

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

分担研究報告書

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療における諸条件の基礎的検討

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

小澤敬也、水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた遺伝子治療が広がりを見せる中、関連技術に関する報告が増えており、最適な方法に関して改めて検討する必要性が生じている。そこで今回このような観点から AAV ベクターの作製・精製法、定量法に関して検討した。その結果、研究室レベルでは現在用いている方法で概ね最適と考えられたものの、今後臨床応用に向けて大量に調製する場合には新しい方法に移行する必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療が広まるにつれて、関連する技術の開発が進んできている。近年報告されている技術に関して広く情報を収集し、ベクター作製・精製法、定量法などに関して最適な方法を探ることを目的とする。

B. 研究方法

・AAV ベクターの作製法に関する検討：これまでの報告を精査し、長所及び短所を比較検討した。また、現在最も広く行われているトランスフェクション法に関して、使用するフラスコのサイズと収量に関して検討した。

・AAV ベクターの精製法に関する検討：これまでの報告を精査し、我々が通常行っている塩化セシウムによる濃度勾配を用いる方法よりも有用なものがあるかどうかに関して検討した。

・AAV ベクターの定量法に関する検討：これまでの報告を精査し、我々が通常行っているリアルタイム PCR 法に比較して有利な方法があるかどうかに関して検討した。

（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ものと考えている。

C. 研究結果

・AAV ベクターの作製法に関する検討：ベクターの作製法としては依然としてリン酸カルシウム法によるトランスフェクションが優れているものと考えられた。また、効率良い作製のためにはできるだけ大きなフラスコを用いることが望ましいとの考えから 10 段のフラスコを用いてきたが、単位面積あたりの収量に換算すると無駄が多いことが問題となっている。このため、より段数の少ない 4 段、2 段のフラスコを用いて効率を検討したところ、段数が少なくなるにつれて単位面積あたりの作製効率が高まる傾向が見られた。総合的には 4 段のフラスコを用いることが最適と考えられた。また、将来的に臨床用に大量調製する場合にはウイルスを用いる方法、中でもバキュロウイルスを用いる方法が有望と考えられた。

・AAV ベクターの精製法に関する検討：多くの方法が報告されている中で、塩化セシウム

法は全ての血清型のベクターに応用可能であり、空ベクターを効率良く除去できるなど有利な点が多いものと考えられた。将来的に大量調製する場合には処理能力に限界があることから異なる方法に移行する必要があるものと思われ、その際にはアフィニティーカラムを用いる方法などが有力な候補と考えられた。

・ AAV ベクターの定量法に関する検討：リアルタイム PCR 法が最も広く用いられているが、誤差の問題があり、正確な定量には他の方法と組み合わせて実施する必要があるものと思われた。このような欠点を克服した方法としてデジタル PCR 法が開発されており、今後普及するものと予想される。

D. 考察

AAV ベクターを用いる遺伝子治療法は近年臨床研究における数々の成功により急速に普及が進んでいる。その結果ベクター調製に関しても多くの技術が開発されてきている。それぞれに長所と短所があることから、目的に応じて選択することになるが、改良も行われており、変化が激しい。今回は研究室レベルでの視点から最適な技術を選択したが、今後臨床への展開が進むにつれて産業用に調製する必要が出てくるものと思われ、そのような視点からも選択を考慮する必要がある。特に作製法ではトランスフェクションのスケールを大きくするだけでは限界があり、バキュロウイルス法などを採用することが必要と考えられた。

E. 結論

AAV ベクターの作製・精製法、定量法に関して検討した結果、研究室レベルでは現在用いている方法で概ね最適と考えられた。しかしながら、今後臨床応用に向けて大量調製する場合には、新たな方法に移行する必要があるものと考えられた。今後も新しい技術の開発が続くものと予想されることから、引き続き検討を続けていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. **J Med Virol**, *in press*.

Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. **Cancer Sci**, 104:1107-11, 2013.

Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. **PLoS One**, 8(3):e57606. 2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし