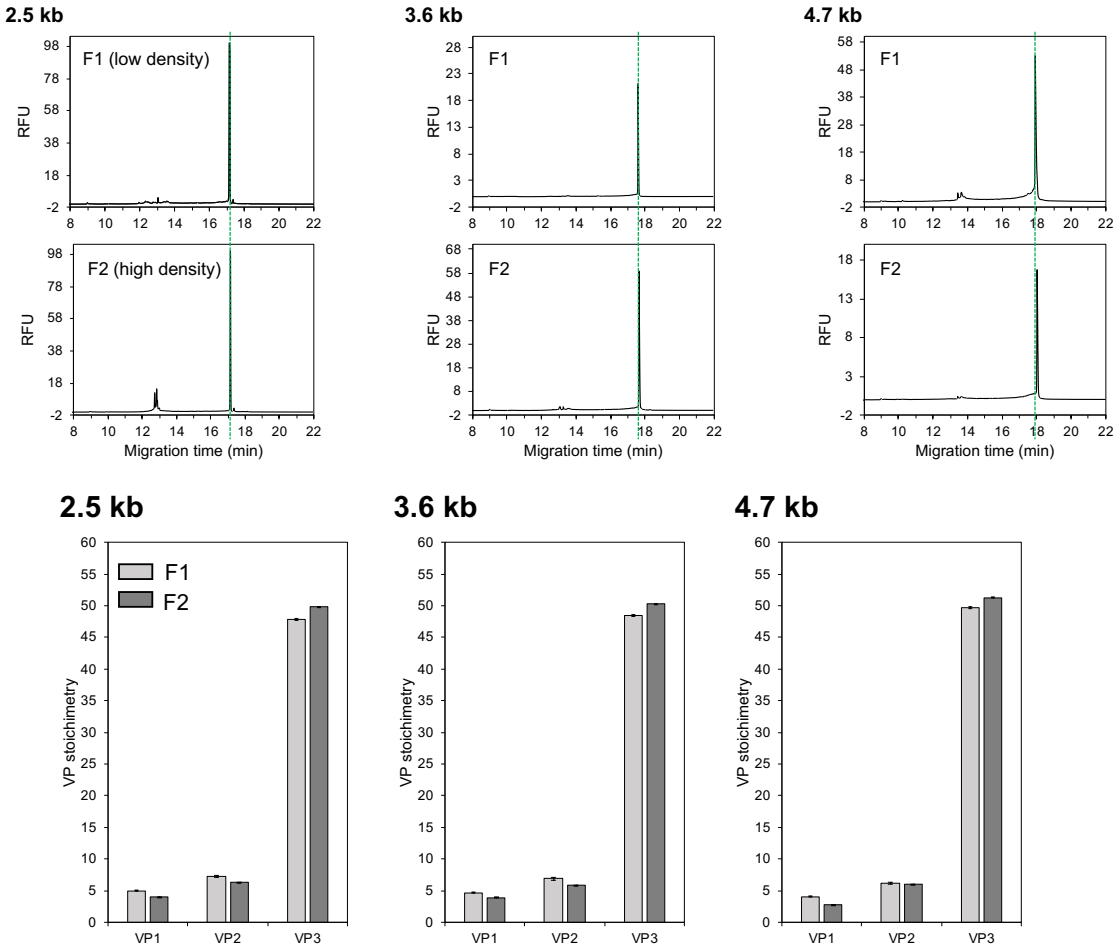


図 21.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の特性解析（a）CGE による内包 DNA のエレクトロフェログラム（b）CGE による各 VP のピーク面積から算出された VP 化学量論比

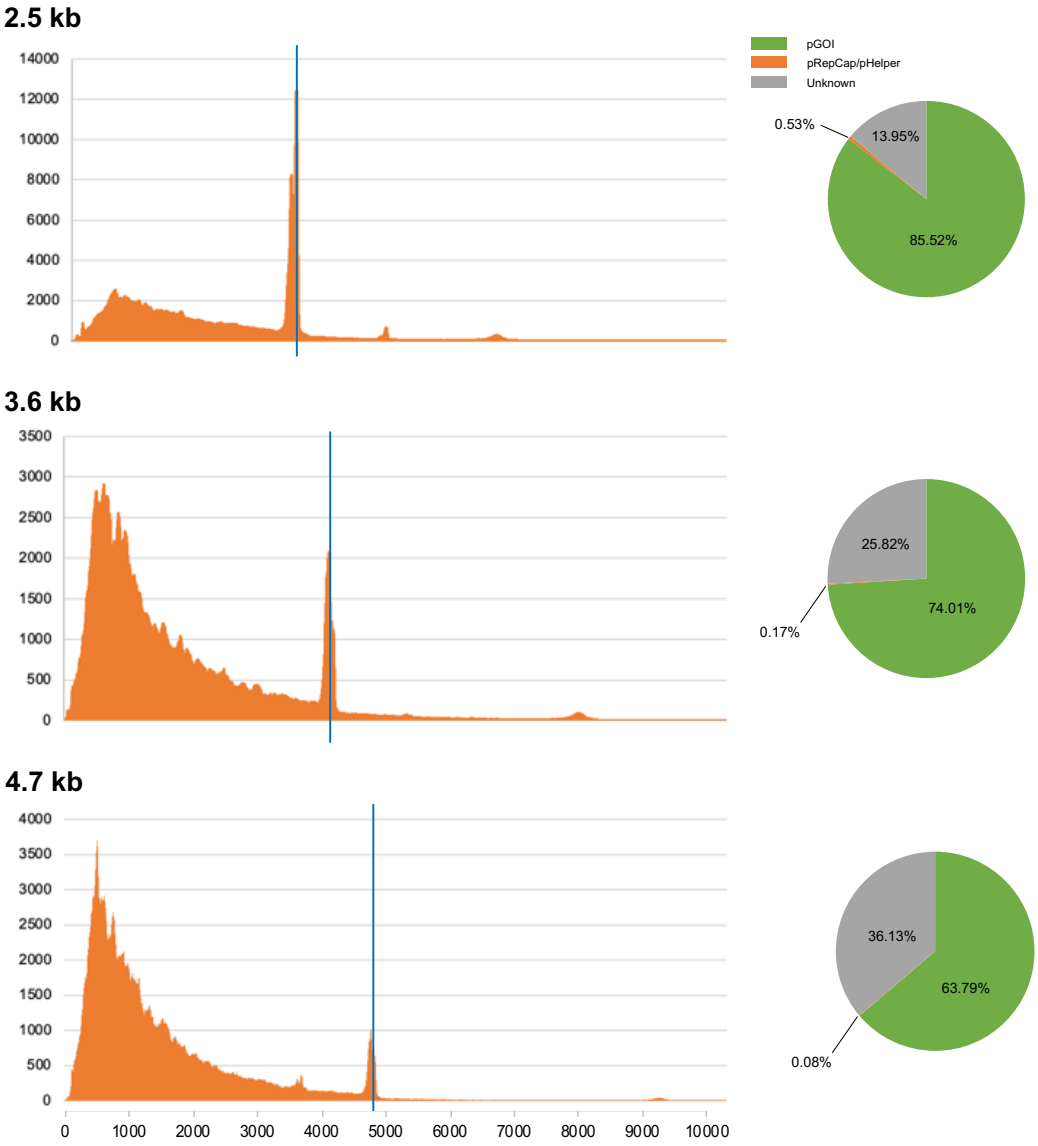


図 22.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の NGS 解析（左）分析された（右）分析された全配列からランダムに抽出した 10000 リードの配列の由来の割合

3-3-4.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

最後に AAV8-EGFP、AAV8-EGFP-Stuffer1. 10、および AAV8-EGFP-Stuffer2. 16 の F1 および F2 の *in vitro* における遺伝子導入効率について HeLaRC32 細胞を用いて評価した。各 rAAV8 の F1 と F2 間の導入効率を比較すると、いずれも F1 の方が有意に高かった（図 23a）。また、内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の F1 間で比較すると、内包 DNA 鎖長の増加にしたがって導入効率は有意に低下することが示された（図 23b）。

