

再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業(遺伝子治療製造技術開発)

研究開発課題 中間報告書

研究開発課題名	高品質遺伝子治療ベクター製造法の確立に向けた戦略的技術基盤
代表機関名	国立大学法人東京大学 医科学研究所 遺伝子・細胞治療センター 分子遺伝医学分野
研究開発代表者名	岡田 尚巳
全研究開発期間	平成 30 年度 ～ 令和 5 年度 (予定)

研究開発の概要

① 高産生細胞株樹立に向けた機能検証とスクリーニング理論の検証

中間目標：AAV/レンチウイルスベクター産生能の関連遺伝子検索と評価法の開発

最終目標：関連遺伝子の付加あるいは破壊による高産生細胞株の樹立

● ウイルス高産生細胞のスクリーニング

CRISPR-Cas9 法を用いてベクター産生用細胞における関連遺伝子をノックアウトする方法を検討した。複数の重要な標的遺伝子を上流より、ガイド RNA (gRNA) 発現プラスミドを構築した後、これを細胞 A にトランスフェクションし、選択用抗生物質存在下で培養を続け、細胞のコロニーを得た。各クローンの標的遺伝子産物を Western blot にて検討した結果、複数の遺伝子に関するノックアウト細胞クローンを複数得た。これらのクローン細胞を用いて AAV2 ベクターを作製し、その産生量を対照の細胞 A と比較した。これまでのところ著しい産生量増加は確認されていないが、さらに他の遺伝子および複数 gRNA 発現プラスミドを用いたノックアウト細胞クローンを作製中である。

● 高産生細胞株樹立に向けたスクリーニング理論の検証

本項目では新規の純国産ホスト細胞樹立を最終目標とし、ゲノム編集技術を利用してハイスループットスクリーニングを行い、ベクター産生向上に関連する遺伝子群を同定する AAV1 ベクター高生産技術開発を目的として、CRISPR テクノロジーを用いて遺伝子破壊細胞ライブラリを作製した。AAV の複製に深く関連している多数の遺伝子を対象に実施した。細胞株間での AAV 産生能を比較し、いずれの遺伝子がベクター高産生に寄与するか解析した。

ノックアウト細胞株の作出

Cas9 安定発現株の樹立のため、細胞 B に対して Cas9 エンドヌクレアーゼをレンチウイルスベクターにて導入し、薬剤耐性を指標に安定発現株の選択を行った。その結果、複数の Cas9 エンドヌクレアーゼ恒常発現株を単離することに成功した。次に、単離した細胞株

について、ハイスループットスクリーニングに最適なものを評価した。

AAV 産生が増加している株の検出

本株を用いてスクリーニング条件、すなわち最適な細胞播種密度・AAV 構成因子導入時期・導入条件・回収時期等を検討し、スクリーニングプロトコールの作成を完了した。

遺伝子破壊に伴う AAV1 産生量の変動

AAV ベクターを高産生するための必要な不可欠な遺伝子の検索を実施し、パスウェイ解析を行っている。得られたスクリーニングパターンから、ベクター高産生関連因子を抽出し検討した。今後、抽出した各遺伝子のパスウェイ解析により各遺伝子がアサインされているパスウェイを同定し、各パスウェイにおける AAV 生産量を算出する。

② AAV ベクター高産生培養法および精製技術の開発

中間目標：接着細胞株における固相支持担体の検証

最終目標：浮遊細胞株への効率的遺伝子導入法の開発

● AAV ベクター産生における諸条件の検討

市販の細胞培養培地選択

細胞 C を用いて AAV ベクターを産生する際の細胞培養培地を検討した。複数の培養液を用いて、それぞれ培養した細胞にて AAV9 ベクターを産生させた。この結果、細胞の接着性、産生量、およびコストを考慮して、培養液 A を使用することとした。

AAV ベクター作製に用いるホスト細胞の検証

細胞 D および機能強化細胞 E を比較した。polyethylenimine (PEI) にて transfection を実施した。両者とも 1 次培養液へのウイルス分泌量には差異を認めなかったが、2 次培養液への AAV1 分泌量は細胞 E の方が優れていた。

AAV ベクター作製に用いるプラスミド組成の異なる 2 つの条件を検討した。

AAV ベクターの作製に関する経費の中で、プラスミドの占める割合は大きく、トランスフェクションに使用するプラスミド量はコストに反映される。そこで、iCELLis Nano を使用して AAV ベクターを作製することを前提として、培養細胞種、プラスミド組成 A (コントロール) およびプラスミド組成 B (少量) を比較した。

