

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

アデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した
遺伝子治療法の開発研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 18（2006）年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

アデノ随伴ウイルス (AAV) を利用した 遺伝子治療法の開発研究 -----	1
小澤 敬也	

II. 分担研究報告

1. AAV ベクターによる遺伝子導入に伴う免疫反応 の解析とその制御 -----	8
水上 浩明	
2. AAVS1 の insulator 機能の解析とその応用 -----	11
竹内 隆正	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	15
-----------------------	----

アデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した遺伝子治療法の開発研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 非病原性のアデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した遺伝子導入法の開発が、安全性の観点から注目されており、以下の3つのプロジェクトを実施した。1）新規 AAV ベクター作製法（バキュロウイルスを利用する方法）の実用化開発を行った。平成 17 年度は、8 型 AAV ベクターの作製法の確立を試みた。感染性を維持した 8 型粒子を作製するために VP1 の開始コドンを変更し、通常の方法で作製されるものとほぼ同力価の AAV ベクターとすることができた。また、非分裂細胞への高効率遺伝子導入・長期遺伝子発現といった AAV ベクターの特徴を活かした遺伝子治療法の開発を推進した。例えば、ApoE ノックアウトマウスを用いた遺伝子治療モデル実験で、抗炎症性サイトカイン（IL-10）の体内持続発現による動脈硬化の進展防止とその機序に関する検討を行った。平成 17 年度は主に、培養肝細胞を用いて IL-10 による血清コレステロール値低下作用の分子機構を解析した。網羅的な遺伝子発現解析により、IL-10 が脂質代謝における重要分子に対して多面的に作用することが示唆された。また、AAV ベクターの場合でも、遺伝子導入に伴う免疫反応が問題となっており、遺伝子治療の実用化には、その実態解明と対策が急務である。平成 17 年度は、免疫反応の評価に向けて様々なアッセイ系を確立し、マウスの系での解析を中心に行い、AAV、ベクターの血清型や標的組織による違いを明らかにした。さらに、免疫反応の鍵を握ると考えられる樹状細胞への遺伝子導入効率に関して、AAV の血清型による比較検討を行い、5 型を用いた場合に非常に高い効率が得られることを見出した。2）AAV のユニークな特徴を利用した第 19 番染色体部位（AAVS1）特異的遺伝子組込み法の応用開発を推進した。平成 17 年度は、基礎研究（必要とされる ITR の最小配列を同定する）と間葉系幹細胞（MSC）への応用実験を行った。この技術は、将来的には、ES 細胞や造血幹細胞への応用も可能であり、遺伝子導入に伴う細胞癌化を防ぐ革新的技術となる。3）野生型 AAV ゲノムが組み込まれる AAVS1 の insulator としての新機能に着目し、平成 17 年度は基礎的解析を行った。即ち、AAVS1 内の enhancer blocking 活性に重要な配列を同定し、AP2 がそれらの配列に結合することが分かった。今後、AAVS1 の insulator 配列を搭載したゲノム組込型ウイルスベクターの開発を試み、長期遺伝子発現と安全性向上を目指す計画である。

分担研究者

水上 浩明
自治医科大学医学部
講師

竹内 隆正
国立感染症研究所
研究員

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究で有効性が確認されたものはまだ僅かであるが、遺伝子操作テクノロジーを駆使することにより、既存の方法とは全く異なる新しい角度からの治療法が可能となることから、その開発に大きな期待が寄せられている。また、遺伝子治療用ウイルスベクターの副作用が問題になってきていることから、非病原性ウイルス

の AAV を利用した方法の開発が、安全性の観点から益々注目されている。本研究では、以下の3つのプロジェクトを実施した。

1) 実用性の高い新規 AAV ベクター作製法 (バキュロウイルスを利用する方法) の開発を推進すると共に、筋細胞や神経細胞などの非分裂細胞への高効率遺伝子導入・長期遺伝子発現といった AAV ベクターの特徴を活かした遺伝子治療法の開発を推進した。具体的には、動脈硬化症の成因の一つとして動脈壁における慢性炎症反応が重要であることに着目し、抗炎症性サイトカインの体内持続発現による動脈硬化の進展防止とその機序の解明を目指した実験を行った。生活習慣病の制御は社会的にも大きな課題となっているが、本研究により、遺伝子治療法の開発にとどまらず、その他の分子標的治療法の開発にも役立つ知見が得られるものと期待される。尚、AAV ベクターの場合も、遺伝子導入に伴って惹起される免疫反応が無視できないものであると認識されてきており、遺伝子治療の実用化には、その実態を明らかにし、対策を立てることが急務となっている。特に、AAV ベクターの血清型や標的組織による違いを検討する必要があり、抗原提示細胞への遺伝子導入効率といった観点からの解析も重要であると考えている。平成 17 年度はマウスの系での解析を中心に行った。

2) AAV の二つのコンポーネント (ITR 配列と Rep 蛋白質) を利用した第 19 番染色体部位 (AAVS1) 特異的遺伝子組込み法の応用開発研究を推進した。平成 17 年度は、ITR 配列の解析とそのミニチュア化に向けた基礎研究を行うと共に、再生医療分野で最近脚光を浴びている MSC (mesenchymal stem cell) への応用に向けた基礎実験を行った。本法は遺伝子導入細胞の癌化を未然に防ぐ上で重要な技術であり、将来的には、ES (embryonic stem) 細胞や造血幹細胞への応用も可能な革新的テクノロジーに発展する可能性がある。

3) 野生型 AAV ゲノムが組み込まれる AAVS1 が insulator として機能することを見出しており、平成 17 年度は insulator 活性を持

つ部分の絞り込みと、そこに結合する細胞蛋白質の同定を行った。また、本研究の知見は、AAVS1 の insulator 配列を搭載したゲノム組込型レトロウイルスベクターの開発に活かしていく計画であり、長期に亘る遺伝子発現と安全性向上に繋がることが期待される。

B. 研究方法

1) (i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発 (小澤) : 1 型 AAV ベクター作製方法を確立した場合と同様に、2 型 inverted terminal repeat (ITR) の間に GFP 発現ユニットを持つ組換えバキュロウイルス (GFPbac)、2 型 Rep78、Rep52 を発現するバキュロウイルス (Repbac)、8 型 VP を発現するバキュロウイルス (VPbac) を作製し、同時に昆虫培養細胞 Sf9 に感染させ、3 日後に感染細胞を集め、産生された AAV ベクターを塩化セシウム密度勾配超遠心にて精製した。タイターはリアルタイム PCR にてゲノムコピー数を求めた。また、293 細胞に感染させ、GFP の発現程度を通常法の 293 細胞で作製した AAV ベクターと比較した。

