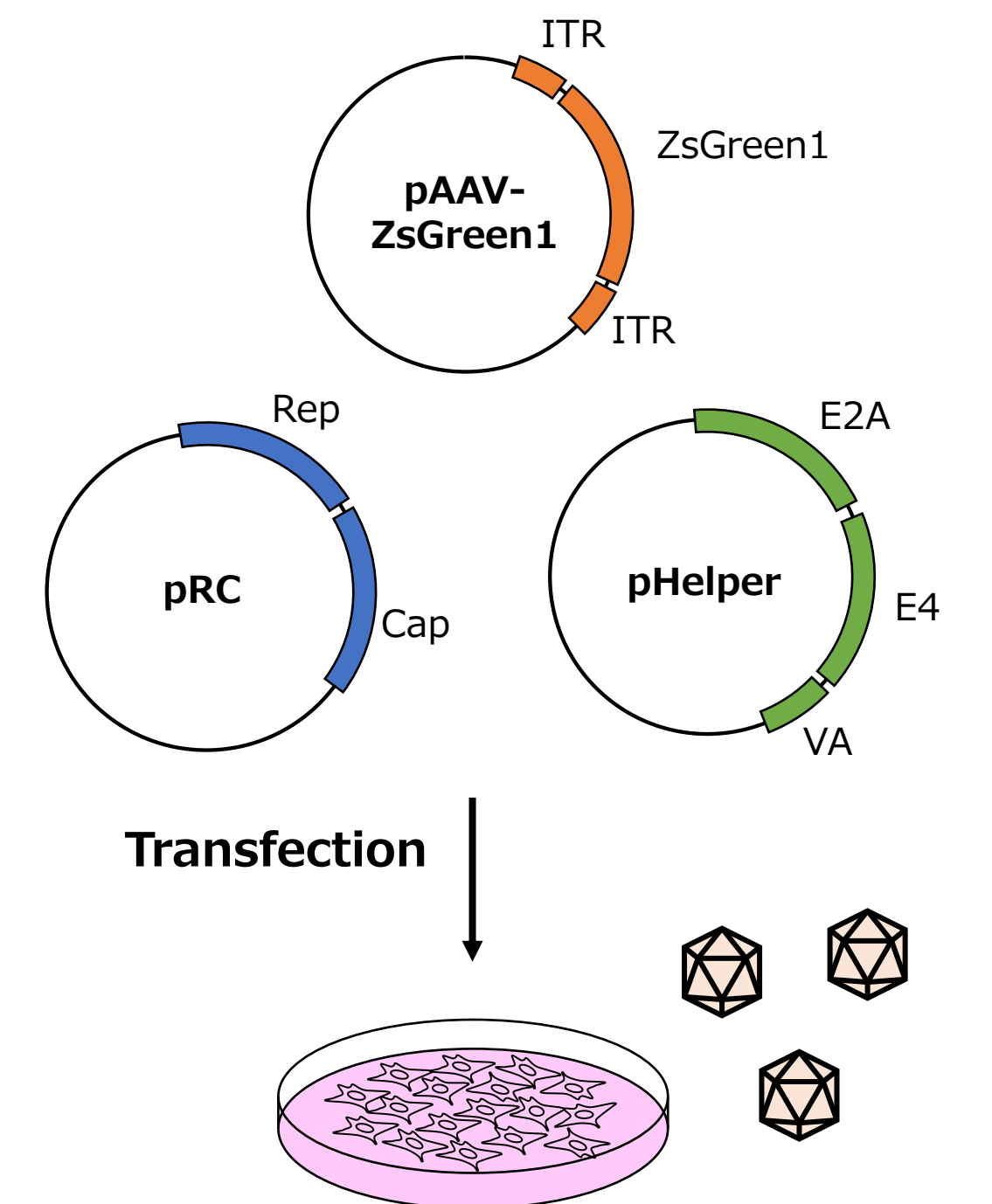


Introduction

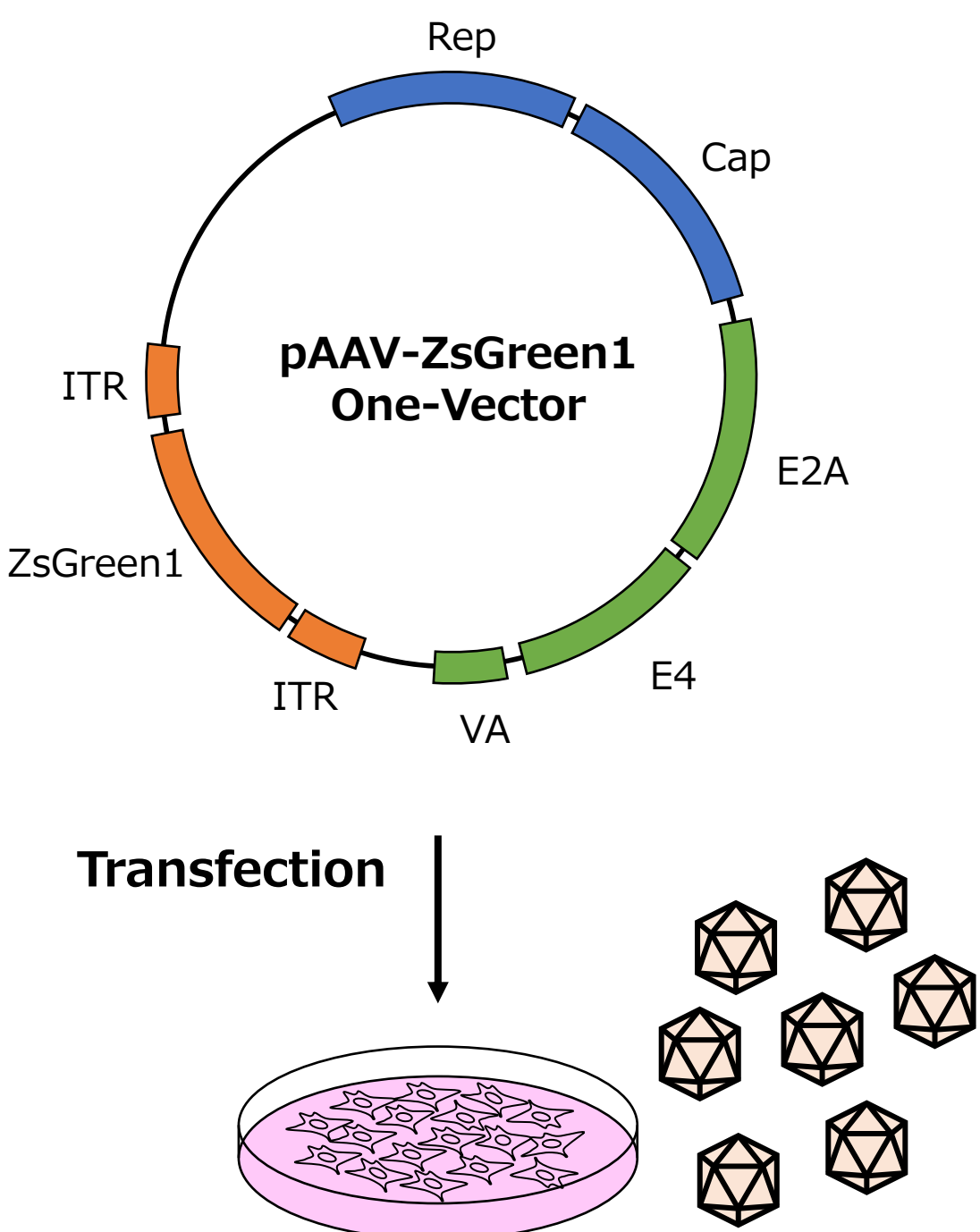
アデノ随伴ウイルス (AAV)ベクターは、非病原性で安全性が高く、in vivoでの遺伝子導入に適しており、高効率かつ長期的な遺伝子発現が可能であることから、遺伝子治療分野において広く利用されている。従来のAAV製造法では、目的遺伝子を搭載したトランスファープラスミド、Rep/Cap遺伝子をコードするパッケージングプラスミド、さらにアデノウイルス由来のヘルパープラスミドの3種類を用いて、細胞にトランスフェクションを行う必要がある。しかしこの方法では、各プラスミドの調製が必要であり、コストや作業負担が大きいという課題がある。本研究では、これらの課題を解決するために、3種類のプラスミドを1つに統合した「**pAAV One-Vector**」を開発し、その特性を詳細に解析した。

pAAV One-Vector

Triple Transfection法(従来法)