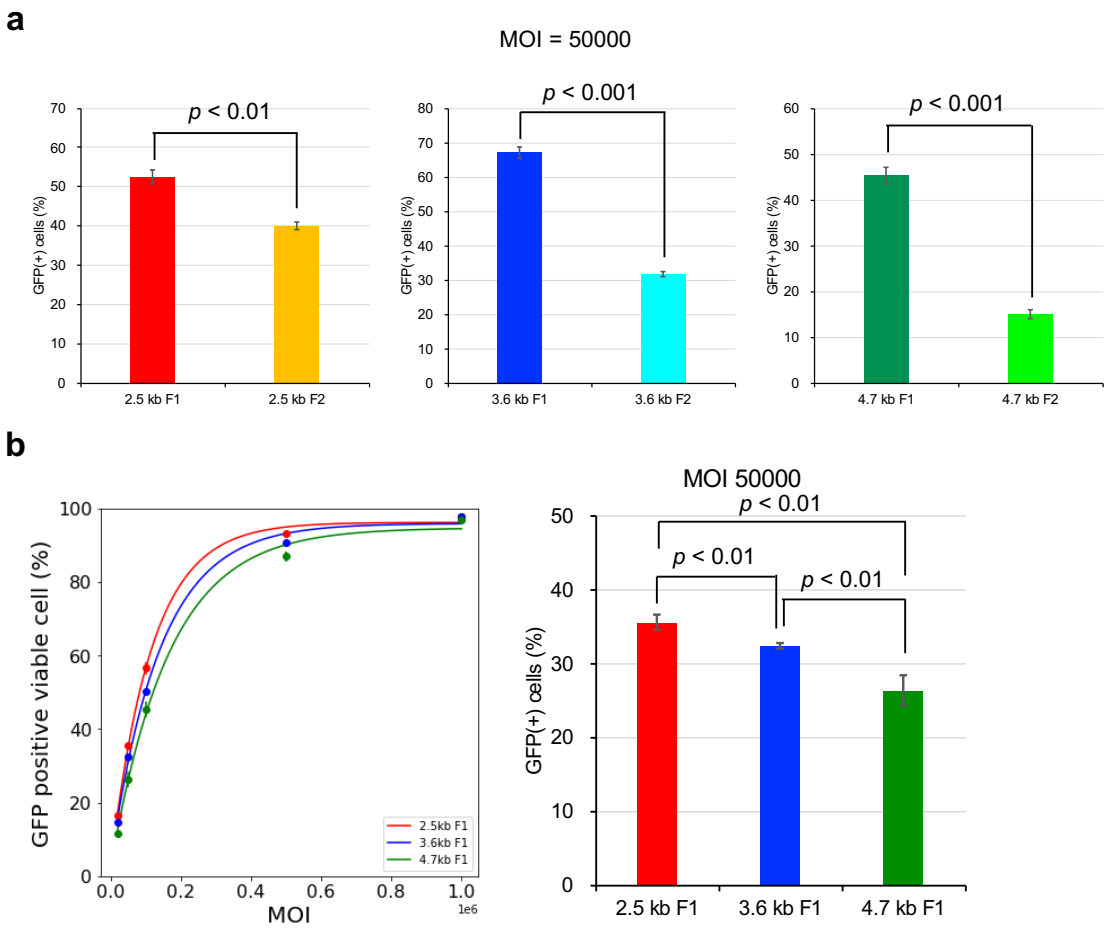


図 23.　内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の *in　vitro* の遺伝子導入効率（a）内包 DNA 鎖長の異なる各 rAAV8 の F1 と F2 の比較（b）内包 DNA 鎖長の異なる rAAV8 の F1 間の比較

3-4.　考察

内包 DNA 鎖長の異なる 3 種類の AAV8-EGFP、AAV8-EGFP-Stuffer1. 10、および AAV8-EGFP-Stuffer2. 16 の特性を系統的に評価するために同じ生産系での作製と精製工程を経て回収した。力価および Full/Empty 比は内包 DNA 鎖長が長くなると低下した。また、各 rAAV8 の Full の浮遊密度の不均一性は内包 DNA が長くなるに従い低下し、F1 と F2 の VP 化学量論比に差があることが明らかになった。加えて、内包 DNA 鎖長が長くなるにつれて、Full の VP1 および VP2 の比率が低くなり、VP3 の比率が高くなる傾向が示唆された。

以上の結果から、図 24 に示すようなパッケージングの機序が考えられた。まず各 VP の発現後、確率的に各 VP がカプシドに組み込まれてアセンブリーが進み VP の 60 量体からなるカプシドが形成される [77]。このアセンブリー過程は迅速に進み、アセンブリーされたカプシド、すなわち Empty に ssDNA が内包されるパッケージング過程が律速段階であることが知られている [123]。この個々のカプシドの VP 化学量論比が異なる不均一なカプシド集団に 2. 5kb のような「短い」DNA がパッケージングされる場合には、容易にパッケージングが進む。ここで、カプシドの内側に位置する VP1u および VP1/VP2 共通領域の N 末端を含む VP1 や VP2 の比率が高いカプシドでもパッケージングが進む。その結果、力価および Full/Empty 比が高くなり、Full となったカプシドの VP 化学量論比の不均一性も高くなる。これに対し、wtAAV ゲノムの 4. 7 kb と同等の「長い」DNA がパッケージングされる場合には、逆の現象が生じる。つまり、DNA 自身の鎖長により、全長の設計 DNA をパッケージングできるカプシドに制約が生じる。これは、VP1 や VP2 の比率が高いカプシドではパッケージングが進みにくくなり、相対的に VP3 のカプシドの比率が高いカプシドでパッケージングが進むことになる。その結果、力価および Full/Empty 比は低くなり、Full となったカプシドの VP 化学量論比の不均一性も低下する。また、内包 DNA 鎖長が長くなると全長の内包 DNA に対する

断片 DNA の量比が増加することは、長い DNA の完全長でのパッケージングが困難になっていることが反映された結果であると考えられる。

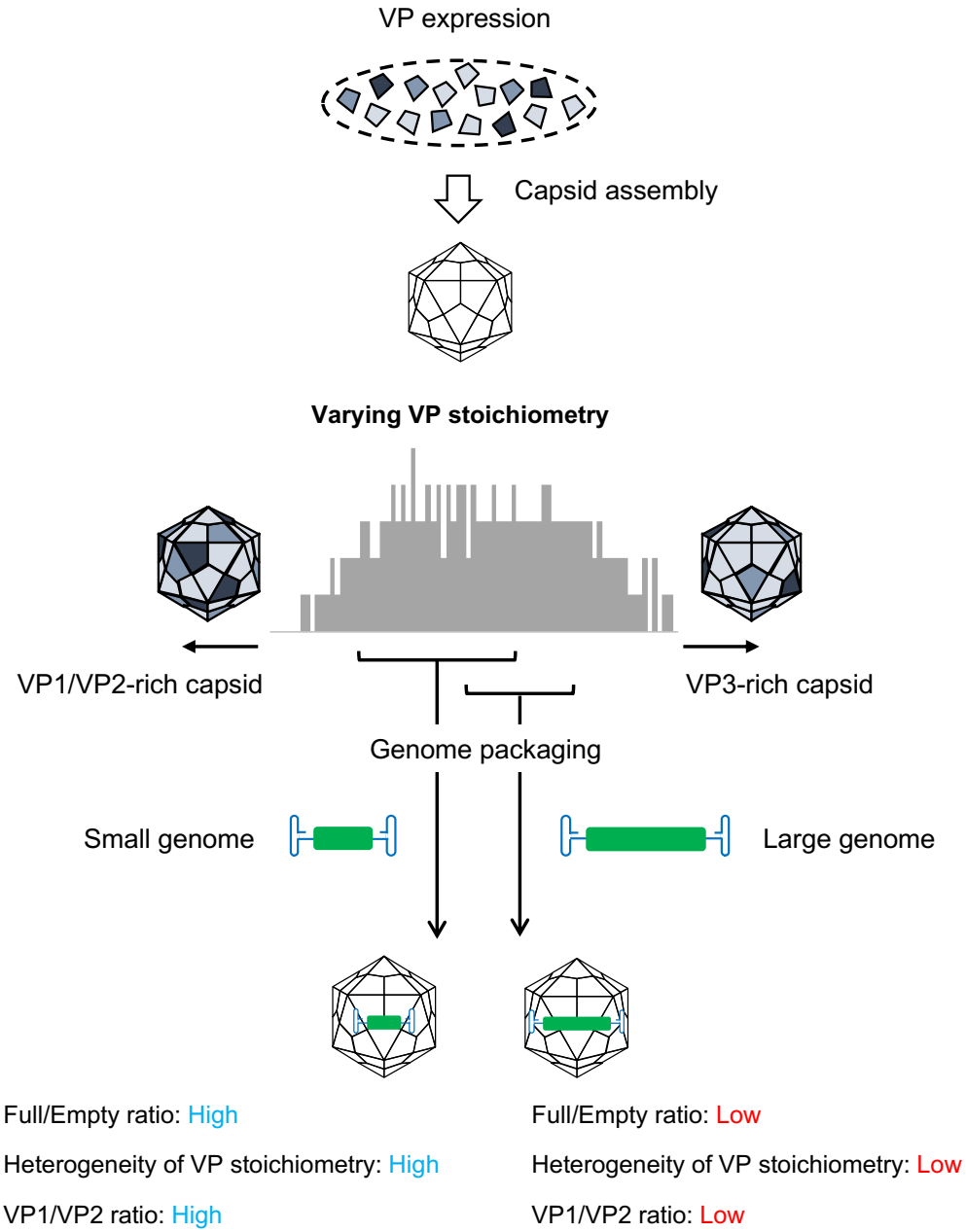


図 24.　鎖長の異なる DNA をパッケージングする際の Full の生成機序

第 4 章　総括と展望

4-1.　本博士論文の総括

AAV ベクターは多くの利点により、遺伝子治療用ベクターとして実用化が急速に進んでいる。一方で、適用範囲が広くなるにつれて解決すべき課題も指摘されている。特に、高感度・高分解能な新規分析技術の開発に伴い、AAV ベクター中のカプシドの VP 化学量論比や内包 DNA に起因した不均一性も明らかとなりつつある。そのため、これらの不均一性により生産性や有効性が低下したり、投与量の増加に伴う有害事象を含む安全性が懸念されている。したがって、今後の AAV ベクターを用いた遺伝子治療の更なる発展のためには、AAV ベクター中に存在する不均一性の評価とともに理解を深めることが非常に重要である。

