

アデノ随伴ウイルス受容体 AAVR を利用した 新規 AAV アフィニティーカラムの開発

牧	野	友理	Ӗ子*1
渡	邉	和	哉* ²
吉	田	浩	平*1
栗	原	健	A^{*1}
田	中		亨*1
井	出	輝	彦 ^{*3}

Development of Novel Affinity Column for Purification and Analysis of Adeno-Associated Virus (AAV) Using the AAV Receptor (AAVR)

Yuriko MAKINO Kazuya WATANABE Kouhei YOSHIDA Kento KURIHARA Toru TANAKA Teruhiko IDE

Adeno-Associated Virus (AAV) is a non-pathogenic virus classified in the Parvoviridae family with a diameter of 20 - 30 nm. AAV vectors that contain therapeutic genes have been developed and widely used as gene therapy drugs. There are various types (serotypes) with different cell tropism, and most of them enter and infect cells through binding to the AAV receptor (AAVR; KIAA0319L). Utilizing the highly specific interaction between AAV and AAVR, we have developed the affinity chromatography column anchoring AAVR as a ligand. This column is expected to be used for purification and analysis of various AAVs with maintaining the affinity to the AAVR and the infectivity.

The AAVR was expressed by *Escherichia coli* and an acid-resistant AAVR (AVR) was created by molecular evolution engineering method. AVR was immobilized on gel as a ligand, and the gel was used to prepare an affinity chromatography column (AVR Column). AAVs were bound to the AVR column at neutral pH and subsequently eluted by denaturing the AVR at acidic pH. The AAVs showed a single peak in the chromatogram, and based on the peak area, the AVR column was found to be used to quantify the AAV capsid number with a range from 2.0 x 10^9 to 1.0×10^{14} cp. A wide range of serotypes (AAV1, 2, 5, 8, 9, etc.) that infect via AAVR were detected, while AAV4, which infects without AAVR, could not bind to the column. Additionally, the analysis of AAV mutants showed a correlation between elution time and infectivity. These results suggest that the infectivity can be evaluated by using an AVR Column. Furthermore, we succeeded in detecting AAV in culture supernatants and cell lysates, indicating that the AVR Column is applicable for the detection of AAV production in culture without purification.

In conclusion, we have succeeded in development of an affinity chromatography column (AVR Column) anchoring AVR as a ligand. Also, based on the aforementioned results, the AVR Column is expected to be further utilized for determination of AAV capsid numbers without the need for dilution, evaluation of the infectivity of AAV without a reporter gene, screening of AAV mutants, and monitoring of AAV production.

^{*1} ライフサイエンス研究所 生物機能工学グループ *2 ライフサイエンス研究所 装置開発グループ

1. 序論

アデノ随伴ウイルス (Adeno-Associated Virus; AAV)は、パルボウイルス科に属する非病原性のウイ ルスである。AAV は VP1、VP2、VP3 などのタンパク 質で構成され、直径 20 ~ 30 nm の正二十面体の外殻 粒子(カプシド、cp)を形成している¹⁾。AAV には、 組織指向性の異なる様々な種類(血清型)が存在し、 カプシドの改良により機能が向上したさまざまな AAV 変異体も開発されている²⁻⁴⁾。AAVの内部に、治療薬 となる遺伝子を挿入した AAV ベクターは、遺伝子治 療用医薬品として主に欧米で広く利用されている⁵⁾。 AAV9 (血清型 9) ベクターとして日本で承認された、 脊髄性筋萎縮症 (SMA) 治療薬ゾルゲンスマ (オナセ ムノゲンアベパルボベック)は記憶に新しい。この遺 伝子治療用医薬品は日本で 2020 年5月に保険適用さ れ、一度の投与で運動機能の劇的な改善がみられたと の報告もある⁶⁾。