組成 B は少量のプラスミドしか使用しておらず、細胞傷害性が低下し、1 次および 2 次培養液への AAV9 ベクターの分泌量はプラスミド使用量の多い組成 A と同程度もしくはこれを凌駕している場合も認められた。一方、組成 A で行ったウイルス作製は各実験で産生したベクター量の変動は少なかった。細胞 E は細胞 D に比べ、全般に高値を示したことから細胞 E を用いて組成 B による再現性の確認を iCELLis Nano を用いた中規模培養装置で

行った。

汎用されているトランスフェクション試薬の比較

現在、市販され多用されているトランスフェクション用 PEI 試薬を使用して、AAV9 プラスミドを様々な条件で細胞 E へトランスフェクションした。A 社 PEI 試薬では物理学的力価に対する生物学的力価が高く、感染力の高いウイルスが産生出来たが、試薬の組成が明示されていないこと、その価格を考慮し、現時点では B 社 PEI 試薬を用いることとした。トランスフェクション試薬に開発の余地が大きいことが判明した。

● 細胞株における固相支持担体を用いた発現培養法の検証 (バイオリアクターの検証) バイオリアクターによる培養過程のデジタルデータの集積

DMD 遺伝子治療において最も臨床応用が期待される AAV9 ベクターについて、バイオリアクターとして iCELLis Nano を活用し、細胞 E を用いた中規模培養系の検討を行った。これまでに、細胞接着面積が 0.53 m² のバイオリアクターを用いて、AAV1 ベクターについて 1 回実施、また細胞接着面積が 0.8 m² のバイオリアクターを用いて、治療遺伝子 X およびモニター遺伝子を GOI とする AAV9 ベクターを 7 回 (遺伝子治療用遺伝子 2 回、モニター遺伝子 5 回) 作製した。培養中はインラインモニタリングを行った。これらの実験を通して、トランスフェクションにおけるプラスミドと PEI について最適な培養条件を検討した。

トランスフェクションによりウイルス産生能を獲得した細胞 E の AAV 分泌の動態を把握するため、経時的サンプリングを行い分泌の推移を確認した。生産スキーム Ver. 3 では、高力価の培養上清が得られ、生産日数が短縮化されるため生産性の点でメリットがあると思われる。ここまで 0.8 m² の培養面積を用いての AAV ベクターが生産可能であったので、iCELLis Nano の最大拡大培養面積である 4 m² に拡大したシステムを運用するための環境を整えた。この 5 倍の培養面積の拡大により、大量に AAV ベクターを作製する条件を決定する。

③ ベクター高感受性細胞の開発と安全性・有効性を向上させる技術の開発
中間目標：ウイルス高感受性細胞の作製
最終目標：ウイルス高感受性細胞の機能評価、免疫細胞の挙動解析

● ウイルス高感受性細胞の作製・評価

細胞にウイルスレセプターを高発現させ、ベクターに対する感受性を亢進させる試みとして、AAV9 のレセプターが末端に露出する細胞を作製し、評価することを計画した。CRISPR-Cas9 により責任遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した。

ノックアウトマウスの骨髄より MSC を分離

ノックアウトマウス成体骨髄から初代培養間葉系幹細胞(BM-MSC)を分離・精製し、不死化した。今後、この糖転移酵素 KO マウス由来不死化 BM-MSC を用いてウイルス高感受性細胞の評価を行う予定である。また、このマウスに AAV ベクターを接種し、生体内での動態および発現を 2 光子励起顕微鏡により観察できるかを検討する。また、AAV ベクター接種箇所における免疫細胞の挙動を観察する方法を検討中である。

- **免疫細胞の挙動解析/生体イメージング解析**

各臓器に適した保定器具を開発し、肝臓、脾臓ならびに腎臓の生体イメージング法

AAV ベクターの全身大量投与では、急性肝機能障害が指摘されている。BSL3 施設内に構築した 2 光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングシステムを用いて、感染動物の生体イメージング法を確立した。この手法により新たな病態生理学的解析が可能となり、免疫細胞の運動性、細胞形態の変化、細胞間相互作用および血流動態の変化などの観察が可能となった。AAV に対する宿主応答を観察するための、肝臓ならびに脾臓の生体イメージング法を確立した。今後、マクロファージや樹状細胞のレポーターマウスに AAV を感染させ、肝臓や脾臓における免疫細胞の挙動や標的細胞を検証する。