本博士論文では、まず第2章で、長らく結論が導かれていなかったFullと考えられる異なる浮遊密度成分が、カプシドのVP化学量論比の違いが原因で生じることを特性解析により特定した。そして、このVP化学量論比の不均一性を含めて定量的に評価可能な新規分析法であるDGE-AUCを確立した。加えて、異なるVP化学量論比のカプシドのCsCl密度勾配中での分布をシミュレーションすることで、内包DNAの鎖長に依存してこの分布が変動するという体系的な理解に繋げた。

第3章では、第2章におけるrAAV8のDGE-AUCの測定結果と考察から、VP化学量論比と内包DNA鎖長の関係に注目して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実験系を構築した。その結果、FullのVP化学量論比およびその不均一性が内包DNA鎖長に応じて変動することを初めて示した。また、VP化学量論比と*in vitro*での遺伝子導入効率との関係も確認した。最後に、得られた結果に基づいてパッケージングに伴うFullの生成機序を提唱した。

したがって、本研究は AAV ベクター中に存在する不均一性の評価に資する新規分析法の確立により AAV ベクターの品質管理に寄与する。また、これまで AAV ベクターの

研究開発においては、カプシドの構築や 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。しかし、本研究において明らかになった VP 化学量論比と内包 DNA 鎖長の関係と AAV ベクターの不均一性についての知見により、有効性の高い AAV ベクターの新たな設計戦略に貢献するものである。

4-2.　今後の展望

遺伝子治療は遺伝子工学などの進歩に伴い発展を遂げてきた分野であり、今後も応用展開が広がることが予想されている。この実用的な技術開発に加えて、基礎研究に基づく生物学的知見が明らかになることで新たな技術革新が生まれてきた側面もある。本研究においても、AAV ベクターの不均一性の評価および低減に関わる成果により AAV ベクターを用いた遺伝子治療の有効性と安全性の向上に寄与することが期待される。

一方で、wtAAV の生活環と rAAV の生産および遺伝子導入に共通するカプシドのアセンブリや DNA のパッケージング機序、およびこれらの過程に関わる相互作用の生物学的知見はいまだに不足している。しかしながらこれらの解明は今後のベクターの開発・最適化に寄与することは明らかである。そのため、本研究で提唱したパッケージングに伴う Full の生成機序に関与する相互作用や因子などの特定は非常に重要である。

更に、rAAV にはさまざまなカプシドと設計 DNA 鎖長の組み合わせが存在するため、本研究で導かれた結論が、他の生産系やカプシドにおいても同様で、普遍的なものであるかについて検証を行う必要があると考えられる。

これまでの AAV ベクター開発では、カプシドエンジニアリングなどのカプシドの設計と最適なベクターDNA の設計は独立して進められてきた。しかし、近年の研究でカプシドとプロモーター間の相互作用が示唆され、この相互作用が *in vivo* での遺伝子発現にも影響することが報告されている。これは、AAV ベクターの構成要素を包括的に考慮した設計の重要性を強く示唆するものである。本研究においても VP 化学量論比と内包 DNA 鎖長の関係が明らかになり [124, 125]、統合的な AAV ベクター設計の必要性を支持する。以上より、これらの知見に基づいた AAV ベクター設計の最適化が行われることで更なる研究開発が進み、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。

補足資料

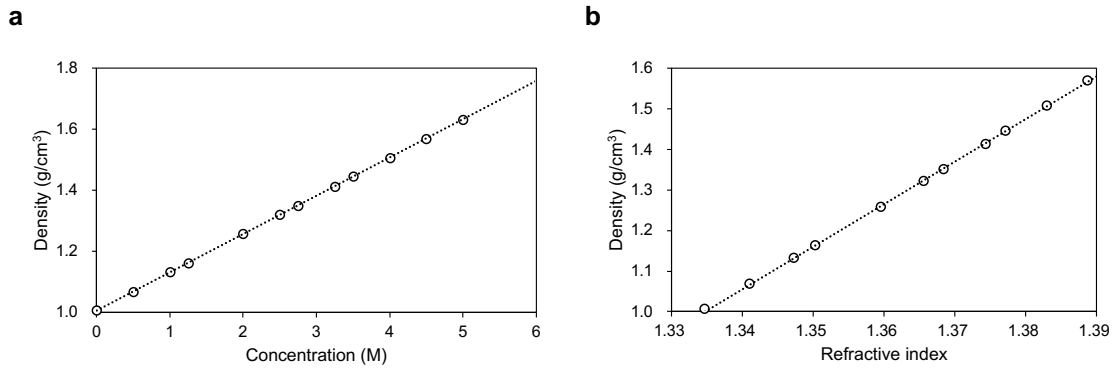


図 S1.　CsCl 濃度の異なる PBS 緩衝液（a）濃度と密度、および（b）密度と屈折率の関係

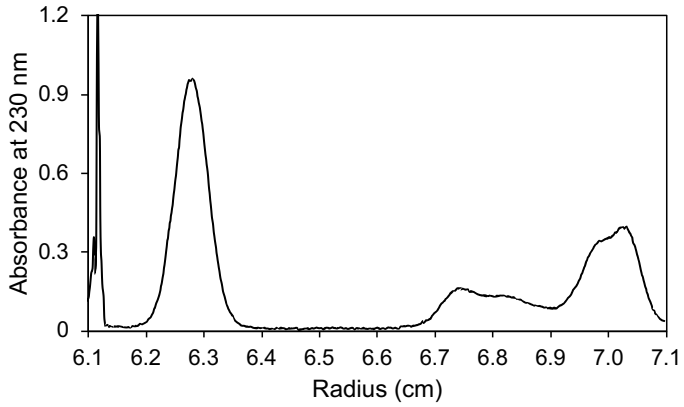


図 S2.　AAV5−ZsGreen1 の 230 nm での DGE−AUC 平衡プロファイル

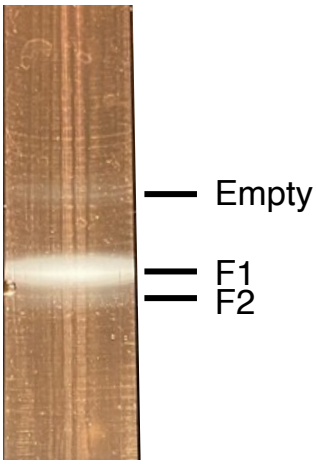


図 S3.　AAV8−EGFP の 1 回目の CsCl−DGUC の様子

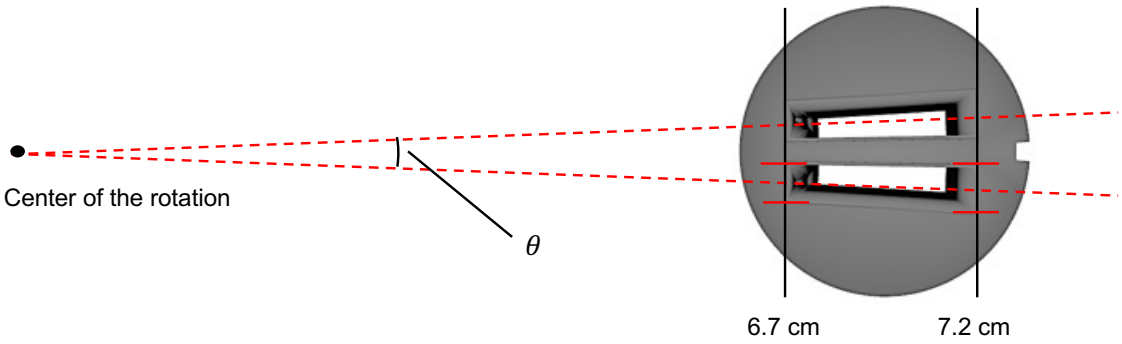


図 S4.　AUC セルのセンターピースのセクター形状

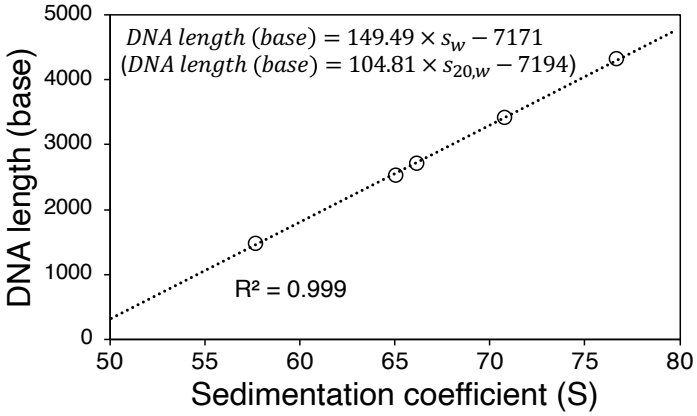


図 S5.　rAAV8 の BS-AUC 測定により得られた *s* 値と内包 DNA 鎖長の線形相関

表 S1.　購入あるいは提供 rAAV の情報

Sample	Manufacturer	Cell used for manufacturing	Purification
AAV8-H4C1	Vector Builder	HEK293T	1. PEG precipitation 2. CsCl-DGUC
AAV8-EGFP			
AAV8-FIXp			
AAV2-EGFP			
AAV8-oScarlet	Addgene	HEK293	Iodixanol-DGUC
AAV8-mCherry-EGFP			
AAV5-ZsGreen1	MAB	HEK293	-