一方で、医薬品として製造した AAV には、遺伝子 を含まない空カプシドや、カプシドの変性による感 染能が低下した AAV など多数の不純物が含まれるこ とが課題である。現在の技術では、これらすべての 不純物を認識し、除去することができず、課題の改 善が急務である。製造した AAV の品質は、一般的に 使用される分析技術により総合的に判断される⁷⁾が、 現状では標準的な評価系が確立されていない。中で も、細胞への感染能は遺伝子治療薬として重要な性 能であり、感染能を有する正常な AAV のみを精製し、 AAV の構造や感染能を分析する方法が求められてい る。各種 AAV のほとんどは、AAV 受容体 (AAVR; KIAA0319L)との結合を介して細胞へ侵入して感染 する⁸⁻¹¹⁾。そこで我々は、AAVR との相互作用により AAV を精製・分析可能な、アフィニティークロマト グラフィーカラムの開発に着手した。

AAVR は5つの細胞外ドメイン(PKD1 ~ PKD5)、 膜貫通領域および細胞内領域から構成されており、 AAV との結合は主に PKD1 および PKD2 が関与する ことが明らかとなっている^{12,13)}。そこでまず、AAVR のドメイン PKD1 から PKD2 の領域(以下、野生型 AVR)を大腸菌において安定的に発現する系を確立し た。次に、進化分子工学的手法により AVR に変異を 加えて耐酸化した変異体(以下、耐酸型 AVR)を創 製した。最後に、精製した耐酸型 AVR をリガンドと してゲルに固定化して充填した、AAV 分析用のアフィ ニティークロマトグラフィーカラム(AVR カラム)を 作製した。AVR カラムに中性で AAV を結合させたの ち、酸性下で AAV と AVR の結合親和性を変化させ ることで、AAV のピークを取得することに成功した。 本稿では、創製した大腸菌発現型 AVR の性能評価お よび各種 AAVの AVRカラムによる分析結果を報告する。 この技術により、高品質な AAV を精製し、分析す ることができれば、AAV ベクターの開発の一助とな

ると考えられる。AAV ベクターは遺伝性希少疾患や 癌などに対する革新的な治療法であり、SDGs(持続 可能な開発目標)の「すべての人に健康と福祉を」に 代表される治療への貢献を目的とする。

2. 実験方法

[1] 野生型 AVR 大腸菌発現型プラスミドおよび形質 転換体の作製

アデノ随伴ウイルス(AAV)受容体 AAVR のアミノ 酸配列(UniProt:Q8IZA0)のうち、野生型 AVR に相 当するヌクレオチド配列のコドンを、ヒト型から大腸 菌型に変換した。次に、発現ベクター pET26b (Merck 製)にライゲーションし、野生型 AVR 大腸菌発現型 プラスミドを作製した。

[2] AAV および VLP の調製

AAV ベクターは常法^{14,15)}に従い作製した。すなわち、 5-10% (v/v) のウシ血清を含む D-MEM 培地(富士 フイルム和光純薬製) 45 mL が入った T-225 フラスコ (Thermo Fisher Scientific 製) 5 枚で HEK293T 細胞を 培養し、構造遺伝子として GFP (Green Fluorescent Protein) をコードするプラスミド pAAV-GFP、各種 血清型(AAV1, 2, 5, 8, 9など)のカプシドをコー ドするプラスミド(総称して pRCX Vector)および pHelper Vector (タカラバイオ製)の3種類のプラス ミドとともに、ポリエチレンイミン (Polysciences 製) を添加して複合体を形成させて遺伝子を導入後、5% (v/v) CO₂, 37℃で3日間静置培養した。なお、VLP (構造遺伝子を含まない AAV) は、pAAV-GFP を遺伝 子導入しない以外は同じ方法で作製した。培養後、剥 離した細胞を回収し、-80℃ で冷凍保存した。冷凍 した細胞を、破砕液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) Tween 20 (商品名), pH 7.4) 10 mL に懸濁した。Benzonase (Merck 製) を加 えて 37℃, 1 h 静置後、4℃, 10 min, 13,000 × g で遠 心分離し、上清を得た。得られた上清を孔径 0.22 µm のフィルターに供し、浮遊物を除去して細胞破砕液と した。なお、浮遊細胞 HEK293F を用いた場合には、 Viral Production Medium (Thermo Fisher Scientific 製) 培地 120 mL で培養後、プラスミドを AAV-MAX Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific 製)を使用 して遺伝子導入し、界面活性剤により抽出して、不溶 成分を遠心により除去し、孔径 0.22 µm のフィルター に供した上清を細胞破砕液とした。得られた各種細 胞破砕液を、溶液 A (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0) であらかじめ平衡化した POROS AAVX ゲル (Thermo Fisher Scientific 製)充填カラムにアプライ した。溶液 A で洗浄後、溶液 B (0.1 M Acetate, 0.5 M NaCl, pH 2.5) で AAV ベクター (総称して AAVX -GFP) を溶出した。中和液 (1.0 M Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.5) を 1/4 量加えることで中和し、 AAVX-GFP 濃度を AAVpro Titration Kit (タカラバイ オ製) による qPCR および AAV Titration ELISA Kit (PROGEN 製) で定量した。

