

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07681

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスベクターの粒子形成と感染機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of particle formation and infection mechanism for adeno-associated virus

研究代表者

大庭 賢二 (Kenji, Ohba)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20759576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの粒子形成と感染機構の解析を行った。

期間中に実施した研究から、AAVの複製時における粒子形成とウイルスゲノムの封入に関して新たな知見を得た。それに基づき、既存のAAVベクター産生法の改変を行い、効率良くAAVベクターを作製できる新たなAAVベクター産生法を開発することに成功した。また、感染機構の解析にDNAアプタマーライブラリーを用いた探索法の開発を行い、感染に関わる分子を同定可能にするスクリーニングシステムを構築した。

この研究によって、AAVベクターを用いた遺伝子治療等の発展に大いに貢献すると共に、AAVの感染機構の全容の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、AAVベクターを用いた遺伝子治療において問題となっているウイルスゲノムを持たない空ベクターの大量産生を減少させ、効率良くAAVベクターを産生することが可能となり、遺伝子治療の薬価高騰を抑制できる可能性がある。また、AAVにおけるウイルス粒子形成に関する新たな知見が明らかとなっていることから、学術的にも社会的にも非常に大きな意義を持つ。

加えて、AAVの感染機構の全容解明に向け、新たな宿主因子スクリーニングシステムを構築したことから、今後の新たな発見が期待され、その点においても学術的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：In present study, we investigated the mechanism of viral particle formation and viral infection on adeno-associated virus(AAV).

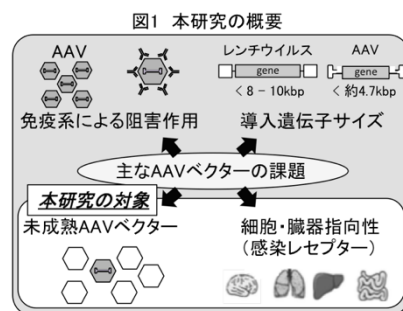
From the results by experiments performed during grant supported term, the new aspect about the relation of viral particle formation and viral genome incorporation was revealed. Based on this findings, we have succeeded to establish a novel AAV vector production system, which can efficiently produce AAV vector compared to conventional system. In addition, we have completed to develop the host factor screening system using DNA aptamer for the analyses of viral infection mechanism. Therefore, there are much expectation that our findings lead to more development of gene therapy using AAV vectors, and reveal whole mechanism of AAV infection.

研究分野：ウイルス学、がん、遺伝子治療

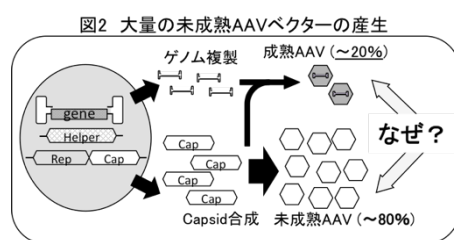
キーワード：ウイルス学 アデノ随伴ウイルス(AAV) ウイルス粒子形成 感染機構 DNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

(1) 科学技術の発展によって、ヒトの遺伝子疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能になった。近年では、脳や神経細胞にも遺伝子導入できるアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクターが注目を集めており、AAV ベクターを用いた遺伝子治療の臨床応用研究が進んできている。しかし病原性が低いことが負に作用したため、発見から年月が経っているにもかかわらず、他のウイルスに比べて AAV の分子機構は未だに分かっていないことが多い。特に AAV ベクターを用いた遺伝子治療においては、主に「未成熟 AAV ベクターの産生」「細胞指向性を決定づける未知の感染レセプター」「限られた導入遺伝子サイズ」「宿主免疫系による阻害作用」の4つの大きな問題が存在している(図1)。これらの問題を改善することは今後の遺伝子治療の発展に大きく寄与し、学術的意義は非常に大きい。特にこれらの問題の中で、「未成熟 AAV ベクターの産生」と「細胞指向性を決定づける未知の感染レセプター」は AAV ベクターを用いた遺伝子治療の今後の発展に大きな影響を与える問題である。



(2) 既存の AAV ベクター産生システムを用いると、80%を超える割合で AAV ゲノムを持たない大量の未成熟型 AAV が産生されてしまう(図2)。このことは AAV 遺伝子治療の効率に影響を与えるばかりか、宿主の免疫反応を強く誘導してしまうことや、将来的な臨床応用時の AAV 遺伝子治療の薬価高騰へと直結してくる。しかしながら、「なぜ大量に未成熟型 AAV が産生されるのか?」は分かっていない。したがって、早急に未成熟型 AAV ベクターが産生される詳細な分子機構を解明する必要がある。



(3) また、AAV には多数のセロタイプが存在することが分かっているが、「なぜ各々のセロタイプが異なる細胞(臓器)指向性を示すのか?」は未だによく分かっていない。近年、AAV の感染レセプターとされる分子(AAV レセプター; AAVR)が同定された(Pillay et al., Nature, 530: 108-112, 2016)。しかし最新の研究では、AAV4 は AAVR を介した感染依存性が低く、AAV8 は培養細胞とマウスの間で AAVR 依存性に変化が生じている(Dudak et al., J. virol., 92, e02213-17, 2018; 図3)。さらに、同種の細胞においても各々の AAV セロタイプの感受性に違いが生じている(Ellis et al., Virol. J., 10: 74, 2013)。これらのことは、「AAVR は感染に大きく関わる分子であるが、各 AAV の感染を決定づける感染レセプターは他にある可能性」を示している。したがって、AAV の細胞指向性を解明するために AAV の感染レセプターを探索する必要がある。

図3 AAVセロタイプの指向性の違い

AAV	感染組織	AAVR依存性		293細胞への感染性
		培養系	マウス	
AAV2	肝臓・筋肉など	高い	高い	+++
AAV4	肝臓・筋肉など	低い	低い	+
AAV5	肝臓・肺など	高い	高い	+
AAV8	肝臓・脳など	高い	高い*	++
AAV9	肝臓・脳など	高い	高い	++

* AAVR欠損で臓器指向性に变化

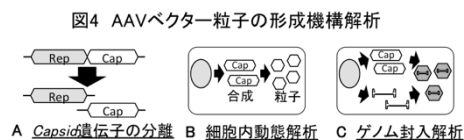
2. 研究の目的

本研究では、AAV ベクターを用いた遺伝子治療における問題点(図1)の中から、特に遺伝子治療の効率と有効性に大きな影響を与える「未成熟 AAV ベクターの産生」「細胞指向性を決定づける未知の感染レセプター」の二つに着目し、AAV のウイルス粒子形成と感染レセプターの分子機構を解明することを目的とした基礎研究を行う。本研究を通して、将来的な AAV ベクターを用いた遺伝子治療の発展へと繋がる礎を築いていく。

3. 研究の方法

(1) AAV ベクターのウイルス粒子形成機構の解析

申請者が過去に解析してきた多くのウイルスでは、Capsid(Cap) 遺伝子の単独発現でウイルス様粒子 (Virus-like particle; VLP) を産生してしまう。そこで、AAV においても Cap 遺伝子の発現のみで VLP を形成するかを確認し、簡略化した実験系によって AAV のウイルス粒子形成機構の解明を行う。具体的にはまず、Replicase/Capsid(Rep/Cap)融合遺伝子から Cap 遺伝子を分離し、CMV などの一般的なプロモーターによって強制発現する系を構築する。そして Cap 遺伝子の単独発現で VLP が形成されることを確認する(図4A)。Cap 単独発現による VLP の形成機構は、野生型ウイルスの粒子形成と類似していると考えられる。そこで次に、Cap 遺伝子の単独発現系を用いて、Cap タンパク質の発現からウイルス粒子形成までの動態を、蛍光タンパク質との融合や蛍光抗体による免疫染色で解析し、Cap タンパク質の細胞内での動態や粒子形成が行われるタイミング、ならびに粒子形成が起こる場所を解析する(図4B)。さらに、ウイルス粒子形成と AAV ゲノム封入のタイミングや細胞内の場所を解析するために、Cap 単独発現系に蛍光などで標識した AAV ゲノム



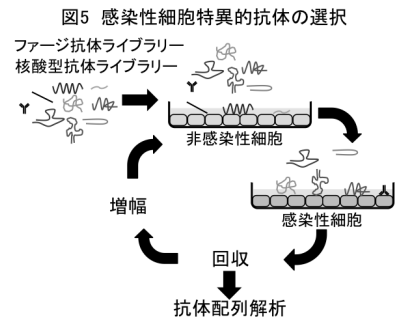
を同時(または *Rep* 遺伝子と合わせて)に導入し、AAV ゲノムと Cap タンパク質が集積するタイミング、ならびにその細胞内部位を経時的に観察し、成熟 AAV の形成メカニズムを解析する(図 4C)。