表 S2.　異なる VP 化学量論比の rAAV8 の Mw および$vbar_{aq}$の理論値

No.	VP stoichiometry			AAV8 EP		AAV8-CMV-EGFP (2.5 kb)		AAV8 FP (4.7 kb)	
	VP1	VP2	VP3	Mw (Da)	*vbar* (20ºC)	Mw (Da)	*vbar* (20ºC)	Mw (Da)	*vbar* (20ºC)
1	0	5	55	3621587.7	0.7187	4399007.0	0.6836	5073590.8	0.6618
2	0	6	54	3628301.1	0.7187	4405720.4	0.6836	5080304.1	0.6619
3	0	7	53	3635014.5	0.7187	4412433.8	0.6837	5087017.5	0.6620
4	0	8	52	3641727.9	0.7187	4419147.2	0.6837	5093730.9	0.6620
5	0	9	51	3648441.3	0.7187	4425860.6	0.6838	5100444.3	0.6621
6	0	10	50	3655154.6	0.7187	4432573.9	0.6838	5107157.7	0.6622
7	0	11	49	3661868.0	0.7187	4439287.3	0.6839	5113871.1	0.6623
8	0	12	48	3668581.4	0.7187	4446000.7	0.6839	5120584.4	0.6623
9	0	13	47	3675294.8	0.7187	4452714.1	0.6840	5127297.8	0.6624
10	0	14	46	3682008.2	0.7187	4459427.5	0.6840	5134011.2	0.6625
11	0	15	45	3688721.6	0.7187	4466140.9	0.6841	5140724.6	0.6626
12	0	16	44	3695434.9	0.7187	4472854.2	0.6841	5147438.0	0.6626
13	0	17	43	3702148.3	0.7187	4479567.6	0.6842	5154151.4	0.6627
14	0	18	42	3708861.7	0.7187	4486281.0	0.6842	5160864.7	0.6628
15	0	19	41	3715575.1	0.7187	4492994.4	0.6843	5167578.1	0.6629
16	0	20	40	3722288.5	0.7187	4499707.8	0.6843	5174291.5	0.6629
17	1	4	55	3636736.2	0.7187	4414155.5	0.6837	5088739.3	0.6620
18	1	5	54	3643449.6	0.7187	4420868.9	0.6837	5095452.7	0.6621
19	1	6	53	3650163.0	0.7187	4427582.3	0.6838	5102166.1	0.6621
20	1	7	52	3656876.4	0.7187	4434295.7	0.6838	5108879.4	0.6622
21	1	8	51	3663589.8	0.7187	4441009.1	0.6839	5115592.8	0.6623
22	1	9	50	3670303.2	0.7187	4447722.5	0.6839	5122306.2	0.6624
23	1	10	49	3677016.5	0.7187	4454435.8	0.6840	5129019.6	0.6624
24	1	11	48	3683729.9	0.7187	4461149.2	0.6841	5135733.0	0.6625
25	1	12	47	3690443.3	0.7187	4467862.6	0.6841	5142446.4	0.6626
26	1	13	46	3697156.7	0.7187	4474576.0	0.6842	5149159.7	0.6627
27	1	14	45	3703870.1	0.7187	4481289.4	0.6842	5155873.1	0.6627
28	1	15	44	3710583.5	0.7187	4488002.8	0.6843	5162586.5	0.6628
29	1	16	43	3717296.8	0.7187	4494716.1	0.6843	5169299.9	0.6629
30	1	17	42	3724010.2	0.7187	4501429.5	0.6844	5176013.3	0.6629
31	1	18	41	3730723.6	0.7187	4508142.9	0.6844	5182726.7	0.6630
32	1	19	40	3737437.0	0.7187	4514856.3	0.6845	5189440.0	0.6631
33	1	20	39	3744150.4	0.7187	4521569.7	0.6845	5196153.4	0.6632
34	2	3	55	3651884.8	0.7188	4429304.1	0.6839	5103887.8	0.6622
35	2	4	54	3658598.2	0.7188	4436017.5	0.6839	5110601.2	0.6623
36	2	5	53	3665311.5	0.7188	4442730.8	0.6840	5117314.6	0.6624
37	2	6	52	3672024.9	0.7188	4449444.2	0.6840	5124028.0	0.6624
38	2	7	51	3678738.3	0.7188	4456157.6	0.6841	5130741.3	0.6625
39	2	8	50	3685451.7	0.7187	4462871.0	0.6841	5137454.7	0.6625
40	2	9	49	3692165.1	0.7187	4469584.4	0.6841	5144168.1	0.6626
41	2	10	48	3698878.5	0.7187	4476297.8	0.6842	5150881.5	0.6627
42	2	11	47	3705591.8	0.7187	4483011.1	0.6842	5157594.9	0.6627
43	2	12	46	3712305.2	0.7187	4489724.5	0.6843	5164308.3	0.6628
44	2	13	45	3719018.6	0.7187	4496437.9	0.6843	5171021.6	0.6629
45	2	14	44	3725732.0	0.7187	4503151.3	0.6844	5177735.0	0.6630
46	2	15	43	3732445.4	0.7187	4509864.7	0.6844	5184448.4	0.6630
47	2	16	42	3739158.8	0.7187	4516578.1	0.6845	5191161.8	0.6631
48	2	17	41	3745872.1	0.7187	4523291.4	0.6845	5197875.2	0.6632
49	2	18	40	3752585.5	0.7187	4530004.8	0.6846	5204588.6	0.6632
50	2	19	39	3759298.9	0.7187	4536718.2	0.6846	5211301.9	0.6633
51	2	20	38	3766012.3	0.7187	4543431.6	0.6847	5218015.3	0.6634

（続き）

52	3	2	55	3667033.3	0.7188	4444452.6	0.6840	5119036.3	0.6624
53	3	3	54	3673746.7	0.7188	4451166.0	0.6841	5125749.7	0.6625
54	3	4	53	3680460.1	0.7188	4457879.4	0.6841	5132463.1	0.6625
55	3	5	52	3687173.4	0.7188	4464592.7	0.6842	5139176.5	0.6626
56	3	6	51	3693886.8	0.7188	4471306.1	0.6842	5145889.9	0.6627
57	3	7	50	3700600.2	0.7188	4478019.5	0.6843	5152603.3	0.6628
58	3	8	49	3707313.6	0.7188	4484732.9	0.6843	5159316.6	0.6628
59	3	9	48	3714027.0	0.7188	4491446.3	0.6844	5166030.0	0.6629
60	3	10	47	3720740.4	0.7188	4498159.7	0.6844	5172743.4	0.6630
61	3	11	46	3727453.7	0.7188	4504873.0	0.6845	5179456.8	0.6631
62	3	12	45	3734167.1	0.7188	4511586.4	0.6845	5186170.2	0.6631
63	3	13	44	3740880.5	0.7188	4518299.8	0.6846	5192883.6	0.6632
64	3	14	43	3747593.9	0.7188	4525013.2	0.6846	5199596.9	0.6633
65	3	15	42	3754307.3	0.7188	4531726.6	0.6847	5206310.3	0.6633
66	3	16	41	3761020.7	0.7188	4538440.0	0.6847	5213023.7	0.6634
67	3	17	40	3767734.0	0.7188	4545153.3	0.6848	5219737.1	0.6635
68	3	18	39	3774447.4	0.7188	4551866.7	0.6848	5226450.5	0.6636
69	3	19	38	3781160.8	0.7188	4558580.1	0.6849	5233163.9	0.6636
70	3	20	37	3787874.2	0.7188	4565293.5	0.6849	5239877.2	0.6637
71	4	2	54	3688895.2	0.7188	4466314.5	0.6842	5140898.2	0.6626
72	4	3	53	3695608.6	0.7188	4473027.9	0.6842	5147611.6	0.6627
73	4	4	52	3702322.0	0.7188	4479741.3	0.6843	5154325.0	0.6628
74	4	5	51	3709035.4	0.7188	4486454.7	0.6843	5161038.4	0.6629
75	4	6	50	3715748.7	0.7188	4493168.0	0.6844	5167751.8	0.6629
76	4	7	49	3722462.1	0.7188	4499881.4	0.6844	5174465.2	0.6630
77	4	8	48	3729175.5	0.7188	4506594.8	0.6845	5181178.5	0.6631
78	4	9	47	3735888.9	0.7188	4513308.2	0.6845	5187891.9	0.6631
79	4	10	46	3742602.3	0.7188	4520021.6	0.6846	5194605.3	0.6632
80	4	11	45	3749315.7	0.7188	4526735.0	0.6846	5201318.7	0.6633
81	4	12	44	3756029.0	0.7188	4533448.3	0.6847	5208032.1	0.6634
82	4	13	43	3762742.4	0.7188	4540161.7	0.6847	5214745.5	0.6634
83	4	14	42	3769455.8	0.7188	4546875.1	0.6848	5221458.8	0.6635
84	4	15	41	3776169.2	0.7188	4553588.5	0.6848	5228172.2	0.6636
85	4	16	40	3782882.6	0.7188	4560301.9	0.6849	5234885.6	0.6636
86	4	17	39	3789596.0	0.7188	4567015.3	0.6849	5241599.0	0.6637
87	4	18	38	3796309.3	0.7188	4573728.6	0.6850	5248312.4	0.6638
88	4	19	37	3803022.7	0.7188	4580442.0	0.6850	5255025.8	0.6639
89	4	20	36	3809736.1	0.7188	4587155.4	0.6851	5261739.1	0.6639
90	5	2	53	3710757.1	0.7188	4488176.4	0.6843	5162760.2	0.6629
91	5	3	52	3717470.5	0.7188	4494889.8	0.6844	5169473.5	0.6629
92	5	4	51	3724183.9	0.7188	4501603.2	0.6844	5176186.9	0.6630
93	5	5	50	3730897.3	0.7188	4508316.6	0.6845	5182900.3	0.6631
94	5	6	49	3737610.7	0.7188	4515030.0	0.6845	5189613.7	0.6632
95	5	7	48	3744324.0	0.7188	4521743.3	0.6846	5196327.1	0.6632
96	5	8	47	3751037.4	0.7188	4528456.7	0.6847	5203040.5	0.6633
97	5	9	46	3757750.8	0.7188	4535170.1	0.6847	5209753.8	0.6634
98	5	10	45	3764464.2	0.7188	4541883.5	0.6848	5216467.2	0.6634
99	5	11	44	3771177.6	0.7188	4548596.9	0.6848	5223180.6	0.6635
100	5	12	43	3777891.0	0.7188	4555310.3	0.6849	5229894.0	0.6636
101	5	13	42	3784604.3	0.7188	4562023.6	0.6849	5236607.4	0.6637
102	5	14	41	3791317.7	0.7188	4568737.0	0.6850	5243320.8	0.6637
103	5	15	40	3798031.1	0.7188	4575450.4	0.6850	5250034.1	0.6638
104	5	16	39	3804744.5	0.7188	4582163.8	0.6851	5256747.5	0.6639
105	5	17	38	3811457.9	0.7188	4588877.2	0.6851	5263460.9	0.6639
106	5	18	37	3818171.3	0.7188	4595590.6	0.6851	5270174.3	0.6640
107	5	19	36	3824884.6	0.7188	4602303.9	0.6852	5276887.7	0.6641
108	5	20	35	3831598.0	0.7188	4609017.3	0.6852	5283601.1	0.6641