各臓器における免疫細胞の挙動を捉える。免疫細胞特異的なレポーターマウスならびに抗体投与法

免疫細胞特異的なレポーターマウスならびに抗体投与法を用いることで、各臓器における免疫細胞の挙動を捉えることに成功した。マウスを麻酔管理下で維持しながら腹腔臓器を吸引保定器具で保定し、2 光子励起顕微鏡で観察した。

感染細胞において蛍光タンパク質を発現する AAV の作製

感染細胞において蛍光タンパク質 A を発現する AAV2 の作製を完了した。レポーター-AAV を感染させた後、マウスの臓器を観察して生体内における感染細胞の蛍光輝度を確認する。

④ 高度品質管理技術の開発

中間目標：ウイルス粒子の純度検証法の開発

最終目標：物理学的ウイルス力価の定量法の確立

- **AAV9 における分析用超遠心機(AUC)による中空粒子含有率の評価**

我々は AAV9 のウイルスゲノムのタイプ、ゲノムサイズおよび GC-含有率に依存しにくい作製方法を提案した (Mol Ther Methods Clin Dev. 2018)。この方法で作製した精製 AAV9 ベクター分画は透過型電子顕微鏡ネガティブ染色像 (TEM) による完全粒子含有率が 100 % を下り、AUC による分析では単一の分布を示さず、完全長のウイルス遺伝子を含む完全粒子や不完全なウイルス遺伝子を含む不完全粒子および中空粒子の混合体であることが示された。

低濃度試料での超遠心分析が可能な条件や、分析後のベクターが再利用可能な条件の検討

低濃度の試料を用いて、AAV9 ベクターの完全粒子および中空粒子について AUC を用いて分析した。測定試料は超遠心分離法を用いて調整した完全粒子および中空粒子分画で、中空粒子、完全粒子の沈降係数を示した。

● AAV ベクターゲノムの解析

AAV9 ベクターの各分画を利用して、AAV ベクターゲノム全長を DNA 解析した。この結果、完全粒子と不完全粒子が存在することが確認された。

⑤ 非臨床試験計画の評価と臨床応用

中間目標：AAV 感染効率や安全性の改善に有効な投与方法の検討

最終目標：非臨床・安全性に関する評価軸の設定

● デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD) 非臨床 POC の取得の過程

長期飼育した筋ジストロフィー犬の病理解析

AAV ベクターを用いた免疫寛容誘導療法の非臨床 POC 取得を推進するため、心筋において長期間 GOI の高発現が維持されることを確認した。筋ジストロフィーは骨格筋の変性・壊死・再生により筋萎縮や筋力低下を引き起こす疾患の総称であり、なかでも DMD は、発症頻度が高く、その3分の1が家族歴のない新生突然変異であること、臨床症状が進行性で重篤であることから、遺伝子治療を行う対象疾患として様々な研究が行われている。国外では既に AAV ベクターを用いてジストロフィン補充療法の治験が行われているが、DMD の場合は特にリバータントファイバーの存在から、補充した治療遺伝子に対して免疫応答が観察され、この結果治療遺伝子の発現が減弱してしまうことが報告されている。今回、AAV ベクターを用いて治療遺伝子を補填し、その効果を最大限に発揮させるために、遺伝子治療を行う際に障壁となる免疫反応を回避する方法を検討した。イヌ DMD モデルを用いて治療用 AAV ベクターの全身投与の際に BM-MSc 併用投与を行い、免疫応答および骨格筋・心筋における導入遺伝子の発現を確認した。この結果、非投与の患犬と比較して DMD 病態や運動機能障害の顕著な改善、投与から2年半後の骨格筋および心筋における AAV ベクター由来のジストロフィンの発現を認めた(特許第 6750782 号, 2020 年 8 月 17 日成立, Mol Ther Methods Clin Dev. 2020)。

⑥ 臨床試験準備と導出マネジメント

中間目標：DMD 遺伝子治療に関する既存の特許情報を収集

最終目標：既存の特許情報を収集、解析

すでに DMD 遺伝子治療に関し、PMDA において事前相談を開始しているが、国際的に整合したレギュラトリー対応を本邦にて実現するために、規制当局と連携をとりながら、治療

用ベクター製造に向けた品質管理手法作成と基準作成のためのデータを取得し、知財戦略の策定を行える体制整備の構築を試みる。作製したベクター等を用いた非臨床評価から“一体的に実施可能な先端的技術”として FIH 試験などへの有効性、安全性に関する評価を試みる。

