

令和元年6月21日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08644

研究課題名(和文) 適正製造規範に適合する簡易精製が可能な次世代AAVベクターの開発 その2

研究課題名(英文) Purification of rAAV with ultracentrifugation-free technique towards GMP production Part 2

研究代表者

平井 幸彦 (Hirai, Yukihiko)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：10089617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：クロマトグラフィー技術のみで高品質なAAV9ベクター精製法を確立した。ウイルスゲノム配列・ゲノム構造にも非依存性で、総力価が $10E+14$ ウイルスゲノム以上のAAV9ベクターを調製できた。中空粒子の混入率を電子顕微鏡観察から算出すると、どれも5%以下と、高純度に再現性を持た精製方法であることが示された。分析用超遠心分離法による全長ゲノムを含む粒子の解析では、38%となり、作成・精製法の更なる改良が必要であることを示唆する。Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 11: 180-190に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標準作業手順上の煩雑さを含む超遠心分離を含まないtype 9 AAVベクターの作成・精製のdown-stream processingを確立した。ウイルスゲノム配列(GOI)・ゲノム構造にも非依存性で、 $10E+14$ ウイルスゲノム以上の総力価を大学研究室設備で調製できた。電子顕微鏡観察からの中空粒子の混入率はどれも5%以下と、高純度に再現性をもつ精製方法であった。しかし、分析用超遠心分離法による全長ゲノムを含む粒子の解析では、アフィニティークロマトを用いない本法でも38%となり、高い遺伝子導入効率を有するAAVベクターの作成・精製にはの更なる改良が必要であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：A high quality AAV9 vector purification method was established by chromatographic techniques only. The virus genome sequence and genome structure were also independent, and AAV9 vector with a total titer of $10E+14$ virus genome or more could be prepared. The ratio of the hollow particles was calculated from electron microscopic observation, and it was shown that the purification method had reproducibility as high purity as 5% or less. Analysis of particles containing a full-length genome by analytical ultracentrifugation results in 38%, suggesting that further refinement of the preparation and purification method is necessary. These results was published in Mol Ther Methods Clin Dev. 2018; 11: 180-190.