(ii) 欧米型生活習慣によるアテローム性動脈硬化症のモデルとして、高脂血症を来す ApoE ノックアウトマウスを用いた遺伝子治療実験を行った (小澤)。IL-10 発現 AAV1 ベクターの骨格筋への注射により、粥状硬化病変の減少と MCP-1 局所発現の抑制を既に観察しているが、さらに NF- κ B や MAPK の活性化およびアポトーシス誘導作用について検討した。また、培養肝細胞を用いて IL-10 による血清コレステロール値低下作用の分子機構を解析した。即ち、IL-10 を作用させたヒト肝細胞株 HepG2 の遺伝子発現パターンを DNA チップ (GeneChip Human Genome Focus Array、Affymetrix 社) や Q-PCR 法にて解析し、脂質代謝関連遺伝子に対する IL-10 の作用を検討した。

(iii) 免疫反応に関する解析 (水上) : 骨格筋・肝臓・脂肪組織を標的とした AAV ベクターによる遺伝子導入に関して次の検討を行い、それぞれの特徴を明らかにした。(a) 様々な血清型及びプロモーターを用いて AAV

ベクターを作製した。各血清型の AAV ベクターキャプシドに対する抗体の測定法として ELISA 法及び中和抗体の検出法を作製し、関連する諸条件を最適化した。また、様々なマーカー遺伝子の導入により産生される蛋白質やヒト型凝固第Ⅸ因子に対する免疫反応の検出系を作製し、遺伝子導入を行った動物の血清を用いて解析を行った。(b) 抗原提示細胞に対する遺伝子導入・発現効率に関しては、マーカー遺伝子を搭載した各血清型のベクターを作製し、同一条件下で遺伝子導入を行って血清型による違いを比較検討した。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発 (小澤) : MSC のモデルとして骨髄ストローマ細胞由来の細胞株 KM-102 を用い、AAVS1 特異的組込みが可能か検討した。ITR 配列と AAV の複製蛋白質である Rep が AAVS1 特異的組込みに必須の因子であることから、GFP 遺伝子とブラストサイジン S 耐性遺伝子発現カセットを ITR で挟んだプラスミドと Rep 発現プラスミドを KM-102 細胞にトランスフェクションし、ブラストサイジン S 存在下で単一細胞由来のクローンを選別した。得られたクローンからゲノム DNA を抽出しサザン解析を行い、GFP 遺伝子の AAVS1 領域への組込み頻度を解析した。AAVS1 への組込みが認められたクローンでは、挿入部位を PCR 法にて明らかにした。また ITR 配列を徐々に欠失させ、Rep プラスミドと共に 293 細胞にトランスフェクションし AAVS1 への組込み効率を比較した。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析 (竹内) : AAVS1 配列内の insulator 機能を担う配列の絞り込みのために enhancer blocking assay を行った。その後、塩基置換を導入することにより責任配列を同定した。また、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、種々の competitor oligonucleotides や supershift 用抗体を用い、結合蛋白質の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的に

ないと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大で実施するが、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。

C. 研究結果

1) (i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発 : AAV ベクターの産生量は Sf9 細胞あたり 2×10^4 個と、他の血清型の産生量と比べて同程度であった。VP には VP1、VP2、VP3 の 3 種類があるが、ウイルスキャプシドでの構成比は約 1:1:10 となっている。VP1 はベクターの感染性発揮に重要な分子であるが、過剰に発現させるとウイルス粒子形成を阻害する。1、2 型の AAV ベクターを昆虫細胞で作る際、VP1 を至適発現量に制御するため開始コドンを ACG に変え十分量の VP1 の発現が得られていたが、8 型の場合同じ ACG コドンを使用しても VP1 の発現量は十分ではなかった。従って産生された 8 型 GFP ベクターを細胞に感染させても 293 細胞で作製したものに比べて GFP の発現が低かった。そこで開始コドンとして働くことが可能な非 ATG コドンのスクリーニングを行い、CTG コドンからの VP1 合成が一番強いことが分かった。その結果得られた 8 型 GFP ベクターは 293 で作製したものと同程度の GFP を発現することが分かった。

(ii) アテローム性動脈硬化症に関する基礎検討 : リポ蛋白欠乏血清での培養において、IL-10 は濃度依存性に HepG2 細胞内コレステロール量を低下させた。また、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 mRNA の発現が低下していた。スタチンは HMG-CoA 還元酵素の発現は低下させずに酵素活性を阻害するため、スタチンとは異なる分子機構が存在することが示唆された。DNA チップによる網羅的な解析では、脂質代謝関連遺伝子のうち IL-10 刺激により発現が減弱するものとして、他に HMG-CoA synthase および protein kinase B (PKB)/Akt が抽出された。一方、IL-10 刺激により発現が亢進する遺伝子として、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding protein が抽出された。

(iii) 免疫反応に関する解析 : (a) 免疫反応

の解析系として ELISA 法による抗体測定・中和抗体の力価測定法などを確立した。遺伝子導入後に抗体価の上昇が認められることが確認できた。(b)抗原提示細胞への遺伝子導入・発現効率に関して、AAV ベクターの血清型による違いを検討し、5 型由来のベクターを用いた場合に顕著な遺伝子導入・発現が起こるが、1 型ないし 8 型を用いた場合には極めて低いことを見出した。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発：得られたクローン 30 個中 3 個のクローンでサブロット解析より GFP 遺伝子の AAVS1 特異的組込みが認められた。しかもこれら 3 クローンでは AAVS1 領域にのみ GFP 遺伝子が組み込まれており、他の部位には組み込まれていないと考えられた。挿入部位の同定を AAVS1 特異的プライマーと GFP 発現カセット特異的プライマーを用いて試み、3 クローン中 2 クローンで挿入部位が同定でき、AAVS1 領域に組み込まれていることを確認できた。また最小 ITR 配列の同定する実験では ITR をほぼ半分程度に削っても AAVS1 特異的組込み能を保持していることが分かった。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析：AAVS1 の種々の断片を用いた enhancer blocking assay により、①CTAGTATGCCGTGGGG CACCCTCCG と②CCAGCACACCCTGGGGCAGCGCGTG という 2 つの配列が enhancer blocking 活性に必要であるという結果を得た。次に EMSA を行うと、これらの配列への結合成分が HeLa 細胞の核抽出物中に含まれることが分かった。転写因子データベースの検索により結合する候補となる転写因子を選別し、それらに対する抗体を加えて EMSA を行ったところ、抗 AP2 抗体で supershift が見られた。また AP2 結合 consensus oligonucleotide により competition がかったことから、AP2 がこの配列に結合すると考えられた。

C. 考察

1) (i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発：8 型 AAV ベクターの大型動物やヒトでの臨床応用には大量のベクターが必要と予想されることから、バキュロウイルスでの 8 型 AAV ベクター作製法を確立して

おくことは重要である。8 型 AAV ベクターを昆虫細胞で作製することを試みた報告はあるが (Mol. Ther. 12: 1217-25, 2005)、やはり VP1 の発現量が少なく VP1 のみを発現するバキュロウイルスをさらに加えて AAV ベクターを作製している。今回より簡単な作製系を確立するため、一つの VP 遺伝子から至適量の 3 種類の VP 蛋白質を合成することが可能なバキュロウイルスの作製を試み、VP1 の開始コドンを CTG にすることにより、VP1:VP2:VP3 の比が通常の方法で作製した AAV ベクターの場合とほぼ同じになった。更に 293 細胞に感染させて GFP の発現強度を観察したところ、ほぼ 293 細胞で作製したものと遜色ない発現レベルであった。以上のことは昆虫細胞でも 8 型 AAV ベクターを 1、2 型 AAV ベクターと同様に作製することが可能であることを示しており、今後 8 型 AAV ベクターの大量作製の有力な手段となり得る。

(ii) アテローム性動脈硬化症に関する基礎検討：IL-10 の分泌能が低いと脂質代謝異常や 2 型糖尿病の頻度が高くなることが報告されており、炎症や脂質糖代謝異常と動脈硬化の発症と進展は、互いに密接に関連していると考えられる。今回の検討で、IL-10 はコレステロール生合成系酵素の発現を抑制することにより、脂質代謝を制御する可能性が示唆された。また、IL-10 は PPAR binding protein の発現を亢進したが、これにより糖・脂質代謝や脂肪分化を促進する転写因子 PPAR が活性化すれば、インスリン抵抗性や高脂血症を改善する可能性がある。

(iii) 免疫反応に関する解析：AAV ベクターによる遺伝子導入法を用いた動物実験や臨床研究で、免疫反応の重要性を示唆する報告が散見されるようになり、この点の検討と制御法の開発が重要となってきている。今回確立したアッセイ法は、今後の *in vivo* における検討への応用が期待される。また、ベクターに対する中和抗体価に関しても、これまで考えられていた以上に *in vivo* 投与法の効果に影響を及ぼしている可能性があり、更に検討が必要である。

樹状細胞に対する遺伝子導入効果に関しては、5 型とそれ以外を用いた場合とで大き

な開きがあり、この違いが何故起こるのかに関しても大きな興味を持たれる。また、今回はマウス骨髄由来の樹状細胞を用いて検討を行ったが、他の起源を持つ樹状細胞や、ヒトを含めた他の動物種由来の細胞においても同様の所見が得られるかどうか、更に検討を加える必要がある。さらに、*in vivo*における免疫の効果が確認できれば、ワクチン開発など、免疫反応を積極的に利用する領域において役に立つ所見と考えられる。

2) 部位特異的遺伝子組み込み法の開発：骨髄ストローマ由来の細胞株KM-102でAAVS1領域にGFP遺伝子を組み込ませることができた。MSCへの応用として、*ex vivo*で遺伝子を導入し、AAVS1領域にのみ組み込まれたクローンを選別し増殖させ、再び生体に戻す方法が考えられる。本研究の知見は、MSCを利用した再生医療に遺伝子操作を加えていく際に、安全性の観点から役に立つものと期待され、将来的にはES細胞や造血幹細胞への応用も可能である。

3) AAVS1のinsulator機能に関する解析：本年度の研究ではenhancer blocking活性を指標としてAAVS1の機能領域の絞り込みを行った。類似した2つの短い配列が重要であることが分かり、それらはAP2結合部位を含んでいた。遺伝子治療との関連として、長期安定発現に関わるbarrier活性を持つかどうか、また安全性の観点からは組み込み部位近傍の遺伝子発現に対してenhancer blocking活性が有効かどうかを検討することが今後必要になる。

E. 結論

- ・ 8型AAVベクターをバキュロウイルス、昆虫細胞を用いて作製する方法の確立を試みた。感染性を維持した8型粒子を作製するためにVP1の開始コドンを変更し、通常の方法で作製されるものとほぼ同力価のAAVベクターとすることができた。

- ・ 網羅的な遺伝子発現解析により、IL-10が脂質代謝における重要分子に対して多面的に作用することが示唆された。今後、さらに様々な生活習慣病モデルを用いて、効果の検証と作用機構の解析を推進することによ

り、新規治療法の開発が期待される。

- ・ AAVベクターを用いた遺伝子導入における免疫反応に関して解析系を確立した。また、樹状細胞に対する遺伝子導入効率に関して、用いるベクターの血清型によって大きな違いがあることを見出した。

- ・ MSCへの部位特異的遺伝子導入法への確立に向けて、骨髄ストローマ細胞株KM-102でAAVのAAVS1特異的組み込み機構を利用することによりGFP遺伝子を部位特異的に組み込ませることができた。

- ・ AAVS1のinsulator機能のうち、enhancer blocking活性に重要な配列を同定し、AP2がそれらの配列に結合することが分かった。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* (in press)

2) Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* (in press)

3) Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res* (in press)

4) Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T.,

Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* (in press)

5) Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, R.M., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.

6) Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.

7) Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.

8) Liu, Y., Okada, T., Sheykholsami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.

9) Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.

10) Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by

autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-70, 2005

2. 学会発表

1) Urabe, M., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, R.M., Ozawa, K.: Type 1 Rep52 is superior to authentic Rep52 for producing recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. The 8th annual meeting of the American society of gene therapy, Saint Louis MO USA. Jun 1-5, 2005 (*Mol Ther* 11 (suppl 1) pS200)

2) Urabe, M., Nakakura, T., Xin, K.-Q., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, R.M., Ozawa, K.: Type 5 AAV vector genome is more efficiently packaged into type 5 capsids with type 1 Rep52 than authentic Rep52 in insect cells. The 11th annual meeting of the Japan society of gene therapy, Tokyo July 28-30, 2005 (abstracts p53)

3) Ajalli, R., Urabe, M., Soma, M., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Site-specific insertion of therapeutic DNA into the AAVS1 locus (19q13.4) in human mesenchymal stem cells by using adeno-associated virus integration machinery. The 11th annual meeting of the Japan society of gene therapy, Tokyo July 28-30, 2005 (abstracts p 90)

4) Takayuki Ito, Takashi Okada, Hiroshi Miyashita, Mutsuko Sarukawa, Tatsuya Nomoto, Yoshikazu Maeda, Masahisa Shimpo, Keiya Ozawa, Keiji Yamamoto: Prevention of Rat Pulmonary Hypertension by Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Sustained Interleukin-10 Expression. The 78th Annual Scientific Session of American Heart Association, Dallas, November 13-16, 2005. (*Circulation* 2005, 112 suppl II, p99)

5) Takayuki Ito, Takashi Okada, Hiroshi Miyashita, Tatsuya Nomoto, Yoshikazu Maeda, Mutsuko Sarukawa, Masahisa Shimpo, Toru Yoshioka, Takashi Matsushita,

Hiroaki Mizukami, Akihiro Kume, Keiji Yamamoto, Uichi Ikeda, Kazuyuki Shimada, Keiya Ozawa: Protection of Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension by Adeno-associated Virus Vector-mediated Interleukin-10 Expression. Annual Scientific Session of American Society of Gene Therapy, St. Louis, June 1-5, 2005. (Molecular Therapy 2005, vol11 suppl1, S239)

6) Ito, T., Okada, T., Sarukawa, M., Yoshioka, T., Maeda, Y., Miyashita, H., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., Yamamoto, K., Ozawa, K., Shimada, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic expression of interleukin-10 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Cytokines and Inflammation, San Francisco, January 27-28, 2005.

7) Mutsuko Sarukawa, Takashi Okada, Toru Yoshioka, Takayuki Ito, Masahisa Shimpo, Tatsuya Nomoto, Keiji Yamamoto, Uichi Ikeda, Keiya Ozawa, Kazuyuki Shimada: Prevention of hypertension and heart failure in Dahl salt-sensitive rats by AAV vector-mediated interleukin-10 expression. The 78th Annual Scientific Session of American Heart Association, Circulation 112 (Suppl II): 125, 2005.

8) Mutsuko Sarukawa, Takashi Okada, Toru Yoshioka, Tatsuya Nomoto, Takayuki Ito, Yoshikazu Maeda, Masahisa Shimpo, Takashi Matsushita, Hiroaki Mizukami, Kuniko Shimazaki, Akihiro Kume, Keiji Yamamoto, Uichi Ikeda, Kazuyuki Shimada, Keiya Ozawa: Intramuscular Administration of AAV Vector Expressing Interleukin-10 in Dahl Salt-Sensitive Rats Prevents the Development of Hypertensive Heart Disease. American Society of Gene Therapy's 8th Annual Meeting, Molecular Therapy 11(Suppl 1): S363, 2005.

9) Okada, T., Sarukawa, M., Ito, T.,

Matsushita, T., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Effective purification of adeno-associated virus vectors by disposable ion exchange membranes. The 8th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, June 1-5, 2005, St. Louis, MO, USA (Mol Ther 11: S337, 2005)

10) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Sheykholeslami, K., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Protection against Aminoglycoside-Induced Ototoxicity by AAV Vector-Mediated GDNF Gene Transfer into the Cochlea. The 8th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, June 1-5, 2005, St. Louis, MO, USA (Mol Ther 11: S256, 2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 発明の名称：

1. 特許

1. 岡田尚巳、小澤敬也：ウイルス中空粒子の迅速除去および精製方法、特願 2005-314476、平成 17 年 10 月 28 日出願
2. 岡田尚巳、小澤敬也：ベクター産生型間葉系幹細胞（出願準備中）

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

AAVベクターによる遺伝子導入に伴う免疫反応の解析とその制御

分担研究者：水上浩明 自治医科大学分子病態治療研究センター
遺伝子治療研究部 講師

研究要旨 遺伝子導入に関連した免疫反応の評価に向けて様々なアッセイ系を確立し、導入遺伝子の発現との関連を検討した。また、免疫反応の鍵を握ると考えられる樹状細胞への遺伝子導入効率に関して、AAVの血清型による比較検討を行い、5型を用いた場合に非常に高い効率が得られることを見出した。

A. 研究目的

AAVベクターによる遺伝子導入法は有用性が高く様々な応用が期待されているものの、研究の進展につれて遺伝子導入に伴う免疫反応が無視できないことが明らかになってきており、この現象の解明とその制御が重要になりつつある。そこで免疫反応を抑えつつ効果が期待できる条件を探索するために、遺伝子導入に伴う免疫反応並びに抗原提示細胞に対する遺伝子導入効率に関して比較検討を行った。

B. 研究方法

1. ベクター構築と標的組織における効果：標的とする組織に最適もしくはそれに近いと考えられている構築のAAVベクターを作製し、骨格筋、肝臓・脂肪組織を標的とした *in vivo* 投与を行って効果を判定した。

2. 免疫反応の解析系：各血清型のAAVベクターキャプシドに対する抗体の測定法としてELISA法及び中和抗体の検出法を作製し、関連する諸条件を最適化した。また、様々なマーカー遺伝子の導入により産生される蛋白質やヒト型凝固第IX因子に対する免疫反応の検出系を作製し、

遺伝子導入を行った動物の血清を用いて解析を行った。

3. 抗原提示細胞に対する遺伝子導入・発現効率に関しては、マーカー遺伝子を搭載した各血清型のベクターを作製し、同一条件下で遺伝子導入を行って血清型による違いを比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性のAAVに由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。

C. 研究結果

1. 各標的組織に対して有用なベクター構築の検討を行い、大まかな結論を得た。骨格筋に対しては1型、肝臓には8型由来のキャプシドを利用したベクターが最も有用であった。8型由来のベクターは脂肪組織を標的とした場合にも顕著な効果が認められたが、発現の主体は肝臓であり、脂肪組織自体における発現は

弱かった。骨格筋を標的とした場合にも同様に肝臓における発現が強く認められた。

2. 免疫反応の解析系としてELISA法による抗体測定・中和抗体の力価測定法などを確立した。遺伝子導入後に抗体価の上昇が認められることが確認できた。

3. 抗原提示細胞への遺伝子導入・発現効率に関して、AAVベクターの血清型による違いを検討し、5型由来のベクターを用いた場合に顕著な遺伝子導入・発現が起こるが、1型ないし8型を用いた場合には極めて低いことを見出した。

