Osaka University Knowledge Archive

Title	カプシドタンパク質の化学量論比に着目したアデノ随伴ウイルスベクターの特性解析と応用
Author(s)	大西, 一幸
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96023
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（大西　一幸）	
論文題名	カプシドタンパク質の化学量論比に着目したアデノ随伴ウイルスベクターの特性解析と応用

論文内容の要旨

組換え型アデノ随伴ウイルス（rAAV）は、近年、遺伝子治療用のベクターとして注目されている。rAAV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。rAAVのカプシドは3種類のウイルスタンパク質（VP）が60単位会合することで形成され、その化学量論比はVP1 ： VP2 ： VP3　= 5 ： 5 ： 50であると推定されている。rAAVの分離精製には、塩化セシウム（CsCl）密度勾配遠心分離が用いられるが、しばしばDNAを内包しない空粒子の他に二種類のDNAを内包した完全粒子が存在することが知られている。密度差の原因が内包ゲノムDNA長に起因している報告がある一方で、VPサブユニットの化学量論比に起因している報告という異なる報告が多数存在する。そのため、1970年に初めてこれら浮遊密度の異なる粒子の存在が報告されて以来、その明確な違いについては未だ明らかになっていない。一方、これまでrAAVの特性解析（カプシドタンパク質や内包ゲノムDNA）の手法として、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（SDS-PAGE）やアガロースゲル電気泳動などのスラブ型ゲル電気泳動を基にした分析が多く用いられており、定量性に欠けていた。特にVPサブユニットの化学量論比は、rAAVベクターの遺伝子導入率に影響を及ぼす報告は数多く存在する。そのため、ヒト遺伝子治療におけるrAAVベクターの安全性と有効性を担保するためには、遺伝子治療となるrAAVベクターの品質を徹底的に管理する必要があり、2種類の完全粒子のような粒子不均一性は定量的な特性解析の必要がある。以上の背景から、本博士論文では、ヒトで初めて発見され最も研究例が多い血清型であるrAAV2型（rAAV2）に着目し、CsCl平衡密度勾配中で見られる2種類の完全粒子の特性の違いを定量的な特性解析および単粒子レベルの分析により明らかにすることを目的とした。加えて、特性の違いに関連するrAAV変異体の作成に取り組んだ。

第二章では、CsCl平衡密度勾配中で観察される密度の異なるrAAV2粒子に対して分画の最適化および包括的な特性解析を試みた。まず、CsCl密度勾配遠心分離を複数回実施することで、密度差の非常に小さい2種類のrAAV2粒子の分画を実施した。分画した2種類のrAAV2粒子に対して、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）を用いたVPサブユニットおよび内包ゲノムDNAの定量的な分析を実施した。その結果、2種類の粒子間に内包ゲノムDNAの差は見られなかった。一方で、低密度粒子は、高密度粒子と比較して、感染時の機能ドメインを持つVP1およびVP2化学量論比が高いことが示唆された。また、電荷検出型質量分析（CDMS）によるネイティブ質量分析の結果、低密度粒子は高密度粒子と比較して分子量が大きく、配列の長いVPであるVP1およびVP2の化学量論比が高いことを裏付ける結果となった。一方、*in vitro*感染性評価では、低密度粒子は高密度粒子および分画前のバルクよりも高い遺伝子導入効率を示した。これらの結果から、CsCl平衡密度勾配中に観察された2種類の完全粒子は、ウイルスゲノム長の違いではなく、VPサブユニットの不均一性に由来し、低密度粒子は高い*in vitro*遺伝子導入効率をもつことを明らかにした。