[3] ELISA 法

[1] で作製したプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) 株(NBRC 108896)を形質転換し、カナマイシン含 有 2 × YT 培地にて 37℃ で一晩培養して前培養とし た。前培養液を植菌して本培養を開始し、2h後に氷 上にて冷却して、終濃度 0.1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加した。25℃ で一晩 培養後、培養液を採取し、遠心分離で集菌した。得ら れた菌体を BugBuster Protein Extraction Kit (Merck 製)を用いて、発現した AVR を含むタンパク質抽出 液を調製した。VLP2 を固定化した 96 穴マイクロプ レート(Nunc 製)を用意し、先に調製したタンパク 質抽出液を添加して 固相の VLP2 と 30℃ で 1 h 反応 させた。反応終了後、洗浄液(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.4) で洗浄し、100 ng /mL に希釈した Rabbit anti-6-His Tag 抗体 (Bethyl Laboratories 製)を 100 µL/well で添加した。30℃ で 1h 反応後、前記洗浄液で洗浄し、TMB Peroxidase Substrate (KPL 製)を50 µL/well で添加した。1.0 M のリン酸を 50 µL/well で添加することで発色を止め、 マイクロプレートリーダー (Tecan 製) にて 450 nm の吸光度を測定した。

[4] 進化分子工学的手法を利用した耐酸型 AVR の創製

AVR 遺伝子をコードするポリヌクレオチド部分に、 エラープローン PCR によりランダムに変異を導入した。 得られた PCR 産物を発現ベクター pET26b (Merck 製) にライゲーションし、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質 転換して、ランダム変異体ライブラリとした。生産性 や酸処理後の残存活性を指標として評価し、ランダム 変異体ライブラリから耐酸性の向上した変異体を取得 した。変異を組合せることで、耐酸型 AVR を創製した。 [5] 表面プラズモン共鳴(SPR)法による親和性評価 VLP2 をアミンカップリング法により固定化した
Series S Sensor Chip CM5 (Cytiva 製) を Biacore 8K 装置(Cytiva 製) に挿入した。希釈液 A (20 mM HEPES (4 - (2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid), 150 mM NaCl,10 mM CaCl₂,0.005% Tween20, pH 7.4) を使用して 0.0078 ~ 5 μM に希釈した AVR を用いて、 VLP2 に対する結合親和性を評価した。得られたデー タを Biacore Insight Evaluation ソフトによりフィッ ティングし、その結合速度定数および解離速度定数よ り、親和性 K₀ 値を算出した。

[6] 示差走査熱量測定(DSC)法による耐熱性評価

AVR を希釈液 B (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) を用いて濃度 1 mg/mL に調製した。示差走査熱 量測定 (DSC) 装置 (Malvern 製) を用いて、温度上 昇による AVR の変性温度 T_m 値を測定した。