D. 考察

これまで AAV ベクターを用いた場合には免疫反応が起こりにくいものと考えられていたが、これは主にアデノウイルスベクターを用いた場合との比較によるものであり、反応が全く見られないということではない。近年動物実験又は臨床研究において AAV ベクターを用いた遺伝子導入法においても免疫反応の重要性を示唆する報告が散見されるようになり、治療法の有効性を確保するためにもこの点の検討と制御が肝要と考えられる。今回関連する要素を検出・定量する方法が確立できたことから、今後 *in vivo* における検討への応用が期待でき、免疫反応を制御するための方法の開発などに役立つものと期待される。また、ベクターに対する中和抗体価に関しても、これまで考えられていた以上に *in vivo* 投与法の効果に影響を及ぼしている可能性があり、更に検討が必要である。

標的組織による免疫反応の違いに関しては、高発現が期待できる8型由来のベクターを用いた場合には骨格筋・脂肪のいずれを標的にしても主に肝臓において導入遺伝子の発現が起こっていることが判明し、免疫反応に関する厳密な検討には適さなかったことから予定した結論は得られなかった。これは8型のベクター

に著しい肝臓への特異性があるためと思われる。まだ感染に関連する分子は知られていないが、8型由来のベクターを用いた治療法を実用化していく上で重要な知見と考えられる。

樹状細胞に対する遺伝子導入効果に関しては、5型とそれ以外を用いた場合とで大きな開きがあり、この違いが何故起こるのかについても大きな興味を持たれる。5型の感染に関連する分子としてPDGFレセプターが知られており、この分子の発現状況で説明できる可能性があるため現在検討を行っている。いずれにしても現段階で有用性が期待されている1型、8型などの血清型では強い免疫反応が起こり難いことが示唆されることから、安心して応用開発を進めることにつながる成果といえる。また、今回はマウス骨髄由来の樹状細胞を用いて検討を行ったが、他の起源を持つ樹状細胞や、ヒトを含めた他の動物種由来の細胞においても同様の所見が得られるかどうか、などにつき更に検討を加える必要がある。また、*in vivo* における免疫の効果が確認できれば、ワクチン開発などの免疫反応を積極的に利用する領域において役に立つ所見と考えられ、この観点からの検討も今後進めていきたいと考えている。

E. 結論

AAV ベクターを用いた遺伝子導入と免疫反応に関して解析系を確立した。また、樹状細胞に対する遺伝子導入効率に関して、用いるベクターの血清型によって大きな違いがあることを見出した。今後このような成果を応用することで遺伝子導入に伴う免疫反応の解析や制御につながり、より有効な遺伝子治療法の樹立に向けて有用な情報となることが期待される。

G. 研究発表（原著論文）

Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T.,

Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med (in press)*

Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther (in press)*

Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res (in press)*

Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther (in press)*

Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.

Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.

Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki,

K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.

Liu, Y., Okada, T., Sheykholslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.

Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.

Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-70, 2005.

H. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

AAVS1 の insulator 機能の解析とその応用

分担研究者 竹内 隆正 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第一室 研究員

研究要旨 野生型 AAV の特異的組込み領域である AAVS1 の insulator 機能の基礎的解析を行った。enhancer blocking 活性に重要な配列を同定し、AP2 がそれらの配列に結合することが分かった。また AP2 結合能を失うような変異配列は enhancer blocking 活性も失っていた。AAVS1 の insulator 機能解析は野生型 AAV の生活環解明に役立つとともに、有効性・安全性を高めたウイルスベクターへの応用が期待される。

A.研究目的

野生型 AAV はヒト 19 番染色体長腕の AAVS1 という領域に部位特異的に組込まれることが知られており、それに必要な配列も明らかになっている。ウイルスの生活環から見た AAVS1 への組込みの意義は未詳であるが、必要に応じてウイルスのゲノム複製や粒子形成が起こるためには、ヒトゲノム上で不活化されにくい領域であると推測され、実際に AAVS1 が insulator として機能することを見出した。

本研究ではまず insulator 機能を担う配列の絞り込みと、そこに結合する細胞蛋白質の同定を行い、AAVS1 の insulator 機能を解明することを目的とする。さらに遺伝子治療用ウイルスベクターからの安定した長期にわたる遺伝子発現並びに組込み部位近傍への影響を抑えた安全性の高いウイルスベクター開発に応用することを目指す。

野生型 AAV の生活環には未知の部分が多く、AAVS1 の機能解析は AAV ベクター全般の安全性研究の観点からも意義がある。遺伝子発現制御に関わる新たな要素を単離することは生命現象の理解全般に大いに役立つとともに

に、実用的には遺伝子治療の有効性を高めることが期待できる。

B.研究方法

AAVS1 内の insulator 機能を担う配列の絞り込みのために enhancer blocking assay を行った。この assay はホタルとウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子の発現カセットを搭載したプラスミドを 293 細胞に導入した後、Epstein-Barr ウイルスの EBNA1・oriP の系を用いてプラスミドを複製させ、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性比を測定するものである。試験配列をホタルルシフェラーゼ側のエンハンサーとプロモーターの間に挿入した場合のルシフェラーゼ活性比の変化に基づき enhancer blocking 活性を評価した。

insulator 配列への結合蛋白質の同定のために、enhancer blocking assay により 30 塩基弱の範囲まで絞り込みがかかった時点で electrophoretic mobility shift assay(EMSA)を行った。種々の competitor oligonucleotides や supershift 用抗体を加えた EMSA を行うことで、結合蛋白質の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本年度の研究では臨床材料・動物等を扱うことはなかったため、特に注意すべき点はなかった。

C. 研究結果

AAVS1 の種々の断片を用いた enhancer blocking assay により、

①CTAGTATGCCGTGGGGCACCCCTCCG

②CCAGCACACCCTGGGGCAGCGCCGTG

という2つの類似した配列が enhancer blocking 活性に必要であるという結果を得た。これらの配列内の下線部分の塩基を AT に置換すると enhancer blocking 活性は失われた。

次にこれら2つの配列を probe として EMSA を行うと、HeLa 細胞の核抽出物中に結合成分が含まれることが分かった。またこれらの配列は互いに competitor となることから同一の成分が結合すると考えられた。

転写因子データベースの検索により結合する候補となる転写因子を選別し、それらに対する抗体を加えて EMSA を行ったところ、抗 AP2 抗体のみで supershift が見られた。また AP2 結合 consensus oligonucleotide により competition がかったことから、AP2 がこの配列に結合すると考えられた。