(2) AAV 感染レセプターの探索

申請者が構築したファージ抗体ライブラリー、ならびに核酸型抗体(アプタマー)ライブラリーを用いた細胞表面分子スクリーニングによって、新たなウイルス感染レセプターの同定を試みる。具体的には以下の手順で行う。

① 感染性細胞特異的なファージ・核酸型抗体の単離

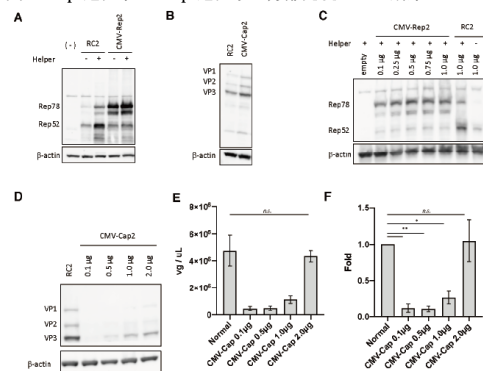
感染性細胞特異的な抗体を単離するために、まず抗体ライブラリーを非感染性(または弱感染性)細胞に反応させることで非特異的な抗体を取り除く(図 5)。次に未反応の抗体ライブラリーを感染性細胞に反応させ、特異的な抗体を感染性細胞に吸着させる。過剰な抗体を生理食塩水で洗い流し、感染性細胞に特異的な抗体を回収する。その後ファージ抗体は大腸菌を用いて、核酸型抗体は PCR によって増幅する。増幅した抗体を再び非感染性細胞-感染性細胞の順に反応させる。このサイクルを 3-7 回ほど繰り返し、感染性細胞特異的な抗体を濃縮する。濃縮した後にファージ抗体の遺伝子配列、またアプタマーの核酸配列を解析することによって、感染性細胞特異的な抗体を同定する。



② AAV 感染レセプター特異的な抗体の同定

単離された AAV 感染性細胞表面に特異的に結合する抗体群の中から、ウイルス感染レセプターを特異的に認識する抗体を同定する。具体的には、マルチウェルプレートに AAV 感染性細胞を播種し、単離された抗体を用いて個別に免疫蛍光染色を行う(図 6 左)。その後共焦点顕微鏡を用いて観察し、抗体が細胞表面分子を認識していることを確認する。次に抗体の中和作用を確認するために、マルチウェルプレートに AAV 感染性細胞を播種し、単離された抗体をウェル毎に添加する。そこへ AAV-GFP または AAV-Luciferase (AAV-Luc) ウイルスを添加して AAV を細胞へと感染させる(図 6 右)。感染から 48-72 時間後に細胞を観察または回収して、GFP の蛍光や Luciferase 活性を指標に感染を阻害した抗体を同定する。感染を阻害した抗体が認識する分子は、免疫沈降法によってタンパク質を単離した後に、質量分析解析を行うことによって順次同定していく。

図 6 *Rep* 遺伝子と *Cap* 遺伝子の分離発現による効果

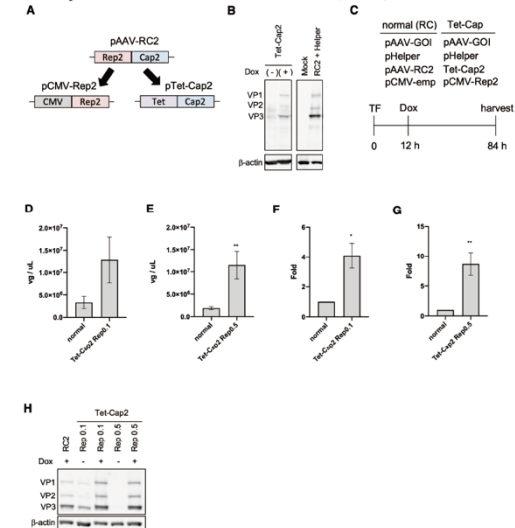


4. 研究成果

(1) アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクターの粒子形成機構を解析するために、まず AAV セロタイプ 2 (AAV2) を用いて、AAV ベクターを産生する時に用いるウイルス遺伝子発現プラスミド (*Replicase (Rep)/Capsid (Cap)* 融合遺伝子) から、*Rep* 遺伝子と *Cap* 遺伝子を分離し、それぞれを別々に制御できるように CMV プロモーター下流にクローニングした。それらのプラスミドを用いて各遺伝子を発現させると、従来法と同じように *Rep* タンパク質・*Cap* タンパク質を発現制御することができた(図 6A-B)。

(2) これらのプラスミドを用いて AAV ベクターを産生してみると、*Rep* タンパク質の発現パターンは従来法と異なったが、*Cap* タンパク質の発現パターンは従来法と同様の発現パターンを示した(図 6C-D)。また、これらのプラスミドを用いることで、確かに AAV ベクターを作製することができた(図 6E-F)。

図 7 *Cap* 遺伝子発現タイミング調整による効果 (AAV2)



(3) 一方で、これらのプラスミドを用いて様々な条件で AAV ベクターを産生させても、従来法に比べてウイルス産生量の向上が見られなかった(図 6E-F)。

(4) 細胞内におけるウイルスゲノムと *Cap* タンパク質の時間的な量の違いによる AAV ベクター産生量の違いを解析するために、*Cap* 遺伝子を薬剤(テトラサイクリン)の添加によって発現タイミングを調整できるテトラサイクリン依存性プロモーターの下流にクローニングした(Tet-Cap:図 7A)。このプラスミドを用いて *Cap* タンパク質を発現させると、従来法と類似した *Cap* タンパク質の発現パターンを示した(図 7B)。

(5) *Cap* 発現タイミング調整プラスミド(pTet-Cap)と CMV プロモーターで制御される *Rep* 発現プラス

ミド、並びに従来法でも用いられる AAV ゲノムプラスミドとアデノウイルス遺伝子発現プラスミドを用いて 293 細胞にプラスミドを導入し、プラスミド導入から 12 時間後にテトラサイクリンを添加することで AAV ベクターを産生させたところ、従来法に比べて 4-10 倍程度ウイルス産生総量を増加させることができた。一方で Rep 発現プラスミドのトランスフェクション量においては、少量(0.1 μ g)よりも Rep 発現プラスミド導入量が多い(0.5 μ g)方がウイルス産生総量の増加率が高いことがわかった。これらのことを総合すると、Rep タンパク質によって十分にウイルスゲノムが細胞内に複製され、その後 Cap タンパク質が産生されることで効率良く AAV ベクターが作製できることが新たに分かった(図 7C-H)。

(6) また、AAV ウイルス粒子に内包される AAV ゲノムの量を解析すると、Cap タンパク質発現タイミングを調整することによって、従来法に比べてウイルスゲノムを含まない AAV 粒子(empty capsid:空ベクター)の割合を 2-5 割程度減少させることができることがわかった(図 8A-D)。Rep

タンパク質の発現量の違いによる影響を解析すると、Rep タンパク質の発現量が低い(0.1 μ g)ときに比べて、多い方(0.5 μ g)が空ベクターの産生量を抑制することができた。さらに、Cap タンパク質の発現タイミングによる違いを比較すると、Cap タンパク質の発現を促すテトラサイクリンの添加が早い時(プラスミド導入から 6 時間後)に比べて、遅いタイミングで刺激(12 時間後)の方が効率良く空ベクターを減少させることができた(図 8E-F)。これらのことから、従来の AAV ベクター産生法ではウイルスのゲノム複製が十分になる前から Cap タンパク質が発現することによって過剰に空ベクターを産生しており、ウイルスのライフサイクルを考慮して Cap タンパク質の発現タイミングを調整することによって、効率良く AAV ベクターを産生することができると示唆された。

