

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02525

研究課題名(和文) 組換え昆虫細胞によるアデノ随伴ウイルスベクター生産のための最適分子設計

研究課題名(英文) Molecular design for adeno-associated virus vector production in recombinant insect cells

研究代表者

山地 秀樹 (Yamaji, Hideki)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：40283874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：宿主として昆虫細胞を用いるもののバキュロウイルスを使用しない、非増殖性の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの新たな生産技術の開発について検討した。AAVの調節タンパク質Repおよびキャプシドタンパク質Capの遺伝子を、プラスミドベクターを用いて昆虫細胞に導入し、Rep・Capタンパク質を発現させた。昆虫細胞で独自に機能するプロモーターと人工イントロンを利用することにより、バキュロウイルスを用いなくとも昆虫細胞を宿主としてAAVベクターを生産可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫細胞-バキュロウイルス系は、AAVベクターの生産性が高い、スケールアップが容易で大量生産に適しているなどの利点を有している。しかしながら、特に遺伝子治療用のウイルスベクターを生産する場合、ベクター粒子とバキュロウイルス粒子の分離が問題となる。本研究では、昆虫細胞で独自に機能するプロモーターと人工イントロンを利用することにより、バキュロウイルスを用いなくとも、昆虫細胞を宿主としてAAVベクターを生産可能であることを明らかにした。宿主として昆虫細胞を用いるもののバキュロウイルスフリーのAAVベクターの生産技術はこれまで報告されおらず、実用的にもきわめて有用である。

研究成果の概要(英文)：A novel production technology for replication-deficient recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors that uses insect cells as host cells but does not use baculoviruses was investigated. The genes for AAV regulatory proteins Rep and capsid proteins Cap were introduced into insect cells using plasmid vectors to express Rep and Cap proteins. By using promoters and artificial introns that independently function in insect cells, we demonstrated that AAV vectors can be produced using insect cells as host cells without the use of baculoviruses.

研究分野：生物化学工学

キーワード：昆虫細胞 組換えタンパク質生産 アデノ随伴ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの遺伝子レベルでの疾患発症メカニズムが解明されつつあり、同定された原因遺伝子に対して介入する治療法として遺伝子治療技術の開発が精力的に進められている。特に、2015年以降欧米を中心として、遺伝子治療薬の承認、市場化が急速に進展している。これに対し、わが国では研究開始当初、承認品目がなく、欧米の後塵を拝していた(内閣官房 健康・医療戦略本部：遺伝子治療の研究開発の推進について、平成30年4月)。

遺伝子治療は、治療に必要な遺伝子を患者の細胞に導入し、発現させることにより疾患を治療する医療技術である。ウイルスの細胞侵入機構を利用するウイルスベクター法は効率の高い遺伝子導入法として主流になっている。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは非病原性のAAVに由来することから安全性が高く、非分裂性細胞にも効率よく遺伝子を導入でき、標的細胞で遺伝子発現が長期間持続する。また、標的細胞の種類に応じて、異なる血清型のAAVベクターを利用できる。これらのことから、遺伝性疾患を対象とした、in vivo法による遺伝子治療を中心にAAVベクターの利用が幅広く検討されている(Felberaum: Biotechnol. J., 10, 702-714 (2015))。しかしながら、AAVベクターは作製法が煩雑で高品質なベクターの大量生産は困難であり、臨床応用のボトルネックとなっていた。これに対し、近年、昆虫細胞-バキュロウイルス系によるAAVベクター作製法が開発が進み、2012年には家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症に対する遺伝子治療薬 Glybera が欧州で承認された。

昆虫細胞-バキュロウイルス系は、昆虫を宿主とするバキュロウイルスに目的遺伝子を組み込み、昆虫細胞に感染させて目的のタンパク質を発現させる。Glyberaの他にも、これまでに本系を用いて製造された複数のバイオ医薬品が実用化されている(山地：生物工学, 94, 76-80, (2016))。昆虫細胞-バキュロウイルス系は、AAVベクターの生産性が高い、スケールアップが容易で大量生産に適しているなどの利点を有している。しかしながら、バキュロウイルスは動植物に感染しないものの、新たに増殖、出芽した組換えバキュロウイルスの除去や不活化が必要となる。また、特に遺伝子治療用のウイルスベクターを生産する場合、ベクター粒子とバキュロウイルス粒子の分離が困難となるなどの課題が残る。