また enhancer blocking 活性を失った上記の変異配列は EMSA において核抽出物との結合能を失っていた。

D. 考察

本年度の研究では enhancer blocking 活性を指標として AAVS1 の機能領域の絞り込みを行った。類似した2つの短い配列が重要であることが分かり、それらは AP2 結合部位を含んでいた。置換変異体との比較から EMSA での AP2 結合能と enhancer blocking 活性の間に相関があるように思われ、細胞内での結合状態の

解析を試みる必要がある。

遺伝子治療との関連として、有効性の観点からは長期安定発現に関わる barrier 活性を持つかどうか、また安全性の観点からは組込み部位近傍の遺伝子発現に対して enhancer blocking 活性が有効かどうかを検討することが必要になる。これらの課題に対してはゲノム上に組込んだ状態での解析が不可欠であり、レンチウイルスベクターを用いた実験系を構築中である。

E. 結論

AAVS1 の insulator 機能のうち、enhancer blocking 活性に重要な配列を同定し、AP2 がそれらの配列に結合することが分かった。AP2 結合能と enhancer blocking 活性の間に相関があるように思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori S, Takeuchi T, Enomoto Y, Kondo K, Sato K, Ono F, Iwata N, Sata T and Kanda T. Biodistribution of Intravenously Administered AAV-2, 10, and 11 Vectors in Cynomolgus Monkeys. (投稿中)

2. Ogata T, Takeuchi T and Kanda T. Sequence elements critical for enhancer blocking activity of AAVS1: possible interaction with AP-2. (投稿準備中)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Urabe, M., Xin, K.Q., Obara, Y., Nakakura, T., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Okuda, K., <u>Ozawa, K.</u>	Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression.	Mol Ther.	in press		2006
Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Kobayashi, E., and <u>Ozawa, K.</u>	A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells.	Mol. Ther.	in press		2006
Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Kotin RM, and <u>Ozawa, K.</u>	Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells.	J. Virol.	80	1874-1885	2006
Li, X.G., Okada, T., Kodera, M., Nara, Y., Takino, N., Muramatsu, C., Ikeguchi, K., Urano, F., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., Nakano, I., <u>Ozawa, K.</u> , and Muramatsu, S.	Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease.	Mol Ther.	13	160-166	2006
Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u> , and Saito, T.	Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector.	Hum. Gene Ther.	16	1413-1421	2005
Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., <u>Mizukami</u> <u>H.</u> , Kume, A., and <u>Ozawa</u> <u>K.</u>	Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing.	Hum. Gene Ther.	16	1212-1218	2005

<p>Liu, Y., Okada, T., Sheykholeslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., <u>Mizukami, H.</u>, Kume, A., Ichimura, K., and <u>Ozawa, K.</u></p>	<p>Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector.</p>	<p>Mol. Ther.</p>	<p>12</p>	<p>725-733</p>	<p>2005</p>
<p>Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., <u>Mizukami, H.</u>, Muramatsu, S., <u>Ozawa, K.</u>, Saido, T.C., Arai, H., and Sasaki, H.</p>	<p>Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease.</p>	<p>Ann. Neurol.</p>	<p>57</p>	<p>832-842</p>	<p>2005</p>
<p>Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K.Q., Okuda, K., <u>Mizukami, H.</u>, <u>Ozawa, K.</u>, and Koshino, T.</p>	<p>Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector.</p>	<p>Arthritis Rheum.</p>	<p>52</p>	<p>164-170</p>	<p>2005</p>

研究成果の刊行物・別刷

Removal of Empty Capsids from Type 1 Adeno-Associated Virus Vector Stocks by Anion-Exchange Chromatography Potentiates Transgene Expression

Masashi Urabe,^{1,*} Ke-Qin Xin,² Yoko Obara,¹ Takayo Nakakura,¹ Hiroaki Mizukami,¹ Akihiro Kume,¹ Kenji Okuda,² and Keiya Ozawa¹

¹Division of Genetic Therapeutics, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Tochigi 329-0498, Japan

²Department of Molecular Biodefense Research, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Yokohama 236-0004, Japan

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +81 285 44 8675. E-mail: murabe@jichi.ac.jp.

Production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) results in substantial quantities of empty capsids or virus-like particles (VLPs), virus protein shells without the vector genome. The contaminating VLPs would interfere with transduction by competing for cell-surface receptors and, when administered *in vivo*, contribute to antigen load, which may elicit a stronger immune response. Density-gradient ultracentrifugation provides a means to separate VLPs from rAAV particles, but is not feasible for large-scale preparations of vectors. Since the compositions of the VLP and vector differ by the single-stranded DNA genome, we hypothesized that the isoelectric point of the vector may differ from that of the VLP. In an attempt to separate type 1 rAAV particles from VLPs by ion-exchange chromatography, we tested a number of buffer systems and found that trimethylammonium sulfate, or $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$, effectively separated rAAV1 particles from VLPs. The rAAV1-GFP chromatographically separated from VLPs induced stronger GFP expression in HEK293 cells than rAAV1-GFP contaminated with VLPs. The transduction of mouse muscles with rAAV1-SEAP (secreted form of alkaline phosphatase) isolated from VLPs also showed higher serum SEAP levels than rAAV1-SEAP with VLPs. These results suggest that chromatographic separation of rAAV1 from empty capsids increased the efficacy of rAAV1.

Key Words: AAV vector, empty capsid, antichaotropic ion, chromatography

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is one of the promising gene transfer vectors and efficiently transduces neurons, hepatocytes, and skeletal muscle in rodent, dog, and nonhuman primate models [1]. AAV vectors produced with serotype 1 capsid protein transduce skeletal muscles particularly well compared to serotypes 2, 4, 5, and 6 [2]. Obtaining clinically meaningful levels of a therapeutic protein depends on several factors, including the amount of particles administered. A human clinical trial using rAAV2 expressing coagulation factor IX (up to 10^{13} particles/kg) in hemophilia B patients has been conducted, resulting in a partial, but transient, amelioration of symptoms. Thus, extrapolating from these earlier studies, more than 10^{15} particles of rAAV2 would be required for the complete correction of hemorrhagic tendency [3]. Using serotypes with higher biological activities may reduce the dose; even so, large animal studies comparing the efficacy of rAAV1 and other serotypes indicated that large particle numbers of

rAAV1 would still be required for human application [2,4].