(7) 前述までの解析では、AAV のセロタイプのうち代表的な AAV2 を用いて解析を行った。しかし、AAV には多数のセロタイプが存在している。ウイルスのライフサイクルに即した AAV ベクター作製法による産生量の改善に普遍性があるかを解析するために、様々な AAV のセロタイプの Cap 遺伝子をテトラサイクリン依存性プロモーターの下流にクローニングした。これらを用いて Cap タンパク質の発現パターンを確認すると、AAV2 の時と同様に従来法と類似した Cap タンパク質の発現パターンを示した(図 9A)。(8) これらを用いて AAV ベクターを産生させると、セロタイプによる差はみられるが、全てのセロタイプにおいて、1.5-6 倍のウイルス産生総量の向上が見られた。また、空ベクター比率の比較をすると、AAV8 ではアッセイ感度の影響もあり差が見られなかったが、他のセロタイプでは、1-5 割程度の空ベクター産生の減少が見られた。これらのことから、ウイルスライフサイクルに即した Cap タンパク質の発現調整による AAV ベクター産生効率の向上は、様々なセロタイプに対しても有効であることが示された(図 9B-I)。

(9) 我々が開発した新たな方法(Tet-Cap 法)で作製した AAV ベクターの機能を確認するために、Tet-Cap 法と従来法で作製した AAV ベクターのベクター量をそろえて 2v6.11 細胞に感染させたところ、様々なセロタイプにおいて Tet-Cap 法と従来法という作製法の違いによる感染性の違いは観察されなかった(図 10A-E)。

図 8 Tet-Cap 法による空ベクターの減少(AAV2)

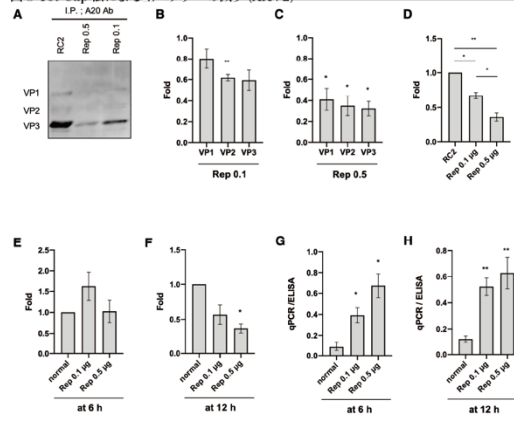


図 9 様々なセロタイプにおける Tet-Cap 法の効果

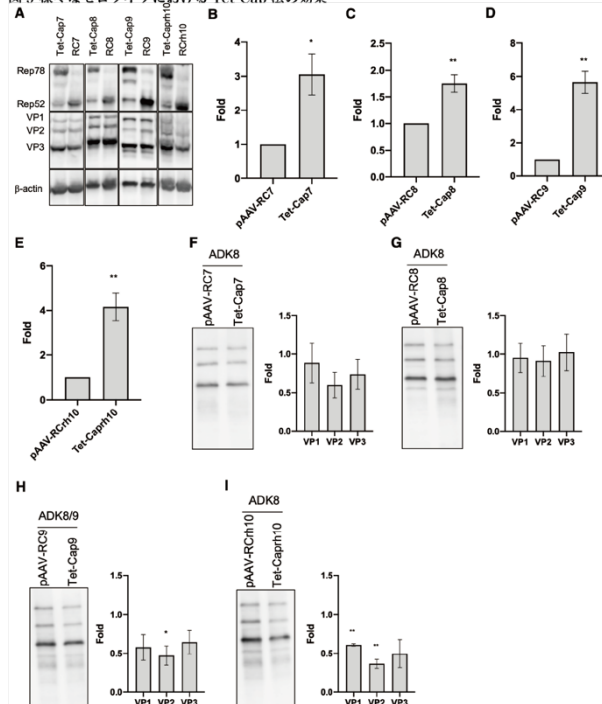
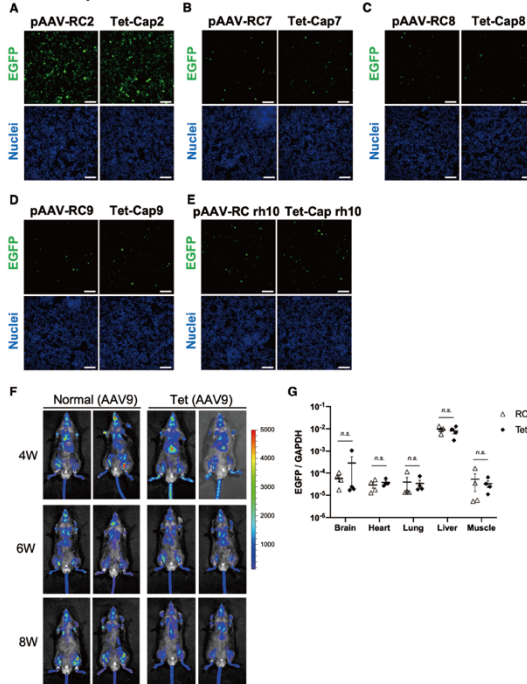