研究分野：分子遺伝医学

キーワード：AAVベクター 適正製造規範 簡易精製法

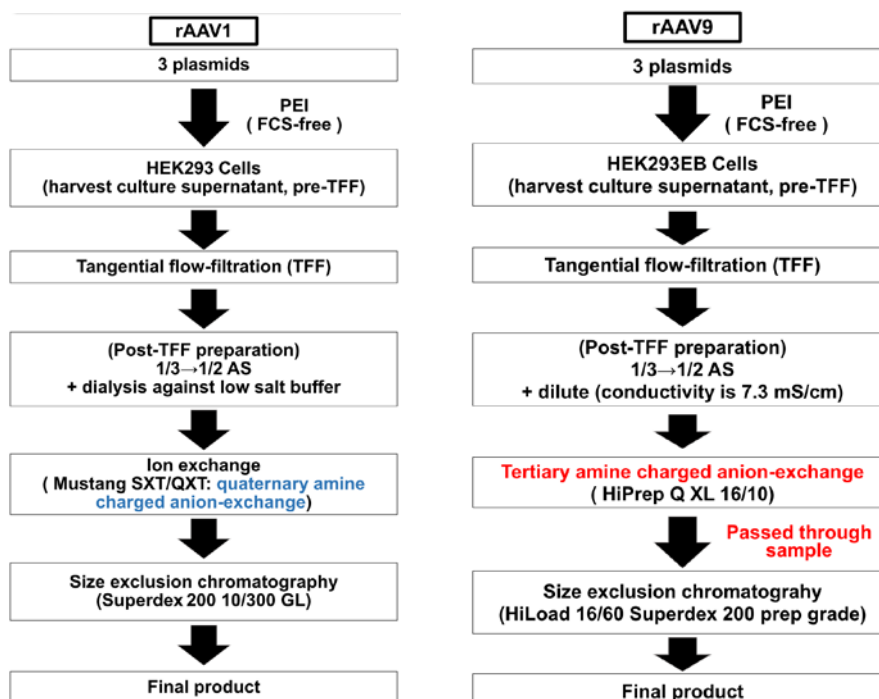
1. 研究開始当初の背景

AAV のウイルス粒子は エンベロープ構造を持たず、それぞれ、分子量が 87, 73, 62 kDa の VP1, VP2, VP3 という三つのウイルス外殻蛋白質であるキャプシド蛋白質, 60 個より構成される正二十面体構造のキャプシドを持っている。最近、組換え AAV ベクターのプロトタイプである AAV2 型以外の血清型 (血清型 1-12 型) AAV の組換えベクターが作成されている。殆どの AAV ベクターのキャプシド蛋白質はどれも構造的に類似しており、プロトタイプの 2 型キャプシドのアミノ酸配列に対して 80 -88 %の相同性, DNA 配列で 78 -82 %の相同性を有する。これら構造的に類似した異なる血清型キャプシド蛋白質の混合状態で、ウイルスを作成すれば、単一の血清型ベクターでは持ち得ない特性を併せ持つ新しい性質の AAV ベクターを作成することが可能であることを Hauck ら (Mol. Ther., 7. 419- 425, 2003)、Rabinowitz ら (J. Virol., 78. 4421-4432, 2004) が報告している。このハイブリッドキャプシド作成方法の優れた点は組換えウイルスのキャプシドを供給するパッケージング・プラスミド同士の単純な混合によって、作成出来ることであり、その混合比率を変えれば、ハイブリッドキャプシドの性質も連続的に変更出来る点にあった。そこで、簡便な精製方法を申請者が既に確立している AAV 1 型および 9 型ベクターに、精製方法が確立されていない (細胞受容体が未だに不明な) 第二世代 (7-8 型、10-12 型) の AAV キャプシドを添加することにより、新たな宿主域を持ったハイブリッド AAV ベクターの作成を試みる予定であった。高価なアフィニティークロマト用カラムを用いるのではなく、従来から使用していたイオン交換樹脂を使用して、AAV 1 型および 9 型ベクターを基本にして、他の血清型ベクターのキャプシドをこれらに付加することにより、新しい機能を持ち、しかも類似した分離条件で精製可能な新しい世代の AAV ベクターを作成・精製をめざした。

2. 研究の目的

安全で、感染効率の高い AAV ベクターの大量調製するため、無血清細胞培養液を用いた異種成分不含 (Xenogenic Free ; xeno-free) 培養システムにて AAV ベクターを作成し、超遠心分離操作を含まない適正製造規範 (GMP) に適合させるために超遠心分離を行うことなく、簡易精製の可能な rAAV の作成系の確立を目的としていた。

3. 研究の方法



本申請の基盤技術として、超遠心分離操作を含まない簡易精製方法の確立が不可欠であり、これまで AAV1、AAV8 および AAV9 ベクターの精製法を確立し、国内外の学会で発表してきた。無血清培養液下の HEK293 細胞へ 3 つのプラスミドを

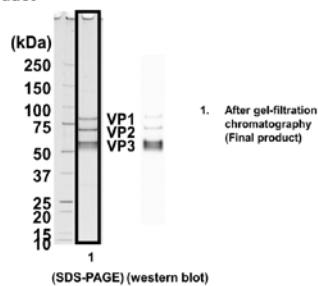
Polyethylenimine (PEI) を用いてトランスフェクションし、rAAV1、および rAAV9 をそれぞれ、細胞培養液中に分泌させます。この細胞培養液を限界排除分子量が 750kDa の Tangential flow filtration (TFF) を用いて低分子量のタンパク質を除去しながら濃縮・精製し、牛胎児血清や 293 細胞由来のタンパク質のコンタミの少ない粗 AAV ベクター分画を得ます。この分画を PBS に溶解し、さらに 1/3 飽和硫酸処理により不要な共存蛋白質を遠心除去後、1/2 飽和硫酸処理により、AAV vector を沈殿させる。沈渣を 3.3mM MES-HEPES-NaOAc, 50mM NaCl および 0.01% Pluronic F-68 含有緩衝液 pH6.5 (以下 MHN) に溶解させた。