（続き）

109	6	2	52	3732619.0	0.7189	4510038.3	0.6846	5184622.1	0.6632
110	6	3	51	3739332.4	0.7189	4516751.7	0.6846	5191335.5	0.6633
111	6	4	50	3746045.8	0.7189	4523465.1	0.6847	5198048.8	0.6633
112	6	5	49	3752759.2	0.7189	4530178.5	0.6847	5204762.2	0.6634
113	6	6	48	3759472.6	0.7189	4536891.9	0.6848	5211475.6	0.6635
114	6	7	47	3766185.9	0.7189	4543605.2	0.6848	5218189.0	0.6635
115	6	8	46	3772899.3	0.7189	4550318.6	0.6849	5224902.4	0.6636
116	6	9	45	3779612.7	0.7189	4557032.0	0.6849	5231615.8	0.6637
117	6	10	44	3786326.1	0.7189	4563745.4	0.6850	5238329.1	0.6637
118	6	11	43	3793039.5	0.7189	4570458.8	0.6850	5245042.5	0.6638
119	6	12	42	3799752.9	0.7189	4577172.2	0.6851	5251755.9	0.6639
120	6	13	41	3806466.2	0.7189	4583885.5	0.6851	5258469.3	0.6640
121	6	14	40	3813179.6	0.7189	4590598.9	0.6852	5265182.7	0.6640
122	6	15	39	3819893.0	0.7189	4597312.3	0.6852	5271896.1	0.6641
123	6	16	38	3826606.4	0.7188	4604025.7	0.6852	5278609.4	0.6641
124	6	17	37	3833319.8	0.7188	4610739.1	0.6853	5285322.8	0.6642
125	6	18	36	3840033.2	0.7188	4617452.5	0.6853	5292036.2	0.6642
126	6	19	35	3846746.5	0.7188	4624165.8	0.6854	5298749.6	0.6643
127	7	2	51	3754480.9	0.7189	4531900.2	0.6848	5206484.0	0.6634
128	7	3	50	3761194.3	0.7189	4538613.6	0.6848	5213197.4	0.6635
129	7	4	49	3767907.7	0.7189	4545327.0	0.6849	5219910.7	0.6636
130	7	5	48	3774621.1	0.7189	4552040.4	0.6849	5226624.1	0.6636
131	7	6	47	3781334.5	0.7189	4558753.8	0.6850	5233337.5	0.6637
132	7	7	46	3788047.9	0.7189	4565467.2	0.6850	5240050.9	0.6638
133	7	8	45	3794761.2	0.7189	4572180.5	0.6851	5246764.3	0.6638
134	7	9	44	3801474.6	0.7189	4578893.9	0.6851	5253477.7	0.6639
135	7	10	43	3808188.0	0.7189	4585607.3	0.6852	5260191.0	0.6640
136	7	11	42	3814901.4	0.7189	4592320.7	0.6852	5266904.4	0.6640
137	7	12	41	3821614.8	0.7189	4599034.1	0.6853	5273617.8	0.6641
138	7	13	40	3828328.2	0.7189	4605747.5	0.6853	5280331.2	0.6642
139	7	14	39	3835041.5	0.7189	4612460.8	0.6854	5287044.6	0.6643
140	7	15	38	3841754.9	0.7189	4619174.2	0.6854	5293758.0	0.6643
141	7	16	37	3848468.3	0.7189	4625887.6	0.6855	5300471.3	0.6644
142	7	17	36	3855181.7	0.7189	4632601.0	0.6855	5307184.7	0.6645
143	7	18	35	3861895.1	0.7189	4639314.4	0.6855	5313898.1	0.6645
144	8	2	50	3776342.8	0.7189	4553762.1	0.6849	5228345.9	0.6636
145	8	3	49	3783056.2	0.7189	4560475.5	0.6850	5235059.3	0.6637
146	8	4	48	3789769.6	0.7189	4567188.9	0.6850	5241772.7	0.6638
147	8	5	47	3796483.0	0.7189	4573902.3	0.6851	5248486.0	0.6639
148	8	6	46	3803196.4	0.7189	4580615.7	0.6851	5255199.4	0.6639
149	8	7	45	3809909.8	0.7189	4587329.1	0.6852	5261912.8	0.6640
150	8	8	44	3816623.1	0.7189	4594042.4	0.6852	5268626.2	0.6641
151	8	9	43	3823336.5	0.7189	4600755.8	0.6853	5275339.6	0.6641
152	8	10	42	3830049.9	0.7189	4607469.2	0.6853	5282053.0	0.6642
153	8	11	41	3836763.3	0.7189	4614182.6	0.6854	5288766.3	0.6643
154	8	12	40	3843476.7	0.7189	4620896.0	0.6854	5295479.7	0.6643
155	8	13	39	3850190.1	0.7189	4627609.4	0.6855	5302193.1	0.6644
156	8	14	38	3856903.4	0.7189	4634322.7	0.6855	5308906.5	0.6645
157	8	15	37	3863616.8	0.7189	4641036.1	0.6856	5315619.9	0.6646
158	8	16	36	3870330.2	0.7189	4647749.5	0.6856	5322333.3	0.6646
159	8	17	35	3877043.6	0.7189	4654462.9	0.6857	5329046.6	0.6647