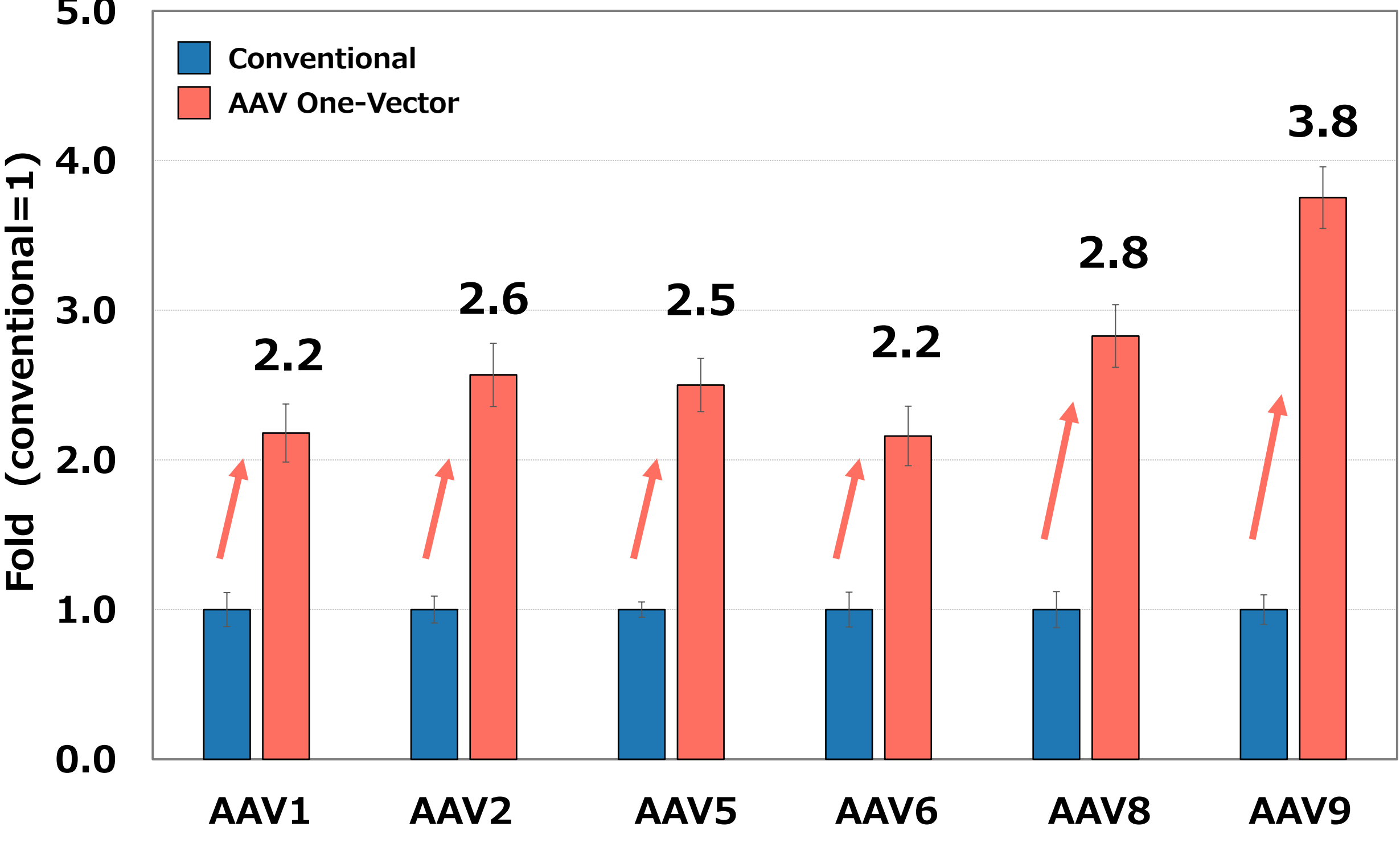


AAV One-Vector system



AAV productivity

AAV production

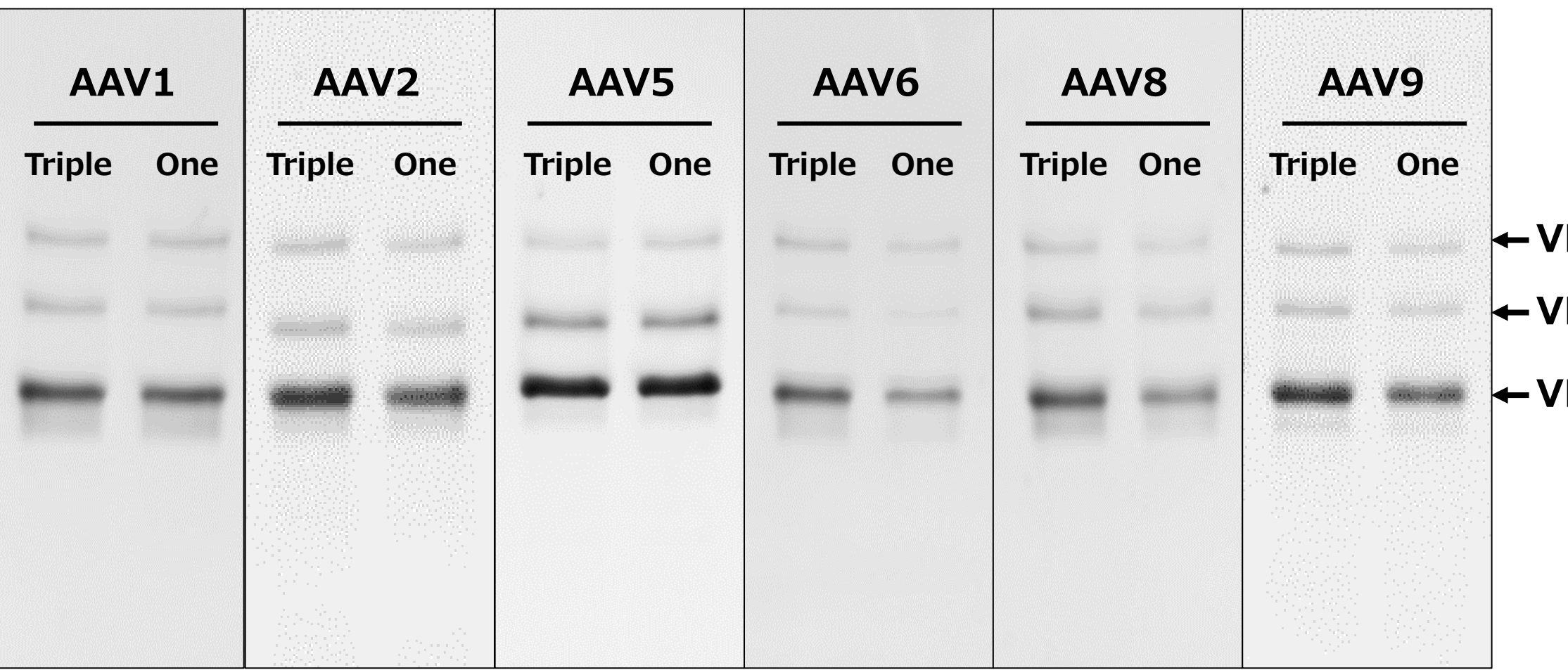


AAV Type	Conventional	AAV One-Vector
AAV1	1.0	2.2
AAV2	1.0	2.6
AAV5	1.0	2.5
AAV6	1.0	2.2
AAV8	1.0	2.8
AAV9	1.0	3.8

AAV One-Vector systemによるAAVベクター産生
AAV One-Vector systemと従来法を用いて、接着HEK293T細胞でAAV-CMV-ZsGreen1ベクターを産生し、AAVゲノム力価を測定した結果、AAV One-Vector systemは**従来法と比較して約2〜4倍高いAAVベクター産生量**を示した。

Capsid proteins (VP1,VP2,VP3)