[7] AVR の大量生産

[4] で創製した AVR をコードする遺伝子を、[1] と同様に発現ベクター pET26b (Merck 製) にライゲー ションし、耐酸型 AVR 大腸菌発現型プラスミドを作 製した。大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、カナ マイシン含有 2 × YT 培地にて 37℃ で一晩培養し、前 培養とした。前培養液を植菌して本培養を開始し、2 h 後に氷上にて冷却して、終濃度 0.1 mM となるよう IPTG を添加した。25℃で一晩培養後、培養液を 4℃, 20 min, 12,100 × g で遠心分離し、菌体を回収した。 回収した菌体 1g に対し、溶液 C(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7.4) を 5 mL 添加 し、超音波発生装置(久保田商事製、インソネーター 201M)を用いて、8℃, 10 min、出力 150 W で菌体を 破砕した。菌体破砕液を 4℃, 20 min, 12,100 ×g で遠 心分離し、上清を回収した。得られた上清を、あらか じめ溶液 C で平衡化した、Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva 製) 50 mL を充填した XK26/20 カラム (Cytiva 製) にアプライした。溶液 C で洗浄後、溶液 D (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4) で溶出した。得られた溶出液を、溶液 E(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)に透析した。

[8] AVR 固定化ゲルおよび AVR カラムの作製

当社独自のベースゲル(非多孔性、平均粒子径 5 µm)の表面に、固定化用の官能基を導入し、AVR を 固定化した。作製した AVR 固定化ゲル 約 1 mL を、 ステンレス製空カラム 4.6 mm I.D. × 75 mm に充填 して AVR カラムを作製した。AVR カラムを、HPLC M40A(島津製作所製)に接続し、Table 1 に示す方 法を標準として各種 AAV を分析した(Fig. 1)。

Product Name	AVR Column		
Filler	Substrate	Non-porous hydrophilic polymer	
	Average particle size	$5\mu\mathrm{m}$	
	Ligand	Modifed human AAV receptor expressed in E.coli	
Column	Size	$4.6 \text{ mm I.D.} \times 75 \text{ mm}$	
	Material	SUS	
Conditions of use	Temperature	15 - 20°C	
	Flow rate	0.5 mL/min	
	Buffer A	15 mM Acetate-Na, 10 mM Glycine,	
		50 mM CaCl ₂ , pH 6.0 or 4.5	
	Buffer B	15 mM Acetate-Na, 10 mM Glycine,	
		50 mM CaCl ₂ , pH 2.0	
	Gradient Program	0-10 min A 100%, B 0% (Wash A)	
		10-55 min From B 0% to B 100% (Linear Gradient)	
		55-58 min B 100% (Wash B)	
		58-70 min A 100%, B 0% (Wash C)	
		*When the sample contains impurities, 20 minutes of Wash A	
		is recommended. 60 minutes of Linear gradient is also used.	

 Table 1
 Equipment specifications



Fig. 1 Schematic representation of AVR Column

3. 結果と考察

[1] 耐酸型 AVR および固定化ゲルの性能評価

進化分子工学的手法により、野生型 AVR と比べて 耐酸性が向上した耐酸型 AVR を創製した。SPR およ び DSC により、AAV との親和性および耐熱性を評価 したところ、親和性は野生型とほとんど変わらないに もかかわらず、耐熱性を示す T_m 値が約 10° 向上し、 耐酸性に加えて安定性の向上も認められた(Table 2)。 ゲルに固定化し、充填したカラムを使用して耐久性 を測定した結果、野生型 AVR と異なり、100 回以上 AAV2 を分析してもほとんど素通りせず、ピーク形状 も変化しないことがわかった(Fig. 2)。以上の結果よ り、安定的に AAV の分析が可能なカラム(AVR カラム) の開発に成功した。