（続き）

160	9	2	49	3798204.8	0.7190	4575624.1	0.6852	5250207.8	0.6639
161	9	3	48	3804918.1	0.7190	4582337.4	0.6852	5256921.2	0.6640
162	9	4	47	3811631.5	0.7190	4589050.8	0.6853	5263634.6	0.6641
163	9	5	46	3818344.9	0.7189	4595764.2	0.6852	5270347.9	0.6641
164	9	6	45	3825058.3	0.7189	4602477.6	0.6853	5277061.3	0.6642
165	9	7	44	3831771.7	0.7189	4609191.0	0.6853	5283774.7	0.6642
166	9	8	43	3838485.1	0.7189	4615904.4	0.6854	5290488.1	0.6643
167	9	9	42	3845198.4	0.7189	4622617.7	0.6854	5297201.5	0.6644
168	9	10	41	3851911.8	0.7189	4629331.1	0.6855	5303914.9	0.6644
169	9	11	40	3858625.2	0.7189	4636044.5	0.6855	5310628.2	0.6645
170	9	12	39	3865338.6	0.7189	4642757.9	0.6856	5317341.6	0.6646
171	9	13	38	3872052.0	0.7189	4649471.3	0.6856	5324055.0	0.6646
172	9	14	37	3878765.4	0.7189	4656184.7	0.6857	5330768.4	0.6647
173	9	15	36	3885478.7	0.7189	4662898.0	0.6857	5337481.8	0.6648
174	9	16	35	3892192.1	0.7189	4669611.4	0.6858	5344195.2	0.6648
175	10	2	48	3820066.7	0.7190	4597486.0	0.6853	5272069.7	0.6642
176	10	3	47	3826780.1	0.7190	4604199.4	0.6854	5278783.1	0.6642
177	10	4	46	3833493.4	0.7190	4610912.7	0.6854	5285496.5	0.6643
178	10	5	45	3840206.8	0.7190	4617626.1	0.6855	5292209.9	0.6644
179	10	6	44	3846920.2	0.7190	4624339.5	0.6855	5298923.2	0.6645
180	10	7	43	3853633.6	0.7190	4631052.9	0.6856	5305636.6	0.6645
181	10	8	42	3860347.0	0.7190	4637766.3	0.6856	5312350.0	0.6646
182	10	9	41	3867060.4	0.7190	4644479.7	0.6857	5319063.4	0.6647
183	10	10	40	3873773.7	0.7190	4651193.0	0.6857	5325776.8	0.6647
184	10	11	39	3880487.1	0.7190	4657906.4	0.6858	5332490.2	0.6648
185	10	12	38	3887200.5	0.7190	4664619.8	0.6858	5339203.5	0.6649
186	10	13	37	3893913.9	0.7190	4671333.2	0.6859	5345916.9	0.6649
187	10	14	36	3900627.3	0.7190	4678046.6	0.6859	5352630.3	0.6650
188	10	15	35	3907340.7	0.7190	4684760.0	0.6860	5359343.7	0.6651

引用文献

研究業績

本博士論文に関わる原著論文

1. **Hirohata K**, Yamaguchi Y, Maruno T, Shibuya R, Torisu T, Onishi T, Chono H, Mineno J, Yuzhe Y, Higashiyama K, Masumi-Koizumi K, Uchida K, Yamamoto T, Uchida E, Okada T, Uchiyama S. Applications and Limitations of Equilibrium Density Gradient Analytical Ultracentrifugation for the Quantitative Characterization of Adeno-Associated Virus Vectors. *Anal Chem.*, 2024 Jan;96(2):642-651.
2. **Hirohata K**, Kino S, Yamane T, Bandoh K, Bamba T, Sternisha SM, Torisu T, Fukuhara M, Yamaguchi Y, Uchiyama S. Use of cesium chloride density gradient ultracentrifugation for the purification and characterization of recombinant adeno-associated virus. *Eur Biophys J.*, 2025 Aug;54(6):415-425.

その他学術発表論文

1. Nishiumi H, **Hirohata K**, Fukuhara M, Matsushita A, Tsunaka Y, Rocafort MAV, Maruno T, Torisu T, Uchiyama S. Combined 100 keV Cryo-Electron Microscopy and Image Analysis Methods to Characterize the Wider Adeno-Associated Viral Products. *J Pharm Sci.*, 2024 Jul;113(7):1804-1815.
2. Soth S, Takakura M, Suekawa M, Onishi T, **Hirohata K**, Hashimoto T, Maruno T, Fukuhara M, Tsunaka Y, Torisu T, Uchiyama S. Quantification of full and empty particles of adeno-associated virus vectors via a novel dual fluorescence-linked immunosorbent assay. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2024 Sep;32(3):101291.
3. Nakatsuka R, Yamaguchi Y, **Hirohata K**, Shimojo S, Murakami M, Rocafort MAV, Tsunaka Y, Fukuhara M, Torisu T, Uchiyama S. Multimass Analysis of Adeno-Associated Virus Vectors by Orbitrap-Based Charge Detection Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 2024 Oct;96(42): 17037-17046.
4. Yamaguchi Y, Shimojo S, Ikeda T, Fukuhara M, Tsunaka Y, Shibuya R, Rocafort MAV, Nakatsuka R, **Hirohata K**, Torisu T, Uchiyama S. Unfolding of viral protein 1 N-

termini facilitates genome ejection from recombinant adeno-associated virus serotype 8. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2025 Jun;33(2):101480.
5. Maruno T, Fukuhara M, Tsunaka Y, Matsushita A, **Hirohata K**, Bandoh K, Onaka M, Shibuya R, Yamaguchi Y, Nishiumi H, Nagashima Y, Higo D, Kuwahara T, Ueno T, Maeda M, Kanai-Bai G, Yamano-Adachi N, Torisu T, Omasa T, Uchiyama S. Variation of VP2 stoichiometry and deamidation of VP1 during production and their impacts on the transduction efficiency of AAV vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2025 Dec;33(4):101581.

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、鳥巣哲生 准教授、山口祐希 助教、株式会社ユー・メディコ 丸野孝浩 氏に謹んで感謝いたします。

本博士学位論文の作成にあたり、有用なご助言を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 福﨑英一郎 教授、ならびに大政健史 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の AAV ベクター製造にお力添え頂きました津中康央 特任准教授、渋谷理紗 特任助教、および株式会社ユー・メディコ 福原充子 氏、松下青葉 氏に厚く御礼申し上げます。

さらに，日頃より研究だけでなく研究室生活全般にわたり，暖かいご援助をいただきました、山根拓也 特任准教授，板東香林 特任研究員，Soth Serairath 特任研究員，西海遥夏 特別研究員，露峰明子 秘書に感謝申し上げます。

また本博士論文で使用した AAV サンプルを提供して頂いた、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の皆様に深く感謝致します。その他，本論文に関与しない研究も含めて，共同研究等でお世話になりました大学，民間企業，研究機関の皆様に感謝致します。

そして、研究活動のみならず研究室生活において大変お世話になりました、同研究室の水口潤哉 博士、Wang Zekun 修士、中塚遼治 修士、Ekaputra Ramadhani 修士、Yang Zhuolun 修士、池田智彦 修士、岡田梨櫻 修士、Liu Yannan 学士、牧平遥香 学士、ま

た、研究室の学生の皆様，既に卒業された先輩ならびに後輩の皆様，研究員の方々に心より感謝致します。

尚、本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業 JPMJFS2125 の支援を受けたものです。

最後に、博士後期課程へ進学するにあたり、理解を示し、いつも支えてくれた両親、家族、親戚一同、そして、あたたかく見守ってくれた友人たちに深い感謝の意を表して謝辞と致します。

1. Liu F, Li R, Zhu Z, et al. Current developments of gene therapy in human diseases. MedComm (2020) 2024;5(9):e645, doi:10.1002/mco2.645
2. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. Nature 2015;526(7573):351-60, doi:10.1038/nature15818
3. Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. Science 2018;359(6372), doi:10.1126/science.aan4672
4. Bulaklak K, Gersbach CA. The once and future gene therapy. Nat Commun 2020;11(1):5820, doi:10.1038/s41467-020-19505-2
5. Ginn SL, Mandwie M, Alexander IE, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2023-an update. J Gene Med 2024;26(8):e3721, doi:10.1002/jgm.3721
6. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov 2019;18(5):358-378, doi:10.1038/s41573-019-0012-9
7. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Signal Transduct Target Ther 2021;6(1):53, doi:10.1038/s41392-021-00487-6
8. Cetin B, Erendor F, Eksi YE, et al. Gene and cell therapy of human genetic diseases: Recent advances and future directions. J Cell Mol Med 2024;28(17):e70056, doi:10.1111/jcmm.70056
9. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. Nat Rev Genet 2014;15(8):541-55, doi:10.1038/nrg3763
10. Zhao Z, Anselmo AC, Mitragotri S. Viral vector-based gene therapies in the clinic. Bioeng Transl Med 2022;7(1):e10258, doi:10.1002/btm2.10258
11. ATCHISON RW, CASTO BC, HAMMON WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. Science 1965;149(3685):754-6, doi:10.1126/science.149.3685.754

12. Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A 1966;55(6):1467-74, doi:10.1073/pnas.55.6.1467
13. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. J Gen Virol 2019;100(3):367-368, doi:10.1099/jgv.0.001212
14. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu Rev Virol 2014;1(1):427-51, doi:10.1146/annurev-virology-031413-085355
15. Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, et al. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. Am J Epidemiol 1968;88(3):368-78, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120897
16. Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. J Natl Cancer Inst 1968;40(2):319-27
17. Rasko J, Bashirians G, Petropoulos C, et al. Global Seroprevalence of Neutralizing Antibodies Against Adeno-Associated Virus (AAV) Serotypes of Relevance to Gene Therapy. Blood 2022;140(10668-10670, doi:10.1182/blood-2022-158305
18. Chhabra A, Bashirians G, Petropoulos CJ, et al. Global seroprevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus serotypes used for human gene therapies. Mol Ther Methods Clin Dev 2024;32(3):101273, doi:10.1016/j.omtm.2024.101273
19. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, et al. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. J Med Virol 2014;86(11):1990-7, doi:10.1002/jmv.23818
20. Kashiwakura Y, Baatartsogt N, Yamazaki S, et al. The seroprevalence of neutralizing antibodies against the adeno-associated virus capsids in Japanese hemophiliacs. Mol Ther Methods Clin Dev 2022;27(404-414, doi:10.1016/j.omtm.2022.10.014
21. Berns KI, Muzyczka N. AAV: An Overview of Unanswered Questions. Hum Gene Ther 2017;28(4):308-313, doi:10.1089/hum.2017.048
22. Samulski RJ, Berns KI, Tan M, et al. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79(6):2077-81, doi:10.1073/pnas.79.6.2077
23. Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. J Virol 1983;45(2):555-64, doi:10.1128/JVI.45.2.555-564.1983
24. Mayor HD, Torikai K, Melnick JL, et al. Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions. Science 1969;166(3910):1280-2, doi:10.1126/science.166.3910.1280
25. Rose JA, Berns KI, Hoggan MD, et al. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. Proc Natl