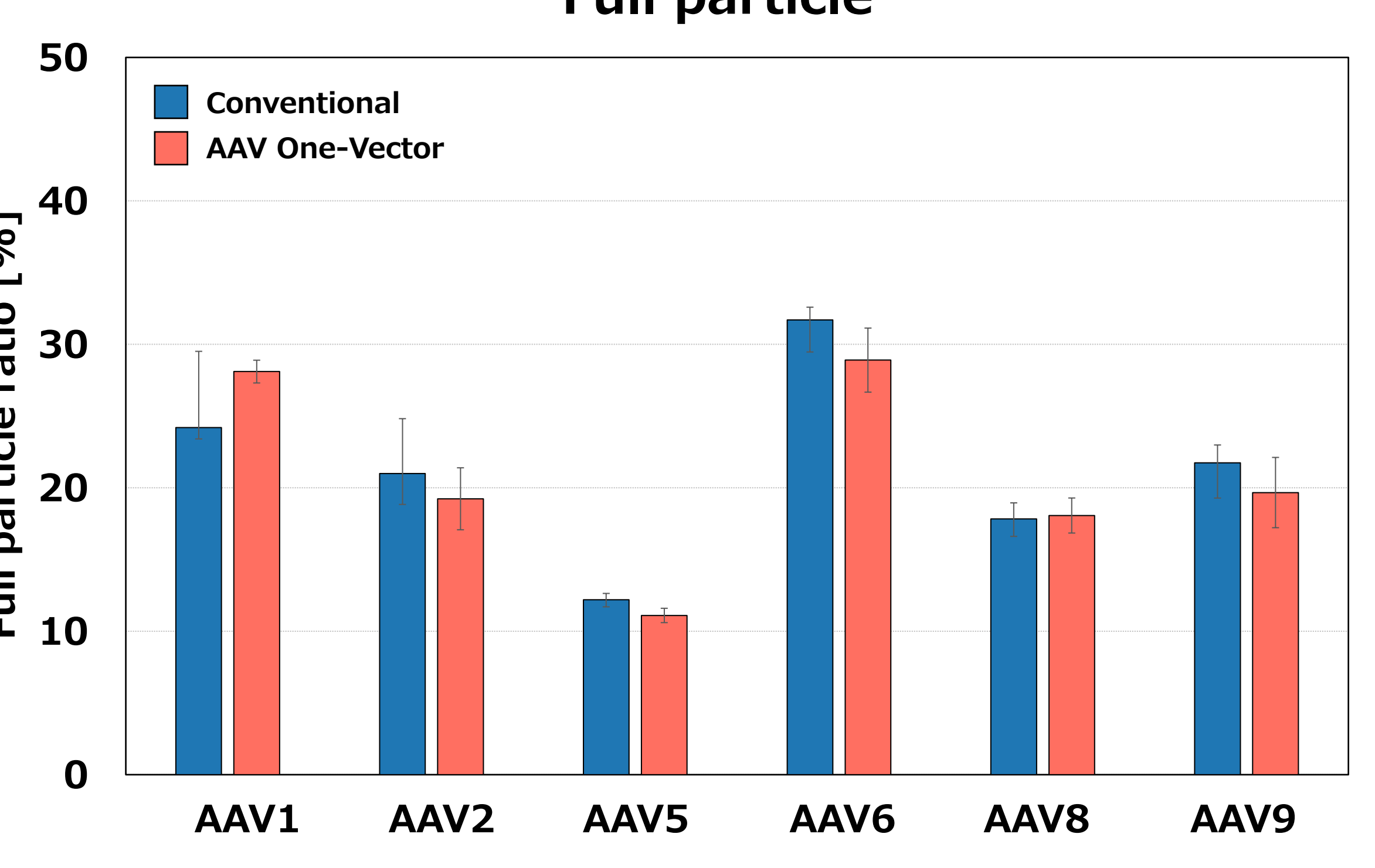
SDS-PAGE



AAVベクターキャプシドタンパク質評価
HEK293T細胞で作製・精製 (アフィニティー)したAAVベクターをSDS-PAGE解析した結果、**両者ともキャプシドタンパク質VP1:VP2:VP3の比率は約1:1:10で、大きな差は認められなかった。**