以上の背景を踏まえて、本研究では「バキュロウイルスを用いなくとも AAV ベクターの実用的な高生産系を構築することは可能か?」という問いに答えるべく検討をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫細胞を宿主として用いるもののバキュロウイルスを使用しない AAV ベクターの新たな大量生産技術を開発する。すなわち、バキュロウイルスに依存せずに、AAV ベクターの生成に必要なタンパク質の遺伝子を昆虫細胞に導入し安定・誘導発現を試みる。高品質の AAV ベクターの大量生成には、宿主細胞における AAV の調節・構造タンパク質の発現を適切に制御することが必須となるため、各タンパク質の発現を調節するプロモーターの最適化や人工イントロンの利用などについて検討することにより、組換え昆虫細胞による高生産に向けた AAV ベクターの分子設計を推進する(図1, 3)。

昆虫細胞を宿主として用いるもののバキュロウイルスフリーの AAV ベクターの高生産技術の

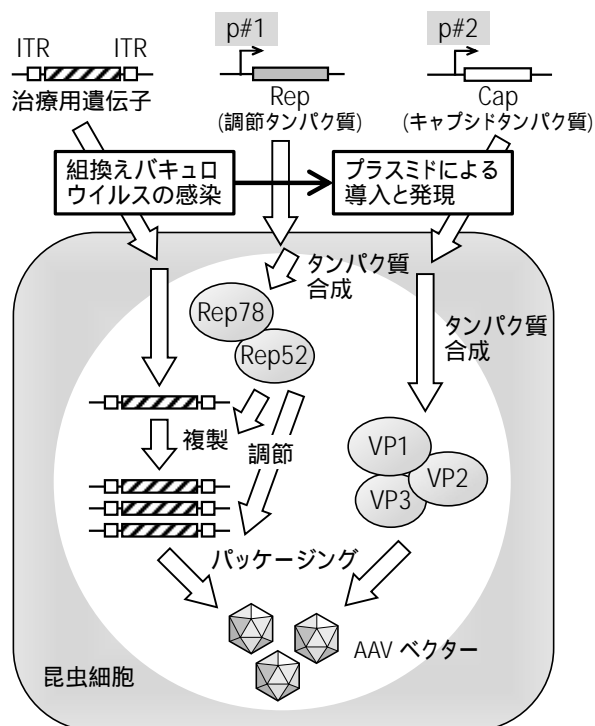


図1 組換え昆虫細胞によるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの生産

2つの ITR (inverted terminal repeat) の間に挿入した治療用遺伝子および AAV の Rep・Cap 遺伝子を宿主細胞で発現させると、非増殖性の AAV ベクターが産生する。バキュロウイルスを用いずにプラスミドによりこれらの遺伝子を昆虫細胞に導入し、安定・誘導発現に向けた検討をおこなう。Rep・Cap 遺伝子の発現を調節するプロモーター (p#1, p#2) は、バキュロウイルスに依存せず昆虫細胞で独自に機能するものを使用する。p#1, p#2 の組み合わせの最適化や人工イントロンの利用を検討し(図3), Rep78, Rep52, VP1, VP2, VP3 の発現レベルを適切に制御することにより、高品質の AAV ベクターを高生産可能な分子設計を推進する。