Acad Sci U S A 1969;64(3):863-9, doi:10.1073/pnas.64.3.863
26. Berns KI, Rose JA. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. J Virol 1970;5(6):693-9, doi:10.1128/JVI.5.6.693-699.1970
27. Koczot FJ, Carter BJ, Garon CF, et al. Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1973;70(1):215-9, doi:10.1073/pnas.70.1.215
28. Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. J Virol 1980;34(2):402-9, doi:10.1128/JVI.34.2.402-409.1980
29. Wilmott P, Lisowski L, Alexander IE, et al. A User's Guide to the Inverted Terminal Repeats of Adeno-Associated Virus. Hum Gene Ther Methods 2019;30(6):206-213, doi:10.1089/hgtb.2019.276
30. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-associated virus biology. Methods Mol Biol 2011;807(1-23, doi:10.1007/978-1-61779-370-7_1
31. Rose JA, Maizel JV, Inman JK, et al. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J Virol 1971;8(5):766-70, doi:10.1128/JVI.8.5.766-770.1971
32. Johnson FB, Ozer HL, Hoggan MD. Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. J Virol 1971;8(6):860-63, doi:10.1128/JVI.8.6.860-863.1971
33. Buller RM, Rose JA. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. J Virol 1978;25(1):331-8, doi:10.1128/JVI.25.1.331-338.1978
34. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(22):10220-5, doi:10.1073/pnas.1001673107
35. Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, et al. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science 2019;366(6469):1139-1143, doi:10.1126/science.aaw2900
36. Sonntag F, Köther K, Schmidt K, et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. J Virol 2011;85(23):12686-97, doi:10.1128/JVI.05359-11
37. Elmore ZC, Patrick Havlik L, Oh DK, et al. The membrane associated accessory protein is an adeno-associated viral egress factor. Nat Commun 2021;12(1):6239, doi:10.1038/s41467-021-26485-4
38. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87(6):2211-5, doi:10.1073/pnas.87.6.2211
39. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. EMBO J 1991;10(12):3941-50, doi:10.1002/j.1460-

2075.1991.tb04964.x
40. Kotin RM, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. EMBO J 1992;11(13):5071-8, doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05614.x
41. Ryan JH, Zolotukhin S, Muzyczka N. Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. J Virol 1996;70(3):1542-53, doi:10.1128/JVI.70.3.1542-1553.1996
42. Brister JR, Muzyczka N. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. J Virol 2000;74(17):7762-71, doi:10.1128/jvi.74.17.7762-7771.2000
43. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. Signal Transduct Target Ther 2024;9(1):78, doi:10.1038/s41392-024-01780-w
44. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 2004;78(12):6381-8, doi:10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004
45. Mietzsch M, Jose A, Chipman P, et al. Completion of the AAV Structural Atlas: Serotype Capsid Structures Reveals Clade-Specific Features. Viruses 2021;13(1), doi:10.3390/v13010101
46. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. Methods Enzymol 2012;507(229-54, doi:10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0
47. Suarez-Amaran L, Song L, Tretiakova AP, et al. AAV vector development, back to the future. Mol Ther 2025;33(5):1903-1936, doi:10.1016/j.ymthe.2025.03.064
48. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 2020;21(4):255-272, doi:10.1038/s41576-019-0205-4
49. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol 2016;34(2):204-9, doi:10.1038/nbt.3440
50. Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci 2017;20(8):1172-1179, doi:10.1038/nn.4593
51. Grimm D, Lee JS, Wang L, et al. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. J Virol 2008;82(12):5887-911, doi:10.1128/JVI.00254-08
52. Tervo DG, Hwang BY, Viswanathan S, et al. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. Neuron 2016;92(2):372-382, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.021

53. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, et al. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med 2013;5(189):189ra76, doi:10.1126/scitranslmed.3005708

54. Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. Cell 2021;184(19):4919-4938.e22, doi:10.1016/j.cell.2021.08.028

55. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. Gene Ther 2001;8(16):1248-54, doi:10.1038/sj.gt.3301514

56. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. Mol Ther 2008;16(10):1648-56, doi:10.1038/mt.2008.171

57. Clément N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. Mol Ther Methods Clin Dev 2016;3(16002, doi:10.1038/mtm.2016.2

58. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. Hum Gene Ther 2002;13(16):1935-43, doi:10.1089/10430340260355347

59. Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. Mol Ther 2009;17(11):1888-96, doi:10.1038/mt.2009.128

60. Mietzsch M, Grasse S, Zurawski C, et al. OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. Hum Gene Ther 2014;25(3):212-22, doi:10.1089/hum.2013.184

61. Aslanidi G, Lamb K, Zolotukhin S. An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(13):5059-64, doi:10.1073/pnas.0810614106

62. Sha S, Maloney AJ, Katsikis G, et al. Cellular pathways of recombinant adeno-associated virus production for gene therapy. Biotechnol Adv 2021;49(107764, doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107764

63. Wang Y, Fu Q, Park SY, et al. Decoding cellular mechanism of recombinant adeno-associated virus (rAAV) and engineering host-cell factories toward intensified viral vector manufacturing. Biotechnol Adv 2024;71(108322, doi:10.1016/j.biotechadv.2024.108322

64. Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, et al. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. J Virol 1996;70(1):520-32, doi:10.1128/JVI.70.1.520-532.1996

65. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J Virol 1998;72(3):2224-32, doi:10.1128/JVI.72.3.2224-2232.1998

66. Matsushita T, Elliger S, Elliger C, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. Gene Ther 1998;5(7):938-45, doi:10.1038/sj.gt.3300680
67. Maurer AC, Weitzman MD. Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. Hum Gene Ther 2020;31(9-10):499-511, doi:10.1089/hum.2020.069
68. Mietzsch M, Eddington C, Jose A, et al. Improved Genome Packaging Efficiency of Adeno-associated Virus Vectors Using Rep Hybrids. J Virol 2021;95(19):e0077321, doi:10.1128/JVI.00773-21
69. Duan D, Sharma P, Yang J, et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. J Virol 1998;72(11):8568-77, doi:10.1128/JVI.72.11.8568-8577.1998
70. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. Annu Rev Genet 2004;38(819-45, doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143717
71. Lorek JK, Isaksson M, Nilsson B. Chromatography in Downstream Processing of Recombinant Adeno-Associated Viruses: A Review of Current and Future Practises. Biotechnol Bioeng 2025, doi:10.1002/bit.28932
72. Gao K, Li M, Zhong L, et al. Empty Virions In AAV8 Vector Preparations Reduce Transduction Efficiency And May Cause Total Viral Particle Dose-Limiting Side-Effects. Mol Ther Methods Clin Dev 2014;1(9):20139, doi:10.1038/mtm.2013.9
73. Wright JF. Product-Related Impurities in Clinical-Grade Recombinant AAV Vectors: Characterization and Risk Assessment. Biomedicines 2014;2(1):80-97, doi:10.3390/biomedicines2010080
74. Vandenberghe LH, Xiao R, Lock M, et al. Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing. Hum Gene Ther 2010;21(10):1251-7, doi:10.1089/hum.2010.107
75. Grimm D, Pandey K, Kay MA. Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA expression. Methods Enzymol 2005;392(381-405, doi:10.1016/S0076-6879(04)92023-X
76. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Ther 1999;6(6):973-85, doi:10.1038/sj.gt.3300938
77. Wörner TP, Bennett A, Habka S, et al. Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic. Nat Commun 2021;12(1):1642, doi:10.1038/s41467-021-21935-5
78. Strobel B, Miller FD, Rist W, et al. Comparative Analysis of Cesium Chloride- and

Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications. Hum Gene Ther Methods 2015;26(4):147-57, doi:10.1089/hgtb.2015.051
79. Tomono T, Hirai Y, Okada H, et al. Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. Mol Ther Methods Clin Dev 2018;11(180-190, doi:10.1016/j.omtm.2018.10.015
80. Florea M, Nicolaou F, Pacouret S, et al. High-efficiency purification of divergent AAV serotypes using AAVX affinity chromatography. Mol Ther Methods Clin Dev 2023;28(146-159, doi:10.1016/j.omtm.2022.12.009
81. Mietzsch M, Kamat M, Basso K, et al. Structural characterization and epitope mapping of the AAVX affinity purification ligand. Mol Ther Methods Clin Dev 2024;32(4):101377, doi:10.1016/j.omtm.2024.101377
82. Byrne BJ, Flanigan KM, Matesanz SE, et al. Current clinical applications of AAV-mediated gene therapy. Mol Ther 2025;33(6):2479-2516, doi:10.1016/j.ymthe.2025.04.045
83. Zhao Q, Peng H, Ma Y, et al. In vivo applications and toxicities of AAV-based gene therapies in rare diseases. Orphanet J Rare Dis 2025;20(1):368, doi:10.1186/s13023-025-03893-z
84. Au HKE, Isalan M, Mielcarek M. Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. Front Med (Lausanne) 2021;8(809118, doi:10.3389/fmed.2021.809118
85. Tustian AD, Bak H. Assessment of quality attributes for adeno-associated viral vectors. Biotechnol Bioeng 2021;118(11):4186-4203, doi:10.1002/bit.27905
86. Pierson EE, Keifer DZ, Asokan A, et al. Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity With Charge Detection Mass Spectrometry. Anal Chem 2016;88(13):6718-25, doi:10.1021/acs.analchem.6b00883
87. Maruno T, Usami K, Ishii K, et al. Comprehensive Size Distribution and Composition Analysis of Adeno-Associated Virus Vector by Multiwavelength Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. J Pharm Sci 2021;110(10):3375-3384, doi:10.1016/j.xphs.2021.06.031
88. Barnes LF, Draper BE, Chen YT, et al. Quantitative analysis of genome packaging in recombinant AAV vectors by charge detection mass spectrometry. Mol Ther Methods Clin Dev 2021;23(87-97, doi:10.1016/j.omtm.2021.08.002
89. Ertl HCJ. Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. Front Immunol 2022;13(975803, doi:10.3389/fimmu.2022.975803
90. High-dose AAV gene therapy deaths. Nat Biotechnol 2020;38(8):910, doi:10.1038/s41587-020-0642-9
91. Kishimoto TK, Samulski RJ. Addressing high dose AAV toxicity - 'one and done' or

'slower and lower'? Expert Opin Biol Ther 2022;22(9):1067-1071, doi:10.1080/14712598.2022.2060737
92. Meselson M, Stahl FW, Vinograd J. EQUILIBRIUM SEDIMENTATION OF MACROMOLECULES IN DENSITY GRADIENTS. Proc Natl Acad Sci U S A 1957;43(7):581-8, doi:10.1073/pnas.43.7.581
93. Toolan HW. The picodna viruses. H, RV, and AAV. Int Rev Exp Pathol 1968;6(135-80
94. Torikai K, Ito M, Jordan LE, et al. Properties of light particles produced during growth of Type 4 adeno-associated satellite virus. J Virol 1970;6(3):363-9, doi:10.1128/JVI.6.3.363-369.1970
95. de la Maza LM, Carter BJ. Heavy and light particles of adeno-associated virus. J Virol 1980;33(3):1129-37, doi:10.1128/JVI.33.3.1129-1137.1980
96. de la Maza LM, Carter BJ. Molecular structure of adeno-associated virus variant DNA. J Biol Chem 1980;255(7):3194-203
97. Lipps BV, Mayor HD. Characterization of heavy particles of adeno-associated virus type 1. J Gen Virol 1982;58 Pt 1(63-72, doi:10.1099/0022-1317-58-1-63
98. Wang Q, Firrman J, Wu Z, et al. High-Density Recombinant Adeno-Associated Viral Particles are Competent Vectors for In Vivo Transduction. Hum Gene Ther 2016;27(12):971-981, doi:10.1089/hum.2016.055
99. Bosma B, du Plessis F, Ehlert E, et al. Optimization of viral protein ratios for production of rAAV serotype 5 in the baculovirus system. Gene Ther 2018;25(6):415-424, doi:10.1038/s41434-018-0034-7
100. Oyama H, Ishii K, Maruno T, et al. Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins with Two Types of VP3-Related Components by Capillary Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. Hum Gene Ther 2021;32(21-22):1403-1416, doi:10.1089/hum.2021.009
101. Snijder J, van de Waterbeemd M, Damoc E, et al. Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by Orbitrap mass spectrometry. J Am Chem Soc 2014;136(20):7295-9, doi:10.1021/ja502616y
102. Meselson M, Stahl FW. THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI. Proc Natl Acad Sci U S A 1958;44(7):671-82, doi:10.1073/pnas.44.7.671
103. Berkowitz SA, Philo JS. Monitoring the homogeneity of adenovirus preparations (a gene therapy delivery system) using analytical ultracentrifugation. Anal Biochem 2007;362(1):16-37, doi:10.1016/j.ab.2006.11.031
104. Yang X, Agarwala S, Ravindran S, et al. Determination of particle heterogeneity and stability of recombinant adenovirus by analytical ultracentrifugation in CsCl gradients. J Pharm Sci 2008;97(2):746-63, doi:10.1002/jps.21008
105. Sternisha SM, Wilson AD, Bouda E, et al. Optimizing high-throughput viral vector

characterization with density gradient equilibrium analytical ultracentrifugation. Eur Biophys J 2023, doi:10.1007/s00249-023-01654-z

106. Maruno T, Ishii K, Torisu T, et al. 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 2023;112(4):937-946, doi:10.1016/j.xphs.2022.10.023

107. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, et al. Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: influence of colloidal and conformational stabilities. Pharm Res 2013;30(5):1263-80, doi:10.1007/s11095-012-0965-4

108. Burnham B, Nass S, Kong E, et al. Analytical Ultracentrifugation as an Approach to Characterize Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. Hum Gene Ther Methods 2015;26(6):228-42, doi:10.1089/hgtb.2015.048

109. Kobayashi D, Kakinouchi K, Nagae T, et al. Cesium reversibly suppresses HeLa cell proliferation by inhibiting cellular metabolism. FEBS Lett 2017;591(5):718-727, doi:10.1002/1873-3468.12579

110. Onishi T, Nonaka M, Maruno T, et al. Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly. Mol Ther Methods Clin Dev 2023;31(101142, doi:10.1016/j.omtm.2023.101142

111. Park A, Lee JY. Adenoviral Vector System: A Comprehensive Overview of Constructions, Therapeutic Applications and Host Responses. J Microbiol 2024;62(7):491-509, doi:10.1007/s12275-024-00159-4

112. Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. Hum Gene Ther 1996;7(17):2101-12, doi:10.1089/hum.1996.7.17-2101

113. Hermonat PL, Quirk JG, Bishop BM, et al. The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. FEBS Lett 1997;407(1):78-84, doi:10.1016/s0014-5793(97)00311-6

114. Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. Mol Ther 2010;18(1):80-6, doi:10.1038/mt.2009.255

115. Yang GS, Schmidt M, Yan Z, et al. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. J Virol 2002;76(15):7651-60, doi:10.1128/jvi.76.15.7651-7660.2002

116. Horowitz ED, Rahman KS, Bower BD, et al. Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. J Virol 2013;87(6):2994-3002, doi:10.1128/JVI.03017-12

117. Barnes LF, Draper BE, Jarrold MF. Analysis of thermally driven structural changes, genome release, disassembly, and aggregation of recombinant AAV by CDMS. Mol Ther Methods

Clin Dev 2022;27(327-336, doi:10.1016/j.omtm.2022.10.008
118. Li X, Miller LM, Chrzanowski M, et al. Quantitative analysis of preferential utilization of AAV ITR as the packaging terminal signal. Front Bioeng Biotechnol 2023;11(1327433, doi:10.3389/fbioe.2023.1327433
119. Ibreljic N, Draper BE, Lawton CW. Recombinant AAV genome size effect on viral vector production, purification, and thermostability. Mol Ther Methods Clin Dev 2024;32(1):101188, doi:10.1016/j.omtm.2024.101188
120. Kosaka M, Sajiki AF, Fujita K, et al. Evaluation of the loading capacity and patterns of packaged DNA in AAV genomes of different sizes using long-read sequencing. Mol Ther Methods Clin Dev 2025;33(2):101474, doi:10.1016/j.omtm.2025.101474
121. Blahetek G, Lindner B, Oti M, et al. AAV yield, bioactivity, and particle heterogeneity are impacted by genome size and non-coding DNA elements. Mol Ther Methods Clin Dev 2025;33(3):101499, doi:10.1016/j.omtm.2025.101499
122. Yamaguchi Y, Shimojo S, Shibuya R, et al. Direct Identification and Quantification of Recombinant Adeno-Associated Virus in Crude Cell Lysate and Conditioned Medium by Mass Photometry. Anal Chem 2025;97(19):10405-10416, doi:10.1021/acs.analchem.5c00793
123. Bennett A, Mietzsch M, Agbandje-McKenna M. Understanding capsid assembly and genome packaging for adeno-associated viruses. Future Virol 2017;12(6):283-297, doi:10.2217/fvl-2017-0011
124. Powell SK, Samulski RJ, McCown TJ. AAV Capsid-Promoter Interactions Determine CNS Cell-Selective Gene Expression In Vivo. Mol Ther 2020;28(5):1373-1380, doi:10.1016/j.ymthe.2020.03.007
125. Bohlen MO, McCown TJ, Powell SK, et al. Adeno-Associated Virus Capsid-Promoter Interactions in the Brain Translate from Rat to the Nonhuman Primate. Hum Gene Ther 2020;31(21-22):1155-1168, doi:10.1089/hum.2020.196