第三章では、第二章で得た結果を基にVPサブユニットの化学量論比を変化させたrAAV2変異体の作成を試みた。VP3およびVP3 clipの翻訳開始点におけるメチオニン残基への適切な変異（M203VおよびM211V）を導入することで、VP3およびVP3 clipの翻訳量抑制に起因するVPサブユニットの化学量論比を変化させた変異体の作成に成功した。これらrAAV2-M203VおよびrAAV2-M211Vは、CGEを用いたVPサブユニットの分析を実施すると、VP1およびVP2化学量論比が野生型rAAV2（rAAV2-WT）と比較して高いことが示唆された。これらrAAV2変異体の*in vitro*遺伝子導入効率についてもrAAV2-WTより優位に高かった。一方で、驚くべきことに、これらrAAV2変異体は、CsCl密度勾配中で1つの分布しか示さず、VPサブユニットの不均一性が減少していることが示唆された。また、CDMSによる分析から、質量分布が狭くなっていることが示唆され、粒子の不均一性が減少していることを支持する結果となった。

第四章では、第二章と第三章で得られた結果を基に「VPサブユニットの化学量論比」と「遺伝子導入効率」の相関関係を定量的に算出した。その結果、「VP1のみ」または「VP2のみ」と比較して、「VP1およびVP2の総量」と「遺伝子導入効率」に良い正の相関関係が確認された。これは、ゲルデンシトメトリーによる定量に基づいて相関関係を示した過去の報告と一致していたが、相関関係についてより明確な数値関係が初めて明らかとなった。また、本博士論文を総括するとともに、今回の研究において得られた遺伝子導入効率が高く、均一なrAAV2変異体についての今後の展望について記述した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　大西　一幸　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	内山　進
	副 査　教 授	大政　健史
	副 査　教 授	青木　航

論文審査の結果の要旨

組換え型アデノ随伴ウイルス（rAAV）は、近年、遺伝子治療用のベクターとして注目されている。rAAV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。rAAVのカプシドは3種類のウイルスタンパク質（VP）が60単位会合することで形成され、その化学量論比はVP1 ： VP2 ： VP3 ＝ 5 ： 5 ： 50であると推定されている。rAAVの分離精製には、塩化セシウム（CsCl）密度勾配遠心分離が用いられるが、しばしばDNAを内包しない空粒子の他に二種類のDNAを内包した完全粒子が存在することが知られている。密度差の原因が内包ゲノムDNA長に起因している報告がある一方で、VPサブユニットの化学量論比に起因している報告という異なる報告が多数存在する。そのため、1970年に初めてこれら浮遊密度の異なる粒子の存在が報告されて以来、その明確な違いについては未だ明らかになっていない。一方、これまでrAAVの特性解析（カプシドタンパク質や内包ゲノムDNA）の手法として、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（SDS-PAGE）やアガロースゲル電気泳動などのスラブ型ゲル電気泳動を基にした分析が多く用いられており、定量性に欠けていた。特にVPサブユニットの化学量論比は、rAAVベクターの遺伝子導入率に影響を及ぼす報告は数多く存在する。そのため、ヒト遺伝子治療におけるrAAVベクターの安全性と有効性を担保するためには、遺伝子治療となるrAAVベクターの品質を徹底的に管理する必要があり、2種類の完全粒子のような粒子不均一性は定量的な特性解析の必要がある。以上の背景から、本博士論文では、ヒトで初めて発見され最も研究例が多い血清型であるrAAV2型（rAAV2）に着目し、CsCl平衡密度勾配中で見られる2種類の完全粒子の特性の違いを定量的な特性解析および単粒子レベルの分析により明らかにすることを目的とした。加えて、特性の違いに関連するrAAV変異体の作成に取り組んだ。

第二章では、CsCl平衡密度勾配中で観察される密度の異なるrAAV2粒子に対して分画の最適化および包括的な特性解析を試みた。まず、CsCl密度勾配遠心分離を複数回実施することで、密度差の非常に小さい2種類のrAAV2粒子の分画を実施した。分画した2種類のrAAV2粒子に対して、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）を用いたVPサブユニットおよび内包ゲノムDNAの定量的な分析を実施した。その結果、2種類の粒子間に内包ゲノムDNAの差は見られなかった。一方で、低密度粒子は、高密度粒子と比較して、感染時の機能ドメインを持つVP1およびVP2化学量論比が高いことが示唆された。また、電荷検出型質量分析（CDMS）によるネイティブ質量分析の結果、低密度粒子は高密度粒子と比較して分子量が大きく、配列の長いVPであるVP1およびVP2の化学量論比が高いことを裏付ける結果となった。一方、*in vitro*感染性評価では、低密度粒子は高密度粒子および分画前のバルクよりも高い遺伝子導入効率を示した。これらの結果から、CsCl平衡密度勾配中に観察された2種類の完全粒子は、ウイルスゲノム長の違いではなく、VPサブユニットの不均一性に由来し、低密度粒子は高い*in vitro*遺伝子導入効率をもつことを明らかにした。

第三章では、第二章で得た結果を基にVPサブユニットの化学量論比を変化させたrAAV2変異体の作成を試みた。VP3およびVP3 clipの翻訳開始点におけるメチオニン残基への適切な変異（M203VおよびM211V）を導入することで、VP3およびVP3 clipの翻訳量抑制に起因するVPサブユニットの化学量論比を変化させた変異体の作成に成功した。これらrAAV2-M203VおよびrAAV2-M211Vは、CGEを用いたVPサブユニットの分析を実施すると、VP1およびVP2化学量論比が野生型rAAV2（rAAV2-WT）と比較して高いことが示唆された。これらrAAV2変異体の*in vitro*遺伝子導入効率についてもrAAV2-WTより優位に高かった。一方で、驚くべきことに、これらrAAV2変異体は、CsCl密度勾配中で1つの分布しか示さず、VPサブユニットの不均一性が減少していることが示唆された。また、CDMSによる分析から、質量分布が狭くなっていることが示唆され、粒子の不均一性が減少していることを支持する結果となった。

第四章では、第二章と第三章で得られた結果を基に「VPサブユニットの化学量論比」と「遺伝子導入効率」の相関関係を定量的に算出した。その結果、「VP1のみ」または「VP2のみ」と比較して、「VP1およびVP2の総量」と「遺伝子導入効率」に良い正の相関関係が確認された。これは、ゲルデンシトメトリーによる定量に基づいて相関関係を示した過去の報告と一致していたが、相関関係についてより明確な数値関係が初めて明らかとなった。また、本博士論文を総括するとともに、今回の研究において得られた遺伝子導入効率が高く、均一なrAAV2変異体についての今後の展望について記述した。

以上のように、本博士論文はrAAV2ベクターのVP化学量論比に着目した粒子不均一性の解明と応用を研究目的として、VP化学量論比に起因する密度違いのrAAV2の特性解析及びVP化学量論比に関連するrAAV2変異体の研究に取り組んだ。研究成果は、精製時のrAAV2の粒子不均一性の原因解明及び不均一性を減少させつつ高活性なrAAV2ベクターの製造を可能とする内容である。また、VP化学量論比と遺伝子導入効率との関係が定量的に明らかになったことで、rAAV2の品質管理項目へ応用できる内容である。将来の展望として、本研究を皮切りにAAVカプシドに含まれるVPモル比と遺伝子導入効率との関係が詳細に理解されれば、よりVPモル比が改善された高活性なAAVベクターの製造が推進される可能性がある。従来のrAAV2では、より高活性なAAVベクターを製造するには2回の塩化セシウム密度遠心分離による精製が必須となる。今回得られたrAAV2変異体は、1回の密度勾配遠心による分離により高活性なrAAV2製造が可能である。また、医薬品製造現場で好まれるクロマトグラフィーにより空粒子と完全粒子を分離する精製法にも応用が可能であると期待される。以上のように、有効性が高く、より製造性の良い、遺伝子治療用ベクターの臨床応用の実現にむけて貢献すると期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。