The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	質量分析による遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクターの構造解析
Author(s)	尾山, 博章
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88007
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（尾山　博章）	
論文題名	質量分析による遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクターの構造解析

論文内容の要旨

第一章　緒論　治療用遺伝子を体内へ導入し，病気を治療する遺伝子治療が注目を集めている．組換え型のアデノ随伴ウイルス（AAV）は遺伝子導入率が高い点，病原性が低い点で他のベクターより優れており，AAVベクターは遺伝子治療におけるリーディングプラットフォームであるといえる．AAVベクターは正二十面体のカプシドと内包する一本鎖DNAから構成される．AAVカプシドは三種類のウイルスタンパク質（VP）が60単位会合して形成され，その構成比はVP1:VP2:VP3=1:1:10であると推定されている．AAVベクターは大量生産が困難であること，濃縮できる濃度に制限があることが原因となり，その分析には高感度な手法が要求される．そのため，AAVベクターは遺伝子治療用医薬品としての臨床応用が進む一方で，品質管理項目の整備が不十分である．本博士論文では質量分析を中心とするAAVベクターの構造解析法を開発し，適切な品質管理項目の整備に貢献することを研究目的とした．

第二章　インタクト質量分析を中心としたAAVベクターの一次構造解析　AAVのカプシドを構成するVP比は遺伝子導入率と関係するため，AAVベクターのVP比は適切に管理する必要がある．CGEによる分析の結果，本研究のAAVサンプルにおいても先行研究と同様のVP3より小さい分子量を持つマイナーピークが確認された．LC-UV-MSによるVP成分の分析により，203番目のメチオニン残基から翻訳が開始された通常のVP3に加えて，211番目のメチオニン残基から翻訳が開始されたVP3変化体が検出された．CGEのマイナーピークの推定分子量はVP3変化体の質量におおよそ一致し，さらに211番目のアミノ酸残基にメチオニン残基をもたない血清型のAAVではマイナーピークが検出されなかった．これらの結果より，VP3変化体はマイナーピークに対応することが検証された．VP3変化体を含めたVP比の定量には，VP3とVP3変化体を分離できるCGEが適しているが，データ補正にはVPの配列情報が必要になる．LC-UV-MSはVPの配列を決定できる一方で，VP比の正確な定量が難しい．本章では，CGEによる定量とLC-UV-MSによる配列同定を組み合わせることで，未知ピークにも対応できるVP成分の分析が実施可能であると結論付けた．

第三章　水素重水素交換質量分析を利用したAAVベクターの高次構造解析　AAVカプシドの高次構造はベクターとしての機能に密接な関係を持つため，その整合性は適切に評価する必要がある．一方で，AAVカプシドの溶液中での高次構造評価手法は確立されていない．本章では，水素重水素交換質量分析（HDX-MS）を世界で初めてAAVに適用し，品質管理のモデルケースとしてゲノムを内包した完全粒子と昇温によりゲノムを放出したゲノム放出後粒子の間の高次構造変化を検出することを試みた．完全粒子のカプシドにおいて，3回対称軸隆起領域と5回対称軸チャネル領域で高い重水素交換率が確認された．両領域で構造の自由度が高いという特徴は，マウス微小ウイルスをサンプルとしたHDX-MSの先行例と一致し，パルボウイルス科のウイルスに共通する特徴であることが示唆された．加熱によるゲノム放出条件を検討すると，AAVのカプシドは変性開始温度以下の温度で加熱することで，カプシド状態を保持したままゲノム放出が進行することが明らかになった．HDX-MSを用いて完全粒子とゲノム放出後粒子の高次構造を比較すると，ゲノム放出時にはVP1u-VP2u領域の外在化に伴い，VP3のN末端領域も5回対称軸チャネル内部からカプシド外側へ露出するような構造変化が生じる可能性が示唆された．この5回対称軸チャネルからVP3のN末端領域が露出する構造変化が，AAVのゲノム放出のトリガーであると考えられた．本章の結果より，HDX-MSがAAVカプシドの高次構造評価に有用であり，ゲノム放出の有無をカプシド構造から評価できることが明らかになった．

第四章　総括と将来の展望　本研究ではAAVベクターの適切な品質管理項目の整備を研究目的として，質量分析を利用したAAVカプシドの構造解析を推進した．本研究の成果は，AAVカプシドの正確なVP比の定量ならびに溶液中におけるカプシドの高次構造の整合性評価を可能にする実用性の高いものであり，実際のAAVベクターの品質管理に直接応用できる内容である．将来の展望として，本研究はAAVベクターの構造面からの適切な品質管理項目の整備の皮切りとなるだけでなく，VP3変化体をカプシドに含まない新規AAVベクターの開発や，HDX-MSを利用したAAVカプシドの溶液中での相互作用解析といった新たな研究を促進すると考えられる．総じて，有効性や安全性が担保されたAAVベクターを利用した遺伝子治療の実現へむけて前進していくことが期待される．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　尾山　博章　）			
	(職)		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	内山　進
	副 査	教授	福崎　英一郎
	副 査	教授	大政　健史