AAV1 ベクターは、Mustang SXT/QXT (陽イオン交換カラム+陰イオン交換カラム) に負荷し、不要な共存蛋白質を吸着した Mustang SXT を外し、Mustang QXT に吸着した AAV vector を 50-250mM NaCl の stepwise gradient の塩濃度 (MHN pH8.0+0.01% Pluronic F-68) で溶出させた。限外濃縮したウイルス分画を Superdex 200HR を用いてゲル濾過 (300mM NaCl 含有 MHN pH6.5) を行ってさらに精製した (上図左)。AAV9 ベクターでは、HiTrap Q FF に負荷して、不要な共存蛋白質を吸着させ、その流出液として、ベクターを回収し、最終的にゲル濾過クロマトグラフィーで精製するという方法を確立した (上図右)。ウイルスゲノムとして egfp、luciferase 等、および ウイルスゲノム構造が single strand または double strand であるもの等をそれぞれ作成し、それらの完全長のウイルスゲノムを含む粒子の存在比率等も比較検討し、電子顕微鏡像による中空粒子の存在比率と、analytical ultracentrifugation (AUC) による完全長のウイルスゲノムを含む粒子の存在比率を測定した。

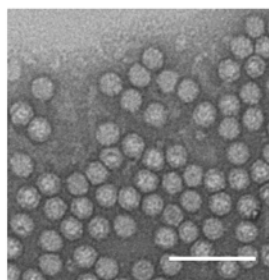
4. 研究成果

図 1 精製 AAV1 ベクター

A. SDS-PAGE (Oriole staining) and western blot (mMAB, B1) analysis of final rAAV1 product



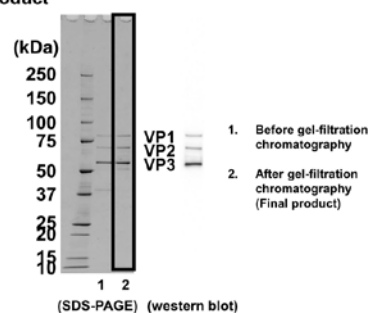
B. Electron microscopic analysis of final rAAV1 product (empty particles = 3.3% (36/1086 particles))



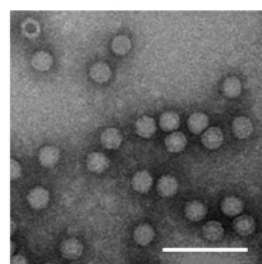
Scale bar = 100 nm

図 2 精製 AAV9 ベクター

A. SDS-PAGE (Oriole staining) and western blot (mMAB, B1) analysis of final rAAV9 product



B. Electron microscopic analysis of final rAAV9 product (empty particles = 2.3% (37/1640 particles))



Scale bar = 100 nm

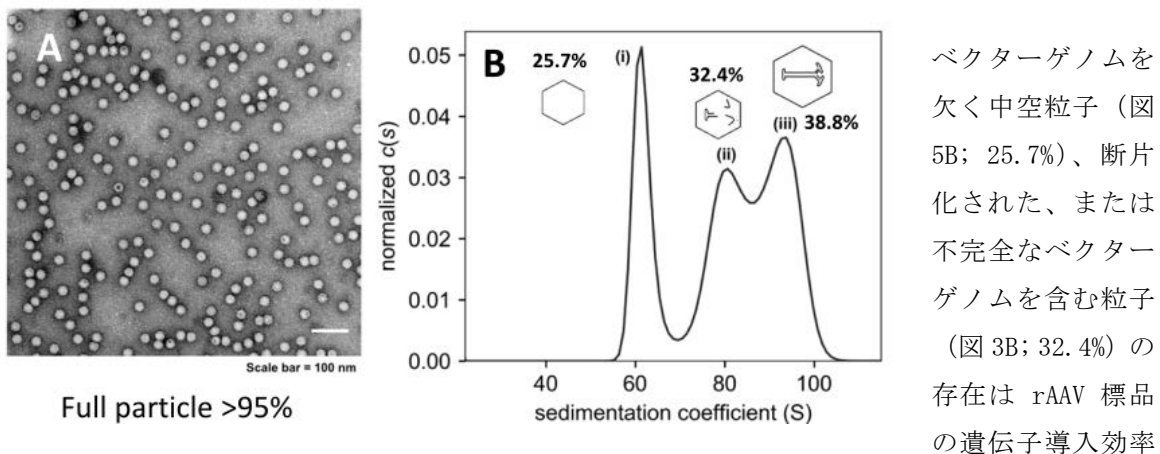
SDS-PAGE 後の蛋白質染色において、精製 type 1 (図 1A) および type 9 (図 2A) AAV ベクターは、共にほぼ VP1, VP2, VP3 の 3 本のバンドのみとなり、十分に精製されたことを確認した。中空キャプシドの存在を電子顕微鏡像によって評価したところ、精製 type 1 (図

1B) および type 9 (図 2B) とともに約 90 %以上の AAV ベクター粒子がウイルス・ゲノムを有している (DNA が capsid に詰まっているもの) と評価され、Mol Ther Methods Clin Dev 11:180-190, 2018 に報告した。

ウイルスゲノムとして egfp、luciferase、およびウイルスゲノム構造が single strand (ss-) または double strand (ds-) であるもの等を用いて上述の方法で作製・精製した AV9 ベクターは、ウイルスゲノム配列に非依存性、ゲノム構造にも非依存性で、それぞれが再現性良く、総力価が $10E+14$ ウイルスゲノム 以上の rAAV9 ベクターを大学実験室レベルの培養施設で調製できた。

Brenda Burnham らは **analytical ultracentrifugation (AUC)** を用いて、従来の作成方法で調製された rAAV 標品には、完全長のウイルスゲノムを含む発現が可能なウイルス粒子があまり存在せず、ウイルスゲノムを含まない中空粒子や断片化された不完全なベクターゲノムを含む発現が不可能であると思われる粒子等、多数の異なるウイルス粒子を含む集合体であること報告している (Human Gene Therapy Methods, 26 (6) 228-242, 2015.)。そこで、電子顕微鏡のネガティブ染色像で中空粒子の混入が少ないと思われていた我々の精製方法で作製した rAAV9 ベクターを解析した (図 3A)。完全長のウイルスゲノムを含む粒子の存在比率 (図 3B; 38.8%) は既報のもの比べ高値を示した。しかし、ベクターゲノムを欠く中空粒子 (図 3B; 25.7%)、断片化された、または不完全なベクターゲノムを含む粒子 (図 3B; 32.4%) の存在も確認した。

図 3 精製 AAV9 ベクター分画の透過電顕像 (A) および analytical ultracentrifugation (AUC) 結果



ベクターゲノムを欠く中空粒子 (図 5B; 25.7%)、断片化された、または不完全なベクターゲノムを含む粒子 (図 3B; 32.4%) の存在は rAAV 標品の遺伝子導入効率を低下させる原因と考えられているため、ウイルスゲノムとして egfp、luciferase 等、およびウイルスゲノム構造が single strand または double strand であるもの等をそれぞれ作成し、それらの完全長のウイルスゲノムを含む粒子の存在比率等も比較検討した。電子顕微鏡像による中空粒子の存在比率と、AUC による完全長のウイルスゲノムを含む粒子の存在比率には明らかに矛盾が生じていた。この矛盾の原因を究明することが、高い感染能力を持つ rAAV の作成方法を確立するための不可欠な情報として、最も重要であると考え。これまでの臨床試験における遺伝子導入効率の低さの原因と考えられるこれらの不純物を AUC を用いて解析しながら、ベクタープラスミド、パッケージングプラスミドの塩基配列の変更、ウイルス産生培養細胞種に改良を加えて、高い完全長のウイルスゲノムを含有する AAV ベクター粒子の比率を高めるための検討を行うことが直近最重要課題であると考え。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