AAV genome containing particle

Full particle

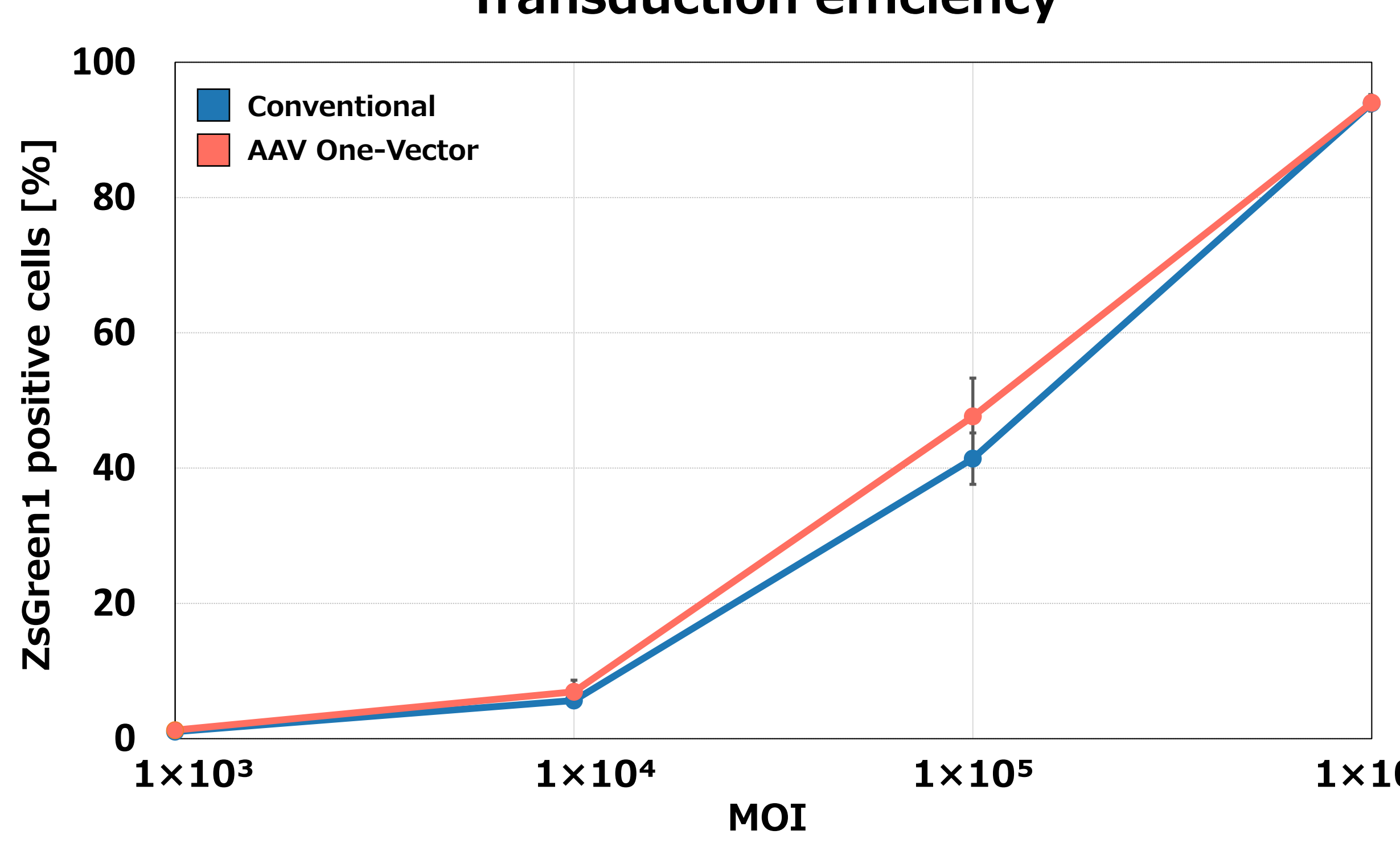


AAV Type	Conventional	AAV One-Vector
AAV1	1.0	2.8
AAV2	1.0	1.9
AAV5	1.0	1.1
AAV6	1.0	3.2
AAV8	1.0	1.8
AAV9	1.0	2.0