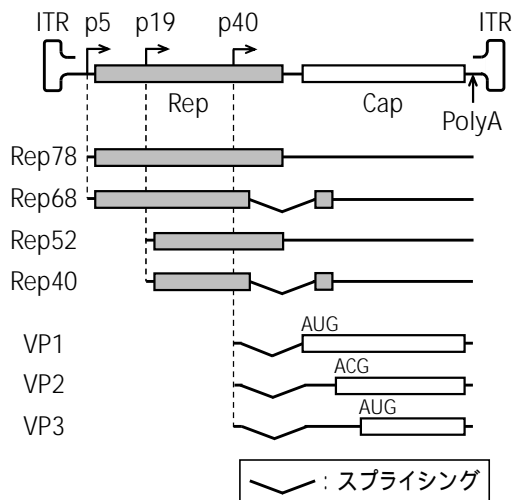


図2 AAVのゲノム構造と転写産物

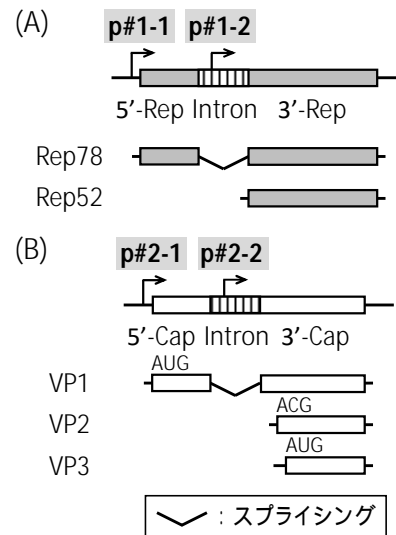


図3 Rep・Capタンパク質の発現と制御

構築はこれまでに報告されておらず、実用的にもきわめて有用である。また、AAVベクターの大量生産には、ベクター粒子の生成に必要なすべての遺伝子を発現するプロデューサー細胞の作製が望ましいが、そのような細胞株の構築の成功は未だ報告されていない。これは、哺乳動物細胞を宿主とした場合、AAVの調節タンパク質による細胞障害性が原因とされる(Sharon and Kamen: *Biotechnol. Bioeng.*, 115, 25–40 (2018))。哺乳動物細胞に比べて昆虫細胞はAAVの調節タンパク質への耐性があること(Chen: *Mol. Ther.*, 16, 924–930 (2008))、また調節タンパク質に1アミノ酸置換の変異を導入すると細胞毒性が低下すること(Schmidt et al.: *J. Virol.*, 74, 9441–9450 (2000))が報告されている。本研究では、昆虫細胞を宿主としたプロデューサー細胞株の構築に向けて基盤となる技術を構築する。

### 3. 研究の方法

AAVはパルボウイルス科デベンドウイルス属に属する一本鎖DNAウイルスである。AAVのゲノムは、両端にITR(inverted terminal repeat)と呼ばれるT字型のヘアピン構造を有する(図2)。このITRはウイルスゲノム複製時のプライマーの役割を果たし、ウイルス粒子へのパッケージングに必要である。ITRの間のDNAの5'末端側には非構造タンパク質、すなわちウイルスDNAの複製やパッケージングに参与する調節タンパク質Repが、3'末端側には構造タンパク質であるキャプシド(Cap)タンパク質がコードされている。また、p5, p19, p40の3つプロモーターが存在し、p5からRep78とRep68のmRNAが、p19からRep52とRep40のmRNAが、p40からはVP1, VP2, VP3のmRNAがそれぞれ転写される(図2)。

AAVベクターの作製に際しては、野生型AAVのゲノムの両端にあるITRの間に治療用遺伝子の発現カセットを挿入する(図1)。一方、ウイルスDNAの複製やウイルス粒子形成に必要なウイルスタンパク質RepおよびCapは、治療用遺伝子とは別に供給する(図1)。これら3種のDNAを宿主細胞に導入し発現させると、非増殖性の組換えAAV(AAVベクター)が産生される(図1)。