Table 2Comparison between Wild-Type (WT) and
Acid-Resistant (AR) AVR

	WT AVR	AR AVR
Binding affinity : K_D (Serotype2)	$1.1 imes10^5$	$4.1 imes10^6$
Binding affinity : K_D (Serotype5)	$2.7 imes10^6$	$3.4 imes10^6$
Thermal stability : T_m	52.5°C	62.0°C



Fig. 2 Chromatographic performance of AVR Columns anchoring (a) Wild-Type (WT) and (b) Acid-Resistant (AR) AVR

#20

#40

Cycle

#80

#100

#1

60

[2] AVR カラムによる分析

(1) 各種血清型の分析

AAVR をノックアウトすることで、感染率が低下 する血清型(AAV1, 2, 5, 8, 9 など)と、感染能に変化 がみられない血清型(AAV4 など)が存在する¹⁶⁾。作 製した AAV の各種血清型を AVR カラムにより分析 したところ、AAVR を介して感染する血清型につい てはゲルに結合し、溶出ピークを得た(Fig. 3)。一

0

20

Retention Time [min]

40

方で、AAVR を介さずに感染する AAV4 は素通りし、 溶出ピークを確認できなかったことから(Data Not Shown)、AAVR を介した感染能との相関を確認した。 (2) 定量分析

AAV2 Titration ELISA 2.0R Kit (PROGEN 製) によ り粒子数を算出した AAV2 (2.5×10¹³ cp/mL) を、希 釈液 (50 mM Acetate-Na, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.01% Tween20, 0.01% PuronicF-68, pH 6.0) で3倍



Fig. 3 Detection of various AAV serotypes



Fig. 4 Calibration curve obtained with AVR Column

ずつ希釈し、 2.8×10^{11} cp/mL まで希釈した。各サン プル 40 µL を AVR カラムにアプライし、 $1.4 \times 10^{9} \sim$ 1.0×10^{12} cp の検出を試みた。結果、ピーク面積とカ プシド数の検量線により、AAV の粒子数 を定量可能 であることがわかった(Fig. 4)。なお、UV 検出器を 使用した場合には、約 10^{14} cp まで定量できる。一般 的な ELISA 法は感度が高いために、非常に薄い約 $10^{8} \sim 10^{9}$ cp/mL への希釈を要する一方で、AVR カラム は検出レンジが広く、溶液量によりアプライ量を変更 でき、希釈不要の検出が可能である。

(3) キメラ AAV の分析

各血清型のカプシドを構成するタンパク質 (VP) を融合し、各血清型の組織指向性を有したキメラ AAVの研究が報告されている¹⁷⁾。そこで、(a)から (g) に示す AAV サンプル、すなわち、(a) AAV2-GFP 溶 液 (1.0×10^{12} cp/mL)、(b) (a) 80% と (f) 20% と の混合溶液、(c) (a) 60% と (f) 40% との混合溶液、 (d) (a) 40% と (f) 60% との混合溶液、(e) (a) 20% と (f) 80% との混合溶液、(e) (a) 20% と (f) 80% との混合溶液、(f) AAV1-GFP 溶液 (1.0×10^{12} cp/mL) および (g) キメラ AAV1/2 (AAV1 の カプシド遺伝子と AAV2 のカプシド遺伝子をコードす るプラスミドを同時に細胞に導入して製造した AAV) を 250 µL 使用し、AVR カラムにより分析した。

得られたクロマトパターンを Fig. 5 に示す。(b) ~ (e) (すなわち AAV1-GFP および AAV2-GFP との混 合物)のクロマトパターンは、(a) AAV2-GFP に相当 するピークと(f) AAV1-GFP に相当するピークの計2 本現れ、かつ各ピークの高さは混合比をほぼ反映して いた。以上の結果から、AVR カラムを用いることで、 異なる血清型の AAV の混合物を含む試料から、当該 血清型の AAV を分析できること、さらに各血清型の 混合比を分析できることがわかった。さらに、キメラ AAV は単一ピークを示したが、各血清型ともピーク の位置や形状が異なっていた。ゼータサイザー Ultra (Malvern 製) を用いた動的光散乱法 (DLS) により AAV の粒子径を求めたところ、いずれも粒子径では 差異はみられなかった。AVR カラムを使用すること で、粒子径といったカプシド形状の差異ではなく、カ プシド構造を反映した分析が可能であることがわかっ た。