AAVベクターの完全粒子率評価
接着HEK293T細胞で作製・精製 (アフィニティー)をしたAAV-CMV-ZsGreen1ベクターをMass photometry法で完全粒子率を測定した結果、**両者は同等であった。**

Transduction efficiency (in vitro)

Transduction efficiency

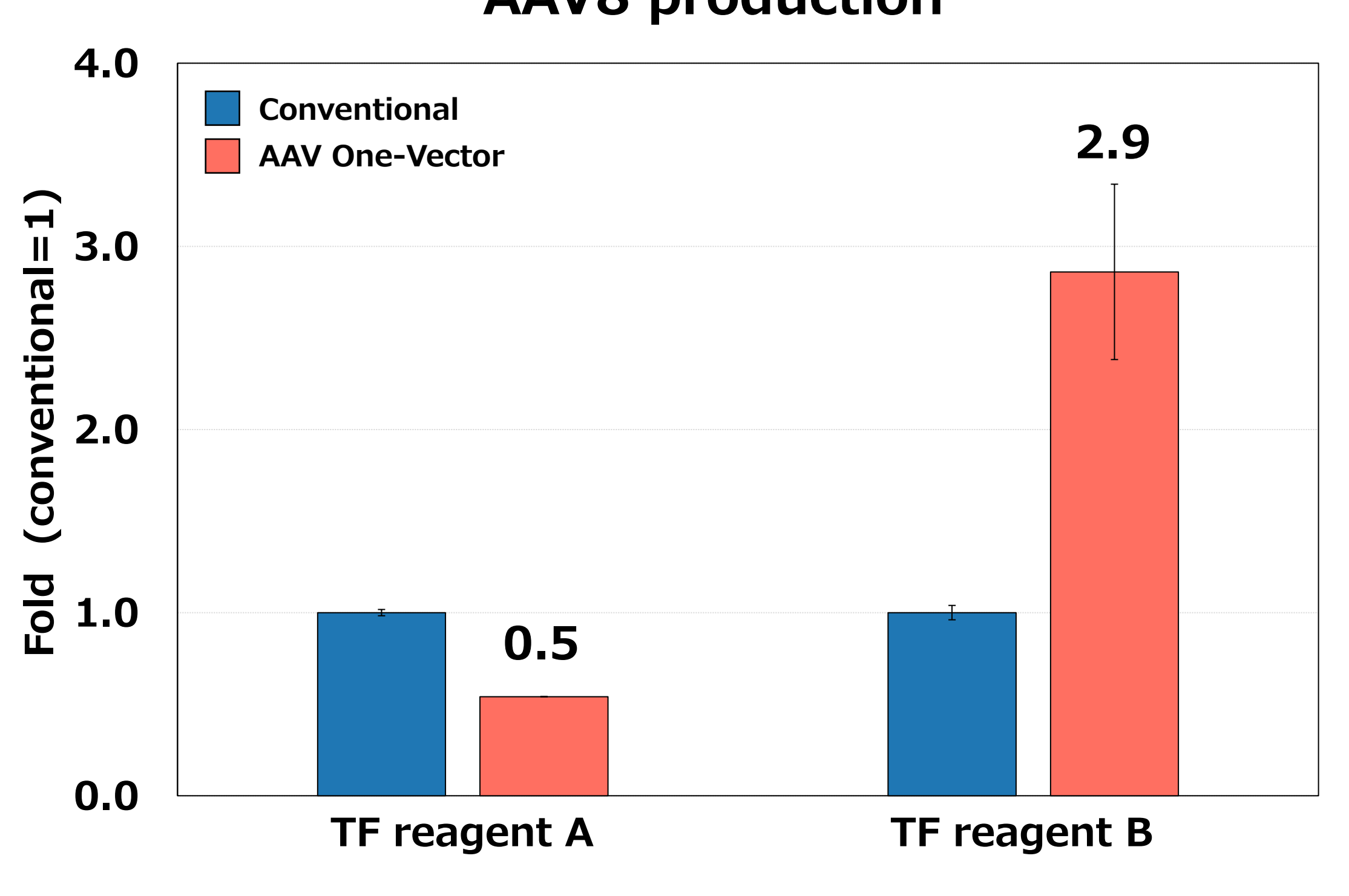


MOI	Conventional	AAV One-Vector
1×10 ³	1.0	1.0
1×10 ⁴	1.0	2.6
1×10 ⁵	1.0	2.5
1×10 ⁶	1.0	2.2