図 10 Tet-Cap 法による感染性への影響



(10) また *in vivo* での検証を行うために、大容量での AAV ベクターの産生を行ったところ、スケールアップしても Cap タンパク質発現調整によるウイルス産生量の向上効果は変わらずに維持をされていた。

(11) 大容量系で作製した AAV9 ベクターとマウスを用いて、*in vivo* でのベクターデリバリー機能解析を行ったところ、*in vivo* でも Tet-Cap 法と従来法の作製法による AAV ベクターのデリバリー機能に差異はみられなかった。これらことから、我々が新たに開発した Tet-Cap 法では、ベクターの感染性に影響を与えずにベクター産生効率を向上できることがわかった(図 10F-G)。

(12) ベクター産生効率の改善理由を解析するために、まず Rep/Cap 融合遺伝子の分離に伴う Rep タンパク質の発現パターンに影響について解析をおこなった。すると、Tet-Cap 法を用いても、従来法の Rep タンパク質バリエーションの発現パターン (Rep78-low, Rep52-high) に変更すると AAV ベクター産生量が減少し、空ベクター産生比も悪化した(図 11)。このことから、新たに開発した Tet-Cap 法によるベクター産生効率の向上は、Rep タンパク質バリエーションの発現パターンの変化 (Rep78-high, Rep52-low) による効果であることが判明した。

(13) また、Cap タンパク質の発現タイミング調整による AAV ベクター産生効率への影響を解析するために、Tet-Cap 発現カセットを安定的に導入した 293 細胞を樹立した。これを用いて Cap 発現タイミング調整による影響のみを解析したところ、1-2 倍程度のウイルス産生量の向上、ならびに 1.5 倍程度の AAV ゲノムを含むウイルス粒子量の向上がみられた(図 12)。このことから Cap 発現タイミングの調整によっても AAV ベクターの産生効率が向上していることがわかった。

(14) 以上より、我々が新たに作製した Cap タンパク質による粒子形成と AAV ゲノムの複製というウイルスライフサイクルを考慮した Tet-Cap 法は、Rep タンパク質の発現パターンの変化と Cap タンパク質の発現タイミングの調整の相加効果によって、感染性に影響を与えることなく、多様なセロタイプに共通して AAV ベクターの質と量を改善できることが判明した。

(15) これらの成果を論文 (iScience, STAR protocols) で発表するとともに、タカラバイオ社と共同で国内・国際特許を申請した。(16) 加えて、AAV ベクターの感染レセプターの探索のために、研究代表者が有する DNA アプタマー技術を用いた探索系の構築を試みた。

(17) 研究代表者が独自に DNA アプタマーライブラリーを構築し、ライブラリーがスクリーニングに用いることができるかを確認するために、PCR 法や標的に結合する DNA アプタマーの回収法、標的結合性 DNA アプタマーの増幅法の検証を行い、独自に作製した DNA アプタマーライブラリーを用いてスクリーニング系を立ち上げることが可能であることを確認した。

(18) この DNA アプタマーライブラリーと生きた AAV ベクター感染性細胞を用いて、感染性細胞表面に特異的に結合する DNA アプタマーを回収した。回収した DNA アプタマーを PCR 法にて増幅して精製し、再び AAV ベクター感染性細胞に反応させた。この作業を 5-9 回程度繰り返し、AAV ベクター感染性細胞に特異的に結合する DNA アプタマーを濃縮した。これらの候補 DNA アプタマーを個別に用いて標的分子の解析を開始した。

(19) 本研究成果から、遺伝子治療に用いる AAV ベクターを効率良く産生することが可能になり、将来的な遺伝子治療の薬価減少につながることで期待される。また新たな感染レセプターの探索や、AAV ベクターのゲノム複製と Cap タンパク質の発現タイミングの関係性といった AAV の分子機構に関する新たな知見は、今後の AAV ベクター産生系の改善や遺伝子治療の発展に大きく寄与することが期待される。