(4) 培養液からの直接分析およびモニタリング

浮遊細胞にプラスミドを遺伝子導入したのち、1日 目から7日目まで随時1mL培養液を採取した。500 µLは遠心して上清を回収し、培養上清液とした。残 りの500µLには界面活性剤を添加して37℃、2h振 とう後、遠心して上清を回収し、細胞破砕液および



Fig. 5 Analysis of the chimeric AAV



Fig. 6 AAV-production monitoring

培養上清液の混合物とした。いずれも孔径 0.22 µm の フィルターに供した後、各 200 µL を AVR カラムにア プライし、ピークの検出を試みた。結果を Fig. 6 に 示す。いずれのサンプルにおいても、AAV8 と思われ る単一ピークを確認した。遺伝子導入後の経過日数に 従って、経時的な AAV8 のピークの上昇がみられ、生 産量のモニタリングが可能であることがわかった。ま た、4 日目までは、細胞上清液中の AAV8 の方が少な いのに対し、7 日目にはほとんど差がみられないこと から、7 日目には細胞が溶解して AAV が溶出してい る可能性が示唆された。

(5) 製造ロット間差

生産量(遺伝子数)の著しく低下した製造ロット 品について、 $V_{H}H$ をリガンドとした市販のアフィニ ティークロマトゲルで精製したのち、得られた溶 出画分を透析して AAV 精製品とした。抗 VPs 抗体 (PROGEN 製)によるウェスタンブロッティングによ り解析したところ、VP の分解物と思われるバンドが 複数確認された(Fig. 7a)。当該精製品を AVR カラ ムにアプライしたところ、素通り画分がみられるとと もに、溶出ピークがブロード化し、肩の部分(変性 AAV)とメインピーク(正常 AAV)が検出された(Fig. 7b)。銀染色により分析した結果、VPの分解物はすべ て素通り画分に存在していた。変性 AAV および正常 AAV はいずれもサイズ排除クロマトグラフィ(SEC) で違いがみられず、製造時に生じる構造変化の異常を AVR カラムにより識別している可能性が示唆された。

(6) 感染能との相関

AVR 結合部位の変異による感染能への影響が報告 されている¹⁸⁾。そこで、文献にならって変異を導入し たプラスミドを作製し、感染能の異なる AAV2 変異体 を 18 種類作製した(Fig. 8a)。市販の AAV Titration ELISA Kit (PROGEN 製)により、すべての変異体の 発現を確認した。変異を付与していない AAV2 を含 めた 19 種類の各 AAV 培養液を、AVR カラムおよび V_BH をリガンドとしたアフィニティカラムでそれぞれ 分析した。感染能は文献値を参考にした。その結果、 ピークの溶出時間と感染能とに相関がみられ、野生型



Fig. 7 Analysis of the inhomogeneous AAV

Sample No.	Region	Mutant	Transduction* (% relative to WT)
1	-	-	100
2		Q263A	39
3	VR-I	S264A	72
4		S267A	378
5		S267T	864
6		H271A	10
7		H271F	0.02
8		H271Q	2
9		H271T	0.6
10		N382A	3
11		G383A	0.1
12	VR-III	S384A	25
13		Q385A	14
14		R471A	318
15	VD-V	E499A	40
16	V IV- V	T503S	26
17		D528A	2
18	VR-VI	D529A	0.002
19		D529E	20

a) AAV2 mutants



Fig. 8 Analysis of the AAV2 mutants with different infection rates

AAV2 と比較して感染能が著しく低下した変異体については、素通りすることがわかった(Fig. 8b)。一方、 $V_{\rm H}$ Hをリガンドとしたゲルの場合には、すべての変異体が同様の溶出時間に溶出されており、感染能との相関はみられなかった(Fig. 8c)。