rAAV is usually produced by plasmid transfection of HEK293 cells with two or three plasmids: AAV helper plasmid encoding *rep* and *cap* genes devoid of inverted terminal repeat (ITR) sequences, AAV vector plasmid harboring the therapeutic gene between the ITRs, and a plasmid containing a minimal set of adenovirus helper genes, E2A, VARNA, and E4orf6. Since the structural and nonstructural genes, as well as the *cis*-acting elements of AAV type 1 and AAV type 2, are highly conserved, it is possible to package the gene of interest between the type 2 ITRs into the coexpressed type 1 capsid [5], which is composed of VP1, VP2, and VP3 polypeptides with a stoichiometry of 1:1:10. In transfected HEK293 cells, the expression of the three structural proteins forms virus-like particles (VLPs) or empty capsids independent of vector DNA replication and packaging. The maturation of particles occurs during vector DNA replication and

particles with vector genomes appear [6]. However, the fraction of VLPs that acquire vector DNA remains a minor component of the total particles in the cell. The ratio of empty to filled particles can range from 10:1 to 4:1 [7,8]. Without a DNA payload, the presence of VLPs in the rAAV stocks would diminish the effect by competing for cell-mediated processes, such as receptor binding and uptake, as well as providing a source of antigen that may elicit a stronger immune response *in vivo* against AAV vectors [9]. It is therefore desirable to eliminate empty capsids from rAAV vector stocks. The only established method to isolate rAAV from empty capsids is density gradient ultracentrifugation using CsCl or other density materials, which relies on the difference in the buoyant density between DNA-filled and empty particles. However, ultracentrifugation is not readily adaptable to the large-scale preparation of rAAV, especially for clinical grade material. In addition to density gradient centrifugation, other physicochemical differences may lead to exploitable processes for separating VLPs from vector particles. Although affinity column chromatography does not distinguish between vector and VLP, the process is scalable and also provides a higher level of purification than CsCl ultracentrifugation [7,10,11]. In addition, chromatography can preserve more infectious rAAV particles [10].

All members of the *Parvoviridae* are structurally similar and have linear, single-stranded DNA genomes. It is possible that the presence of encapsidated DNA alters the isoelectric point (*pI*) of the AAV particles. We postulated that if the *pI* of rAAV differs from that of the empty capsid, then rAAV separation from empty capsid is possible using high-resolution chromatography.

For starting materials, we used empty and filled rAAV1 particles independently obtained by CsCl density ultracentrifugation and subsequent chromatography, as described in the Fig. 1 legend. We characterized each type of particle by density, DNA content, protein composition, and biological activity (data not shown). We confirmed the purity of rAAV or empty particles by silver staining of the samples resolved on an SDS-PAGE gel (Fig. 1A). We examined the elution profile of rAAV1 containing the green fluorescent protein (GFP) gene and type 1 empty capsid on a high-resolution anion-exchange column, Mini Q 4.6/50 PE (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Full rAAV particles, equivalent to 5×10^{10} vector genomes (vg), or an equivalent quantity of empty particles, were bound to the column in a low-salt buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM NaCl, and 4% glycerol; they were eluted with a linear 20–300 mM NaCl gradient at pH 8.4. Although there is overlap at the base of the peaks, Fig. 1A shows that the empty particles (broken line) eluted at a lower salt concentration than rAAV (solid line). While the resolution of the empty and filled particle fractions was not optimal, the ability to elute the two types of particles selectively was a very encouraging result. To increase the resolution of the eluted particle peaks, we surveyed an

extensive range of elution buffers and found that the use of so-called antichaotropic ions, such as NH_4^+ , $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$, PO_4^{3-} , and SO_4^{2-} , was capable of resolving rAAV from empty capsids better than using NaCl gradients. Fig. 1B shows a representative chromatogram of the mixture of rAAV1-GFP particles and VLPs eluted with a linear 20–300 mM Na^+ or $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ gradient. Among the buffers we tested, $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$ or trimethylammonium sulfate most effectively separated the rAAV particles (F) from empty capsids (E). We also examined a weaker anion, $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$, for the separation of rAAV, which more efficiently separated the rAAV particles from empty capsids. However, the solution containing $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$ was viscous and disrupted the rAAV particles. NH_4^+ also isolated rAAV1 from empty particles. The ammonium ion, however, is volatile at high pH and the ammonium solution is not stable over time.

The pH of the buffers is also important for chromatography. The elution of rAAV and empty particles at different pH is shown in Fig. 1C. We loaded the mixture of purified rAAV and empty particles onto the column and eluted them with a linear 20–300 mM $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ gradient at pH 7.5, 8.0, 8.5, or 9.0. The separation of the two peaks was better at pH 8.5 or 9.0 than at lower pH. Since the empty and filled AAV particles are unstable at a higher pH [12], we used buffers at pH 8.5 in the subsequent experiments.

Our final goal was to develop a chromatographic method for the purification of a large quantity of type 1 rAAV particles free of empty particles. We next tested the separation of approximately 10^{13} vg of rAAV1-GFP from empty particles. We produced rAAV particles and released them from HEK293 cells, as described in the legend to Fig. 1. After low-speed centrifugation, we again centrifuged the cleared cellular lysate for 10 min at 30,000g at 4°C and filtered the supernatant through 0.45- and 0.2- μm membrane filters. We diluted the lysate four times with a dilution buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl_2 , and 4% glycerol and loaded it onto a 10-mm \times 60-cm Tricorn column (Amersham Biosciences) packed with POROS HQ 50- μm medium (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). rAAV1 was eluted with a linear 50–400 mM NaCl gradient (250 ml). We collected the fractions containing rAAV1 and diluted them threefold with the dilution buffer and loaded them onto the second anion-exchange column (5 mm \times 10 cm) packed with POROS HQ 10- μm matrix (Applied Biosystems). The rAAV1 was again eluted with a linear 50–400 mM NaCl gradient (25 ml). We further purified the rAAV1 by gel filtration column chromatography, as described in the Fig. 1 legend. We mixed the fractions containing rAAV together and diluted them with 4 volumes of the dilution buffer and loaded them onto a high-resolution column (5 mm \times 20 cm) filled with POROS HQ 10- μm equilibrated with 25 mM *N*-methyl diethanolamine (pH 8.5) and 10 mM $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$. Bound viral particles were eluted

with a 10–125 mM $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$ gradient over 38 ml at a flow rate of 0.5 ml/min. A representative chromatogram (Fig. 2A) shows that the two peaks were observed as expected. The peak that appeared earlier or later corresponded to empty capsids or rAAV particles. The analysis of each fraction by Western blotting with an anti-type 5 VP antibody, which was cross-reactive with type 1 VP

protein (middle), revealed that the first, larger peak contained much more AAV VP protein (fractions 19 through 22). The second, smaller peak also contained VP protein, although the amount was smaller (fractions 23 through 26). Quantification using real-time PCR indicated that the majority of rAAV vector genome was in fractions 23 through 26 (bottom), corresponding to the second peak fractions. Electron microscopy of a sample from the pooled peak fractions confirmed that the earlier peak corresponded to empty capsids and the later one corresponded to rAAV particles (insets in Fig. 2A). Since a single run was not sufficient to separate completely the empty from the full capsids, we repeated the high-resolution chromatography step. After the first separation, more than 90% of contaminating empty capsids was removed. The second run was able to eliminate empty particles further and we obtained a rAAV stock with less than 5% empty particles. Table 1 summarizes the recovery of rAAV1 particles after high-resolution column chromatography for the removal of empty particles. After two rounds of chromatography, we were able to recover approximately 50% of rAAV1-GFP.