- 1) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;11:180-90, doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015.
- 2) Igarashi, T., Miyake, K., Kobayashi, M., Kameya, S., Fujimoto, C., Nakamoto, K., Takahashi, H., Igarashi, T., Miyake, N., Iijima, O., Hirai, Y., Shimada, T., Okada, T., Takahashi, H. Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Molecular Vision* 2016; 22:816-826.
- 3) Nakamura-Takahashi, A., Miyake K, Watanabe, A., Hirai, Y., Iijima, O., Miyake, N., Adachi K., Nitahara-Kasahara, Y., Kinoshita, H., Noguchi, T., Abe, S., Narisawa, S., Millán, J. L., Shimada, T., Okada, T. Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* 3, 15059; 2016. doi:10.1038/mtm.2015.59.
- 4) Tomono, T., Hirai, Y., Okada, H., Adachi, K., Ishii, A., Shimada, T., Onodera, M., Tamaoka, A., Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* 3, 15058, 2016; doi:10.1038/mtm.2015.58

〔学会発表〕 (計9件)

国際学会

- 1) Taro Tomono, Yukihiko Hirai, Hironori Okada, Yoshitaka Miyagawa, Kumi Adachi, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Akira Tamaoka, Takashi Okada. "Refinements of rAAV8 purification protocol with chromatography technology" The ASGCT 21st annual meeting, 714, Chicago, May 18, 2018.
- 2) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka, A, Okada T. Ultracentrifugation-Free Chromatography-Mediated Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 (rAAV9). The 20th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy May 11, 2017 Washington DC, MD, USA
- 3) Okada H, Tomono T, Adachi K, Hirai Y, Chono H, Okada T. Preliminary examination of rAAV production by combinations of HEK293 derivative, xeno-free media, and cationic polymer or flow electroporation based transfection. The 20th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy May 11, 2017 Washington DC, MD, USA
- 4) Kobayashi M, Igarashi T, Miyake K, Miyake N, Nakamoto K, Hirai Y, Takahashi H, Okada T : Tyrosine-mutated AAV2 (Y730, 500, 444F) mediated BDNF rescued inner retina in rat retinal ischemic injury model. The European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 18 to 21 October 2016, Florence, Italy

国内学会

- 5) Nakamura-Takahashi, A., Ikeue R, Nitahara-Kasahara Y, Watanabe A., Hirai Y., Okada, Kasahara M. Improvement of lethal hypophosphatasia in mice by high level expression of bone targeted alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector. The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. July 26, 2018, Tokyo, Japan
- 6) 増田千明、伴野太郎、宮川世志幸、岡田浩典、平井幸彦、岡田尚巳
イオン交換カラムクロマトグラフィー技術による組換え5型アデノ随伴ウイルスベクター精製方法の開発. ConBio 2017 生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回生化学学会大会) 2017年12月6日、神戸ポートアイランド
- 7) 伴野太郎、増田千明、宮川世志幸、岡田浩典、平井幸彦、石井亜紀子、玉岡晃、岡田尚巳
クロマトグラフィー技術を用いた8型アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV8)の精製 ConBio 2017 生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会、第90回生化学学会大会) 2017年12月6日、神戸ポートアイランド

8) Okada H, Tomono T, Adachi K, Hirai Y, Ouchi M, Utsunomiya Y, Chono H, Mineno J, Okada T. Development of flow electroporation-based suspension-adapted HEK293 transfection system toward rAAV production in GMP The 23rd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. July 20-22, 2017, Okayama, Japan

9) Tomono T, Hirai Y, Okada, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, and Okada T. Chromatography-based rAA9 purification protocol with ultracentrifugation-free procedure. The 23rd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. July 20-22, 2017, Okayama, Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：筋委縮性側索硬化症を含む神経疾患の予防剤及び／又は治療剤

発明者：望月秀樹、長野清一、佐々木勉、鐘其静と、岡田尚巳、平井幸彦

権利者：望月秀樹、長野清一、佐々木勉、鐘其静と、岡田尚巳、平井幸彦

種類：特許

番号：2018-141692

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：