AAVベクター作製に必要な遺伝子を昆虫細胞に導入するに際し、バキュロウイルスを用いるのではなくプラスミドベクターを利用し、導入した遺伝子の発現を試みた。野生型AAVのプロモーターp5, p19, p40は昆虫細胞で機能しないため、RepおよびCapの遺伝子の5'に配置するプロモーターp#1, p#2(図1)はバキュロウイルスに依存せず昆虫細胞で独自に機能するものを使用した。ここで、RepのDNAには、その5'末端にプロモーターp#1-1を配置するとともに、プロモーターp#1-2の配列を含む、*Autographa californica*核多角体病ウイルス(AcNPV)由来のIE-1遺伝子のイントロン(Chen: *Mol. Ther.*, 16, 924–930 (2008))を挿入した(図3(A))。スプライシングの結果、同一のDNAからp#1-1によりRep78が、またp#1-2からRep52がそれぞれ発現する。同様に、Cap遺伝子には、その5'末端にプロモーターp#2-1を配置するとともに、プロモーターp#2-2の配列を含むIE-1のイントロンを挿入し、同一のDNAからVP1, VP2, VP3を発現させる(図3(B))。AAV粒子を構成するVP1, VP2, VP3の量論比は1:1:10であり、VP1, VP2, VP3の発現レベルはAAVベクターの遺伝子導入効率などの品質に大きく影響する。また、Rep78, Rep52の発現レベルも、AAVベクターの生産性に影響を及ぼす(Galibert and Merten: *J. Invertebr. Pathol.*, 107, S80–S93 (2011))。このため、Rep78, Rep52およびVP1, VP2, VP3の各々の発現レベルが最適となるように、RepおよびCap遺伝子の発現に用いる4つのプロモーターp#1-1, p#1-2, p#2-1, p#2-2の組み合わせについて比較検討した。また、後述するように、Cap遺伝子に2つの人工イントロンを挿入し、選択的スプライシングを利用してCapタンパク質を発現させることも検討した。このように、本研究では、昆虫細胞で独自に機能するプロモーターと人工イントロンを活用することにより、Rep・Capの各タンパク質の発現レベルを適切に制御し、

高品質の AAV ベクターを高生産可能な技術の開発について検討した。

#### 4. 研究成果

血清型が 2 型の AAV (AAV2) の Rep および Cap タンパク質の DNA をそれぞれ GenBank no. AF043303 および GenBank no. NC\_002077 に記載の塩基配列に基づき全合成した。プラスミドベクターを用いて *Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) に AAV2 の調節タンパク質 Rep およびキャプシドタンパク質 Cap の遺伝子をトランスフェクションし, Rep78, Rep52 および VP1, VP2, VP3 の一過性発現について検討した。ここで, Rep および Cap の DNA には, それぞれ 5'末端側に昆虫細胞で機能するプロモーター p#1-1, p#2-1 を配置するとともに, プロモーター p#1-2, p#2-2 を含む人工イントロンの配列を挿入した (図 3)。プロモーターとして, 昆虫細胞で独自に機能する 6 種類のプロモーターを使用し, 人工イントロンとして, AcNPV の IE-1 遺伝子のイントロン (Chen: Mol. Ther., 16, 924-930 (2008)) を使用し, 2 つのプロモーターの組み合わせについて比較検討をおこなった。

昆虫細胞内で, Rep および Cap の遺伝子に挿入した人工イントロンはスプライシングにより切断・除去され, プロモーター p#1-1, p#2-1 によりそれぞれ Rep78, VP1 が発現した。また, 人工イントロン内に挿入したプロモーター p#1-2, p#2-2 の作用によりイントロンの下流の Rep, Cap 遺伝子が発現し, それぞれ Rep52, VP2・VP3 が産生した。Rep78, Rep52 および VP1, VP2, VP3 の発現レベルは, p#1-2, p#2-2 として用いたプロモーターに応じてそれぞれ変化することがわかった (図 4)。これらのことから, p#1-1 と p#1-2 および p#2-1 と p#2-2 の組み合わせを最適化することにより, Rep78, Rep52 および VP1, VP2, VP3 の発現レベルを昆虫細胞内で適切に制御できる可能性が示唆された。

次に, High Five の細胞内で発現させた Rep タンパク質が機能しており, 2 つの ITR 間に挿入したレポーター遺伝子が細胞内で複製されることを確認した。また, 2 つの ITR 間のレポーター遺伝子と Rep・Cap 遺伝子を High Five にコトランスフェクションし, AAV ベクターの抽出およびベクターゲノムの定量をおこなったところ,  $10^9$  vg/ml 程度の AAV ベクターが生成することがわかった (図 5)。さらに, 緑色蛍光タンパク質である ZsGreen1 の遺伝子をレポーター遺伝子とする AAV ベクターを作製し, 哺乳動物細胞 HEK293T に添加したところ, 細胞が緑色蛍光を発したことから (図 6), 作製した AAV ベクターは HEK293T に感染し, レポーター遺伝子である