特許マップの作成については、平成 30 年度は「AAV による遺伝子治療」について、令和元年度は「AAV の製造/培地/宿主/精製方法」についてそれぞれ完了している。この結果からは本事業遂行に関する重大な競合等の情報は得られていない。令和 2 年度は「AAV 改変体」について取りまとめを行っている。FIH 試験実施支援については、第一相試験の文献調査、他の再生医療等製品でのデータマネジメント等の実施状況、非臨床試験段階から治験等の実施における医療機関での対応必要項目の洗い出し等を実施し、遺伝子治療に合わせた対応の検討を行っている。製造、臨床試験を含めた法規・ガイダンスの収集は完了している。このように「臨床試験準備と導出マネジメント」については目標を達成している。

- **特許情報の収集と解析**

AAV による遺伝子治療、AAV の製造/培地/宿主/精製方法

特許情報の収集と解析：基盤特許の情報収集と特許マップの作成を行い、開発対象シーズに活用するが、平成 30 年度は「AAV による遺伝子治療」について、令和元年度は「AAV の製造/培地/宿主/精製方法」について、令和 2 年度は「AAV 改変体」について実施する。令和 3 年度に「AAV 投与部位/スケジュール」に関する特許マップの作成と分析を行い系統的な検討は終了となる。作成した 4 つの特許マップに加えて必要な事項が生じた場合には作成を行う。これらの情報は、本研究事業に支障がなくなった場合には公表を行う。

- **知財戦略案の検討**

上記の特許情報の収集と解析に基づき、開発対象シーズについて重大な競合が存在しないか、知財強化としてはどのような方策が考えられるかについて検討を行う。作成した特許マップ等の情報と解析に基づき、開発対象シーズについて重大な競合が存在しないか、知財強化としてはどのような方策が考えられるかについて検討を行い、令和 5 年度半ばには最終的に研究代表者に報告を行う。「特許情報の収集と解析」で得られた結果、本研究事業から得られた成果、遺伝子治療の世界的な開発状況を研究開発代表者と共有し、特許の強化、あらたな出願の方策について検討を行っている。必要に応じて弁理士の助言を求めており、引き続き検討と出願等の対応を行っていく。

- **FIH 試験実施支援**

遺伝子治療は FIH においても実施例が少なく、特に実施準備を慎重に行う必要がある。データマネジメント等の品質管理体制、スタディマネージャーによる臨床試験実施準備、試験デザイン等の情報収集が必要であり、必要事項の洗い出しと法規制についての取りま

とめを行う。FIH 試験での臨床評価方法の検討：カルタヘナ法対応、スタディマネージャーの配置による再生医療等 GCP 対応等により適切な FIH 試験実施を支援する。適切な臨床 POC および有効性・安全性に係わる臨床評価項目の策定と必要に応じて評価方法の検討を行う。

開発品目が少ない遺伝子治療において、カルタヘナ法対応、スタディマネージャーの配置による再生医療等 GCP 対応等により適切な FIH 試験実施を支援するため、熟練したトランスレーショナルリサーチ・コーディネーターをスタディマネージャーとして配置した。また、FIH 独自のデータ取り扱いのため、データマネージャー兼モニターを配置した。また、製造、臨床試験を含めた法規・ガイダンスの情報収集や RS 戦略相談が必要であるが、情報の収集は令和 2 年度に完了している。しかし、新たな法規・ガイドラインの発出が著しい分野であり引き続き情報を収集していく。

● 非臨床試験の計画と評価

非臨床・安全性に関する PMDA との RS 戦略相談実施を支援し、そこで得られた有効性・安全性に関する検討を基に、評価軸を設定する。実際に非臨床試験デザインあるいは評価項目について汎用できるかの検証も行う。また、製造物の品質コントロールを含めた CMC と一体化して検討するため品質・規格に関する RS 戦略相談の結果も活用する。令和 5 年度には終了し、FIH 実施の規制対応に活用する。

非臨床・安全性に関する PMDA との RS 戦略相談実施の支援を行い、そこで得られた有効性・安全性に関する検討に基づいた評価軸の設定、および非臨床試験デザイン・評価項目について汎用できるかの検証を行うため、事例の収集を行っている。製造物の品質コントロールを含めた CMC を全体として一体化して検討するため、規格としての妥当性の情報を収集している。

● FIH 試験での臨床評価方法の検討

適切な臨床 POC および有効性・安全性に係わる臨床評価項目の策定と必要に応じて評価方法の検討を行うため、データマネージャーを配置し体制整備を配備し、遺伝子治療第一相試験の文献調査を行い、適切な試験デザインを検討している。また、バイオマーカーを始めとした指標について他の試験の状況と規制動向について調査を行っている。