AAVベクターの感染能評価 (in vitro)
接着HEK293T細胞で作製・精製 (アフィニティー、CsCl超遠心精製)したAAV9-CMV-ZsGreen1ベクターをHeLa細胞に感染させてフローサイトメーターで遺伝子導入効率を解析した結果、**両者に差は認められなかった。**

AAV productivity (suspension)

AAV8 production



TF reagent	Conventional	AAV One-Vector
TF reagent A	1.0	0.5
TF reagent B	1.0	2.9

浮遊細胞におけるAAV One-Vector systemによるAAVベクター産生
浮遊HEK293細胞でAAV8-CMV-ZsGreen1ベクターを産生しAAVゲノム力価を測定した結果、**AAV One-Vector systemはTF reagent Aでは従来法の約1/2、TF reagent Bでは約2.9倍の産生量**を示した。

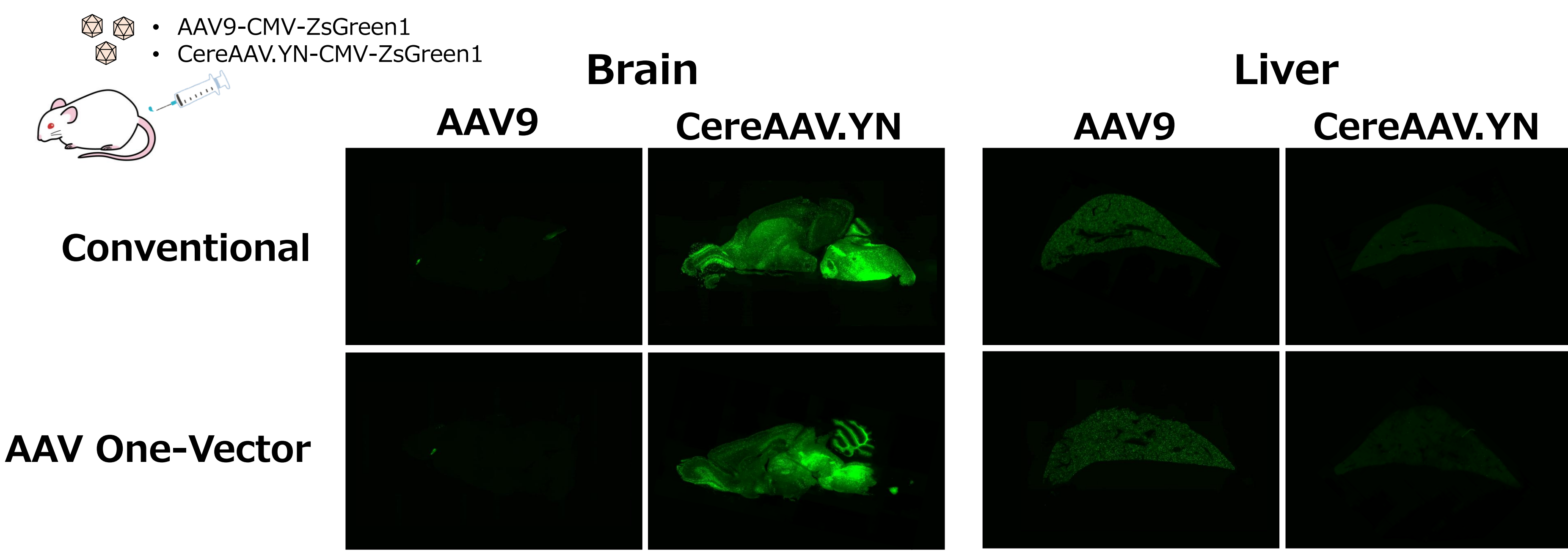
Transduction efficiency (in vivo)

Brain

Liver

Conventional

AAV One-Vector



AAVベクターの感染能評価 (in vivo)
接着HEK293T細胞で作製・精製 (アフィニティー、CsCl超遠心精製)したAAV9またはCereAAV.YNベクターを5×10¹¹ vg/mouseでBALB/cマウスに静脈内投与し、4週間後に脳と肝臓を蛍光観察した結果、**遺伝子導入効率において従来法との大きな差は認められなかった。**