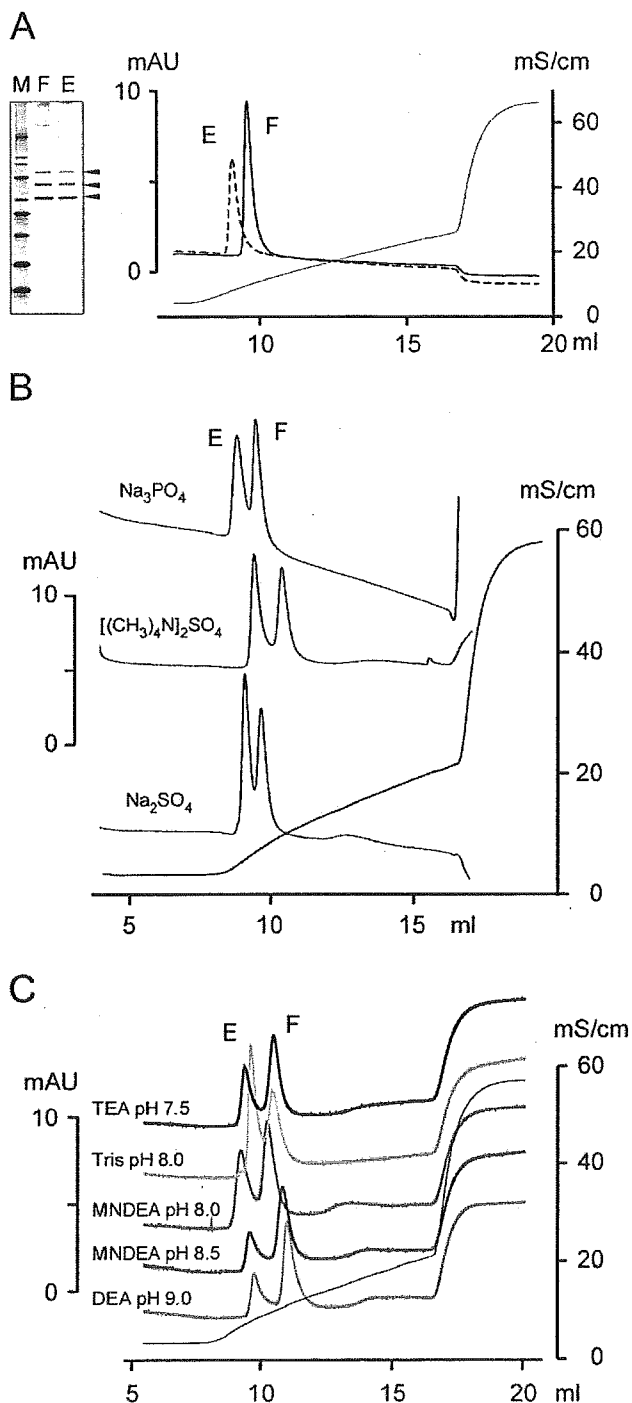


FIG. 1. (A) Elution profile of DNA-filled or rAAV1 and empty particles on a high-resolution anion-exchange column. For the production of rAAV1-GFP, HEK293 cells at 80% confluency (approximately 10^5 cells/cm²) in a 225-cm² flask were cotransfected with 26.7 μg of an AAV vector plasmid harboring a humanized GFP gene (Stratagene, Palo Alto, CA, USA) under the control of the cytomegalovirus immediate early gene promoter (CMV) between the type 2 ITRs, 26.7 μg of an AAV1 helper plasmid carrying type 2 *rep* and type 1 *cap* genes [5], and 26.7 μg of an adenovirus helper plasmid using the calcium precipitation method. Two days after transfection, the cells were pelleted by centrifugation and lysed in 2 ml (per 225-cm² flask) of lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (Merck, Darmstadt, Germany), 60 U/ml benzonase (Merck)) and incubated at 37°C for 30 min. After low-speed centrifugation, solid CsCl was added to the lysate to produce a buoyant density of 1.36 g/cm³ and the samples were centrifuged for 24 h at 36,000 rpm at 21°C in a SW40Ti rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). rAAV1-containing fractions were collected and spun once again. rAAV1-GFP was then loaded on a gel-filtration column (HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR; Amersham Biosciences) preequilibrated with 50 mM Hepes (pH 7.4), 0.3 M NaCl, 2 mM MgCl₂ to eliminate further cellular contaminants. Type 1 empty capsids were also generated in 293 cells transfected with a type 1 AAV helper plasmid alone and purified as for rAAV particles except for the CsCl density of 1.30 g/cm³. Their purity was confirmed by silver staining of the SDS-PAGE gel using the SilverQuest silver staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Arrows indicate VP1, VP2, and VP3 polypeptides. Approximately 5×10^{10} vg of rAAV1-GFP (F) or an equivalent quantity of type 1 empty particles (E) was loaded onto a Mini Q 4.6/50 PE column (Amersham Biosciences) controlled by an ÄKTA FPLC system (Amersham Biosciences). The bound particles were eluted over 10 ml with a linear 20 to 300 mM NaCl gradient at pH 8.4. The profile is represented as the absorbance at 280 nm (mAU). Buffer conductance (mS/cm) is indicated by the thin line. M, molecular weight standards. (B) Chromatogram of the mixture of AAV1 and empty particles in anticholotropic buffers with a 20 to 300 mM Na⁺ or $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$ gradient. The earlier elution from the column represents empty particles (E) and DNA-filled or rAAV1 (F) eluted at a higher salt concentration. (C) The effect of pH on the elution of rAAV1 and empty particles. A buffer of 25 mM triethanolamine (TEA) at pH 7.5, Trizma (Tris) at pH 8.0, N-methyl-diethanolamine (NMDEA) at pH 8.0 or 8.5, or diethanolamine (DEA) at pH 9.0 with a 10 to 150 mM $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$ gradient was used for elution.