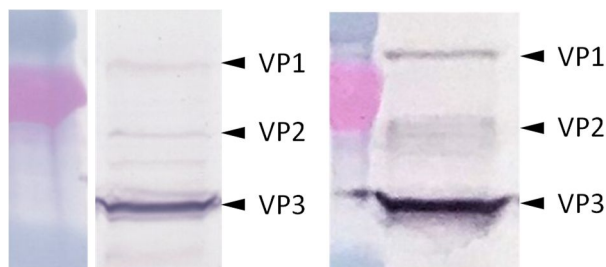


図 4 人工イントロンを 1 つ, プロモーターを 2 つ使用した Cap タンパク質の発現

Western blotting の結果を示す。左右の結果は, Cap 遺伝子の発現に用いた p#1-2 と p#1-1 の組み合わせが異なる。

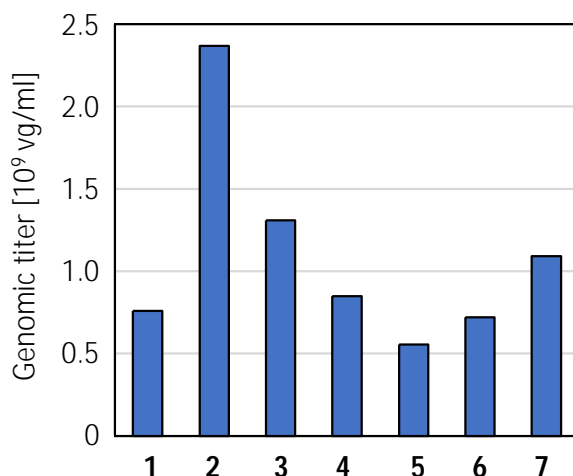


図 5 作製した AAV ベクターの力価

横軸に示す 1~7 は, Cap 遺伝子の発現に用いた p#1-2 と p#1-1 の組み合わせが異なる。

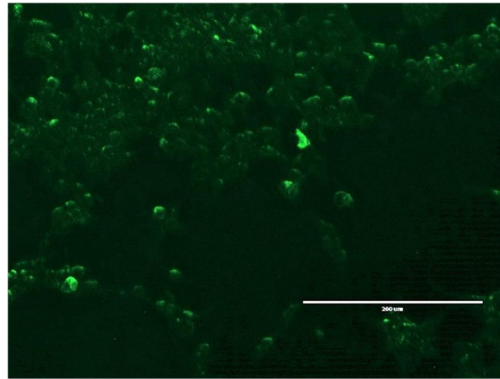


図6 作製した AAV ベクターを添加した HEK293T の蛍光顕微鏡像

ZsGreen1 遺伝子が発現することがわかった。これらのことから、バキュロウイルスを用いなくとも、昆虫細胞を宿主として AAV ベクターを生産可能であることを明らかにした。

次に、Cap 遺伝子に 2 つの人工イントロンを挿入し、選択的スプライシングを利用して VP1, VP2, VP3 の 3 つの Cap タンパク質の発現を試みた。AAV2 の Cap 遺伝子の 5' 側に昆虫細胞で機能するプロモーターを 1 つ配置し、Cap 遺伝子内に 2 つの人工イントロン、すなわちバキュロウイルス由来の IE-1 遺伝子のイントロンと High Five の actin 1 遺伝子のイントロンを挿入した。下流側の actin 1 遺伝子のイントロンについては、5' - , 3' - スプライス部位の配列を変えた複数種のプラスミドを構築した。これらの Cap 遺伝子を Rep 遺伝子および 2 つの ITR 間に挿入したレポーター遺伝子と High Five にコトランスフェクションすると、AAV ベクターを生産できることを見出した。また、下流側の 2 つめの人工イントロンのスプライス部位の配列によって AAV ベクターの生産量が変化し、場合によっては非常に高い生産量が得られることがわかった。作製した AAV ベクターを哺乳動物細胞に添加すると、AAV ベクターは哺乳動物細胞に感染し、レポーター遺伝子が発現することも確認した。これらのことから、Cap 遺伝子に 2 つの人工イントロンを挿入し選択的スプライシングを利用する Cap タンパク質の発現は AAV ベクターの新たな作製法として有効であることが示唆された。

以上のことから、本研究では、バキュロウイルスを用いなくとも、昆虫細胞で独自に機能するプロモーターと人工イントロンを利用することにより、昆虫細胞を宿主として AAV ベクターを生産可能であることを一過性発現において明らかにした。今後は、Rep・Cap 遺伝子の一過性発現において、AAV ベクターの生産が最適となるような人工イントロンやプロモーターの組み合わせについて検討し、適切な条件の絞り込みをおこなう予定である。また、得られた条件に基づき、Rep・Cap 遺伝子を安定発現するパッケージング細胞の作製について検討したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Ohmuro-Matsuyama Yuki, Katsuda Tomohisa, Yamaji Hideki	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of lithium on the secretory production of recombinant antibody from insect cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-018-0303-1	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 -
1. 著者名 Yu Mizote, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji	4. 巻 130
2. 論文標題 Production of an antibody Fab fragment using 2A peptide in insect cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 205-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.03.009	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 -
1. 著者名 Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji	4. 巻 163
2. 論文標題 Production of influenza virus-like particles using recombinant insect cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 107757 (7 p.)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2020.107757	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 -
1. 著者名 Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji	4. 巻 333
2. 論文標題 Production of influenza virus proteins using recombinant insect cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MATEC Web of Conferences	6. 最初と最後の頁 07009 (6 pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1051/mateconf/202133307009	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 Hideki Yamaji, Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda	4. 巻 14 (Suppl 1)
2. 論文標題 Production of influenza virus-like particles in insect cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Proceedings	6. 最初と最後の頁 14-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12919-020-00188-y	査読の有無 無
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 Ryou Nakanuma, Kyoko Masumi-Koizumi, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji	4. 巻 未定
2. 論文標題 Effects of autophagy inducers on recombinant antibody production in insect cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 7 pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-020-00423-6	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hideki Yamaji, Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda
2. 発表標題 Production of influenza virus-like particles in insect cells
3. 学会等名 26th ESACT Meeting (ESACT 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田拓也, 増見恭子, 勝田知尚, 山地秀樹
2. 発表標題 組換え昆虫細胞によるインフルエンザウイルス抗原タンパク質の生産
3. 学会等名 第32回日本動物細胞工学会2019年度大会 (JAACT2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji
2. 発表標題 Production of influenza virus proteins in recombinant insect cells
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田拓也, 増見恭子, 勝田知尚, 山地秀樹
2. 発表標題 昆虫細胞を用いたインフルエンザウイルス様粒子の生産
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Akito Hirose, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji
2. 発表標題 Production of influenza virus-like particles using recombinant insect cells
3. 学会等名 The 33rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2020 Fuchu) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田拓也, 戸上真也, 増見恭子, Prihardi Kahar, 勝田知尚, 山地秀樹
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた遺伝子組換え昆虫細胞の樹立
3. 学会等名 第34回日本動物細胞工学会2021年度大会 (JAACT2021)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 松田拓也, 戸上真也, 増見恭子, Prihardi Kahar, 勝田知尚, 山地秀樹
2. 発表標題 遺伝子組換え昆虫細胞樹立へのゲノム編集技術の応用
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川裕大, 松田拓也, Prihardi Kahar, 勝田知尚, 山地秀樹
2. 発表標題 異種タンパク質を提示するインフルエンザウイルス様粒子の昆虫細胞を用いた生産
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山地秀樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 pp. 135-142 を分担執筆
3. 書名 医薬品モダリティの特許戦略と技術開発動向	

1. 著者名 山地秀樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 pp. 237-243 を分担執筆
3. 書名 バイオリアクターのスケールアップと物質生産事例集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	プリハルディ カハル  (Prihardi Kahar)		

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