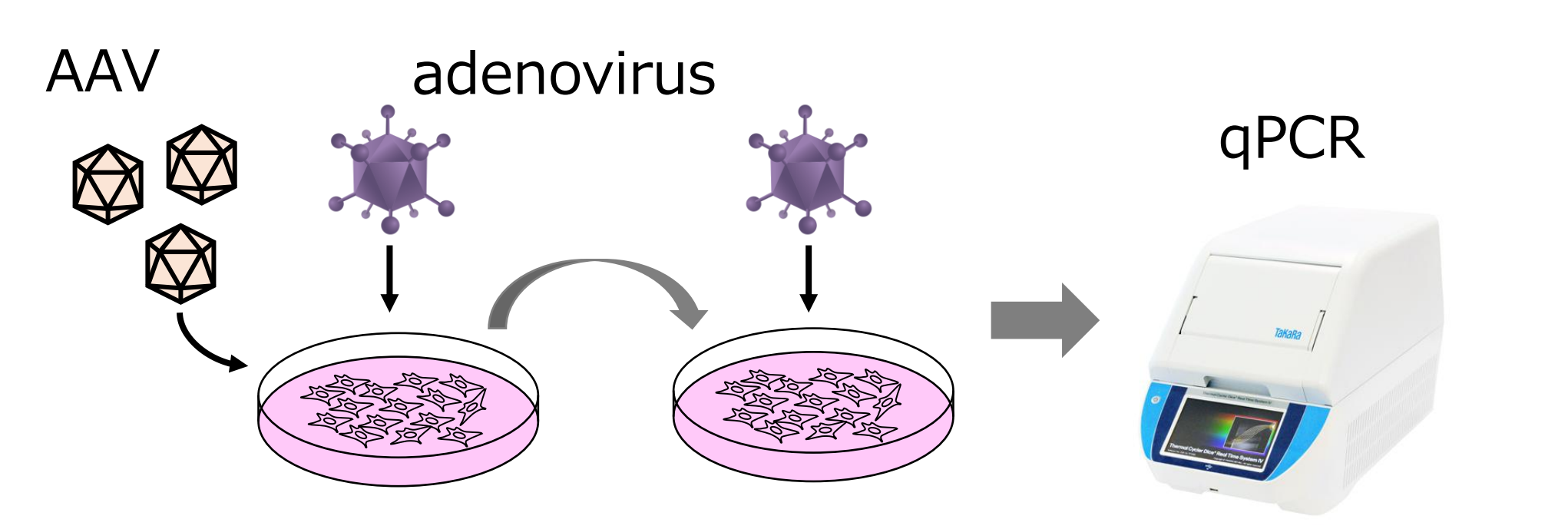
*CereAAV.YN: タカラバイオが開発した肝臓への遺伝子導入を回避し脳指向性が高いAAV2変異体

NGS analysis of AAV vector genomes

category	Conventional		AAV One-Vector system	
	Count	Frequency (%)	Count	Frequency (%)
AAV	4,808,227	96.96%	4,518,069	97.65%
Rep/Cap	5,786	0.12%	1,489	0.03%
Helper	81,005	1.63%	9,062	0.20%
backobone	36,678	0.74%	66,730	1.44%
host	9,646	0.19%	11,399	0.25%
unmapped	17,601	0.35%	20,091	0.43%
total	4,958,943	100.00%	4,626,840	100.00%

AAVベクターゲノム不純物評価
AAVベクターに封入されるゲノムがAAV One-Vector systemと従来法で同等の品質を維持しているかを評価を行った。接着HEK293T細胞で精製 (アフィニティー、CsCl超遠心精製)したAAV9-CMV-ZsGreen1ベクターからゲノムDNAを抽出し、NGSロングリード解析を行った結果、**両者においてAAVベクター由来のリードは全体の約97%を占め、不純物に関しても大きな差は認められなかった。**

Replication-Competent AAV (rcAAV)



rcAAV (replication-competent AAV)
AAVベクター作製時に使用するrep/cap遺伝子が再構成されることで、作製過程で稀に発生する宿主細胞内で複製可能なAAV粒子。
臨床応用において安全性上の懸念があるため、発生リスクを評価することが重要。

試験概要
AAV One-Vector systemと従来法を用いて、接着HEK293T細胞で作製・精製 (アフィニティー、CsCl超遠心精製)した2×10¹¹ vgのAAV2ベクターとアデノウイルス (MOI = 5) をHEK293細胞に共感染させた。その後、感染細胞から抽出液を調製し、この抽出液を再度HEK293細胞にアデノウイルスと感染させ、qPCRによりAAVの有無を確認した。

結果

- いずれも2×10¹¹ vgのAAVベクターでCt値は検出されず、rcAAV発生リスクに差は認められなかった。
- 野生型AAV2を用いた同様の試験では、検出限界は2×10² vgであった。

AAV One-Vector systemにおいて、2×10¹¹ vg 中のAAVベクターでは、rcAAVは2×10² vg未満であり、1×10⁹ vg中にrcAAVは存在しないことが確認された。

Conclusion

AAV One-Vector system

- ✓ **AAVベクター作製: 1つのプラスミド作製可能**
- ✓ **AAVベクター産生: 従来法と比較して2〜4倍高い**
- ✓ **AAVベクター特性: 従来法と差は認められない**

AAV One-Vector systemは、効率的なベクター作製と工程の簡略化を実現し、コスト削減にも寄与することから、今後のAAV作製プラットフォームとして有望である。