論文審査の結果の要旨

第一章　緒論　治療用遺伝子を体内へ導入し、病気を治療する遺伝子治療が注目を集めている。組換え型のアデノ随伴ウイルス（AAV）は他のベクターと比べ、遺伝子導入率が高く病原性が低いことから、AAVベクターは遺伝子治療におけるリーディングプラットフォームである。AAVベクターは正二十面体の約25nmのカプシドとカプシドに内包される一本鎖DNAから構成される。AAVカプシドは3種類のウイルスタンパク質（VP）が60単位会合して形成され、その構成比であるVP比はVP1:VP2:VP3=1:1:10である、と推定されている。ただし、AAVベクターは大量生産が困難であり量の確保が難しいこと、また、濃縮可能な濃度に制限があるため、従来の方法での分析が困難でカプシド構造についても不明点が多く、AAVベクターは遺伝子治療用医薬品としての臨床応用が進む一方で、現状、品質管理項目の整備が不十分な状況にある。従って、AAVベクターを医療において本格的に用いるためには、従来よりも高感度で定量性が高く、信頼性が高いウイルスの分析手法の開発が必要である。以上から、本博士論文ではタンパク質の構造解析において有効な手法であるクロマトグラフィーと質量分析を中心にAAVベクターの新規構造解析法を開発し、適切な品質管理項目の整備に貢献することを研究目的とした。

第二章　インタクト質量分析を中心としたAAVベクターの一次構造解析　AAVカプシドのVP比は遺伝子導入率と関係すると報告されており、VP比は適切に管理する必要がある。CGEによる分析の結果、本研究のAAVサンプルにおいても先行研究と同様のVP3より小さい分子量を持つマイナーピークが確認された。LC-UV-MSによるVP成分の分析により、203番目のメチオニン残基から翻訳が開始された通常のVP3に加えて、211番目のメチオニン残基から翻訳が開始されたM211-VP3変化体が同定された。CGEのマイナーピークの推定分子量はVP3変化体の質量に一致し、さらに211番目のアミノ酸残基にメチオニン残基をもたない血清型のAAVではマイナーピークが検出されなかった。これらの結果より、マイナーピークはM211-VP3変化体であることが判明した。M211-VP3変化体を含めたVP比の定量には、VP3とVP3変化体を分離可能なCGEが適しているものの、正確なVP比決定にはVPの配列情報が必要になる。一方、LC-UV-MSではVPの配列情報を得られるものの、各VPの分離が不十分でるため定量が難しい。これらの結果に基づき、CGEによる定量とLC-UV-MSによる配列同定を組み合わせることで、VP成分の正確な定量が可能となると結論付けた。

第三章　水素重水素交換質量分析を利用したAAVベクターの高次構造解析　AAVカプシドの高次構造はベクターとしての機能に密接な関係を持つため、その整合性は適切に評価する必要がある。一方で、AAVカプシドの溶液中での高次構造評価手法は確立されていない。本章では、水素重水素交換質量分析（HDX-MS）を世界で初めてAAVに適用し、品質管理のモデルケースとしてゲノムを内包した完全粒子と昇温によりゲノムを放出したゲノム放出後粒子の

間の高次構造変化を検出することを試みた。完全粒子のカプシドにおいて、3回対称軸隆起領域と5回対称軸チャネル領域で高い重水素交換率が確認された。両領域で構造の自由度が高いという特徴は、マウス微小ウイルスをサンプルとしたHDX-MSの先行例と一致し、パルボウイルス科のウイルスに共通する特徴であることが示唆された。加熱によるゲノム放出条件を検討すると、AAVのカプシドは変性開始温度以下の温度で加熱することで、カプシド状態を保持したままゲノム放出が進行することが明らかになった。HDX-MSを用いて完全粒子とゲノム放出後粒子の高次構造を比較すると、ゲノム放出時にはVP1u-VP2u領域の外在化に伴い、VP3のN末端領域も5回対称軸チャネル内部からカプシド外側へ露出するような構造変化が生じる可能性が示唆された。この5回対称軸チャネルからVP3のN末端領域が露出する構造変化が、AAVのゲノム放出のトリガーであると考えられた。本章の結果より、HDX-MSがAAVカプシドの高次構造評価に有用であり、ゲノム放出の有無をカプシド構造から評価できることが明らかになった。

以上のように、本論文では、AAVベクターの適切な品質管理項目の整備を研究目的として、質量分析を利用したAAVカプシドの構造解析法の開発に関する研究に取り組んだ。研究成果は、AAVカプシドの正確なVP比の定量ならびに溶液中におけるカプシドの高次構造の整合性評価を可能にする実用性の高いものであり、実際のAAVベクターの品質管理に直接応用できる内容である。将来の展望として、本研究はAAVベクターの構造面からの適切な品質管理項目の整備の皮切りとなるだけでなく、VP3変化体をカプシドに含まない新規AAVベクターの開発や、HDX-MSを利用したAAVカプシドの溶液中での相互作用解析といった新たな研究を促進すると考えられる。総じて、有効性や安全性が担保されたAAVベクターを利用した遺伝子治療の実現へむけて前進していくことが期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。