4. まとめ

アデノ随伴ウイルス (AAV) 受容体 AAVR のドメ インのうち、PKD1 および PKD2 を有するタンパク 質 (AVR) の大腸菌発現系を確立した。ELISA 法に よる AAV および AVR の結合性評価系を構築し、進化 分子工学的手法により耐酸型 AVR を創製した。耐酸 型 AVR をゲルに固定化し、当該ゲルを充填したカラ ム (AVR カラム)を使用して各種 AAV の分析を試み た。その結果、AAV を中性で結合させ、酸性で溶出 し、AAV のピークを取得することに成功した。リガ ンドの耐酸化により、100 回以上繰り返し使用しても ピーク形状への影響がなく、安定的に AAV を分析可 能であることがわかった。ピーク面積から、 1.4×10^9 ~ 1.0×10^{14} cp の定量や、AAV 培養液の直接分析が可 能となった。さらに、AAVR を介さず感染する血清型 や、感染能が著しく低下した AAV については AVR カ ラムと結合せず、感染能との相関もみられた。

以上により、AVR カラムを使用することで、感染 能に寄与する AAV 受容体 AAVR に関わる AAV の分析 が可能となった。この技術は、希釈不要の AAV の定量、 変異型 AAV のスクリーニングや生産性モニタリング などに利用でき、これまでの分析手法に必要な工数を 大幅に削減できる。また、レポーター遺伝子を持たな い AAV の感染能評価や、キメラ AAV などのカプシド を改変した AAV の構造認識など、他の分析では見い だせない特徴を検出でき、AAV ベクターの品質管理 に重要なファクターになると考える。この技術が、高 品質な AAV ベクターの取得や品質管理の一助となる ことを期待する。

5. 謝辞

本研究においては、第二開発部セパレーションG 小林 秀峰氏および Tosoh USA Inc. 最上 聡文氏(現 ライフサイエンス研究所)に、多大なご協力をいただ きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。ま た、当該報文を作成するにあたってご尽力いただきま したライフサイエンス研究所 生物機能工学グループ 池浦 隆真氏および同所属 大村 慧太氏に心より感 謝を申し上げます。

6. 参考文献

- Q. Xie, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(16), 10405 (2002)
- 2) K. Adachi, et al., Nat. Commun., 5, 3075 (2014)
- 3) M. A. Bartel, et al., Gene Therapy, **19**, 694 (2012)
- 4) H. Büning, et al., Mol. Ther. Methods Clin. Dev., 15 (12), 248 (2019)
- 5)株式会社シード・プランニング、遺伝子治療薬の 現状と将来展望 2022 (2022)
- 6) T. Kimizu, et al., Int. J. Neonatal Screen., 7(3), 45 (2021)
- 7)平井宏和、日置寛之、小林和人、株式会社羊土社、 決定版 ウイルスベクターによる遺伝子導入実験 ガイド(2020)
- 8) H. Mizukami, et al., Virology, 217, 124 (1996)
- 9) S. Pillay, et al., Nature, 530, 108 (2016)
- 10) S. Pillay, et al., USA Patent 10633662 (2016)
- 11) C. Summerford, et al., Mol. Ther., 24(4), 663 (2016)
- 12) R. Zhang, et al., Nat. Microbiol., 4, 675 (2019)
- 13) S. Pillay, et al., J. Virol., 91 (18), e00391-17 (2017)
- 14) Takashi Okada, *IntechOpen*, Gene Therapy-Tools and Potential Applications Chapter 17 (2013)
- R. O. Snyder, and P. Moullier, *Humana Press*, Adeno-Associated Virus Methods and Protocols (2016)
- A. M. Dudek, *et al., J. Virol.*, **92**(7), e02213-17 (2018)
- 17) B. Hauck, et al., Mol. Ther., 7(3), 419 (2003)
- 18) M. A. Lochrie, et al., J. Virol., 80(2), 821 (2006)