図 11 Rep78 発現上昇によるウイルス産生における効果

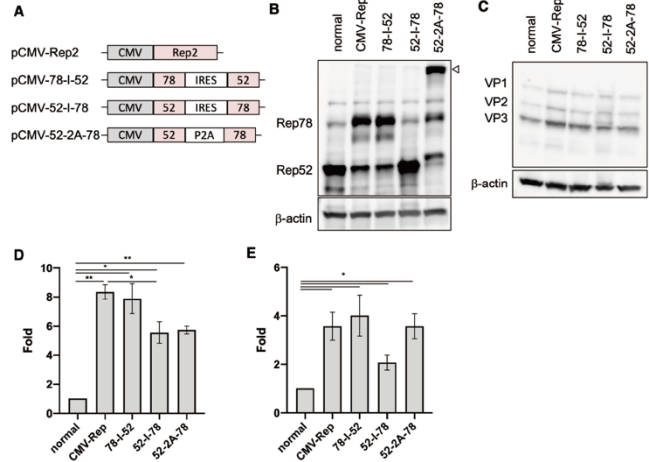
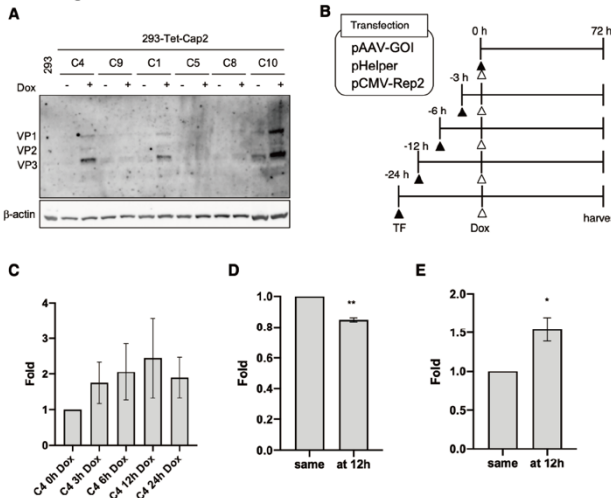


図 12 Cap 発現タイミング調整によるウイルス産生における効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohba Kenji, Sehara Yoshihide, Enoki Tatsuji, Mineno Junichi, Ozawa Keiya, Mizukami Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Adeno-associated virus vector system controlling capsid expression improves viral quantity and quality	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106487 ~ 106487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohba Kenji, Mizukami Hiroaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for producing an adeno-associated virus vector by controlling capsid expression timing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102542 ~ 102542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大庭賢二、榎竜嗣	4. 巻 81
2. 論文標題 遺伝子治療等に用いるAAVベクターの効率の良い産生法の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 509 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayukawa Shiyu, Kamoshita Nagisa, Nakayama Jun, Teramoto Ryohei, Pishesha Novalia, Ohba Kenji, Sato Nanami, Kozawa Kei, Abe Hikari, Semba Kentaro, Goda Nobuhito, Fujita Yasuyuki, Maruyama Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I?LILRB3 interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01045-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大庭 賢二、瀬原 吉英、榎 竜嗣、峰野 純一、小澤 敬也、水上 浩明
2. 発表標題 Novel adeno-associated virus (AAV) vector production system for gene therapy
3. 学会等名 第69回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大庭 賢二
2. 発表標題 遺伝子治療の発展を目指した次世代AAVベクターシステムの開発
3. 学会等名 タカラバイオ株式会社 社内講演（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大庭 賢二
2. 発表標題 キャプシドの発現タイミングを調整した効率良いアデノ随伴ウイルスベクター産生システム
3. 学会等名 第21回 自治医科大学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大庭 賢二、瀬原 吉英、榎 竜嗣、峰野 純一、小澤 敬也、水上 浩明
2. 発表標題 キャプシドの発現タイミングを調整した効率良いアデノ随伴ウイルスベクター産生システム
3. 学会等名 第29回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの効率の良い産生システム	発明者 大庭 賢二、榎 竜嗣	権利者 大庭 賢二、榎 竜嗣、自治医科大学、タカラバ
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/011709	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

遺伝子治療に用いるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの効率の良い産生システムを開発 https://www.jichi.ac.jp/news/research/2023050801/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------