

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書(公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	タカラバイオ株式会社 CDM センター 峰野 純一
研究責任者	学校法人日本医科大学 大学院医学研究科 分子遺伝医学(生化学) 岡田 尚巳
参加機関	タカラバイオ株式会社 学校法人日本医科大学
研究開発課題	AAV 中空粒子を用いる臓器特異的 DDS の臨床応用に向けた開発

1. 研究開発の目的

本研究ではシーズ技術である AAV(アデノ随伴ウイルス)由来中空粒子への薬剤導入方法を活用して、種々の臓器に感染指向性を示す GMP 準拠 AAV 中空粒子を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行うことを目的とする。

2. 研究開発の概要

本課題では、実用化を進める上での開発リスクである AAV 中空粒子の大量製造・精製方法、薬剤導入効率評価系、心筋・中枢神経系等へ指向性があるカプシドの取得、臨床応用への重要なマイルストーンとなるマイクロドーズ臨床試験に向けた POC の取得について研究を実施する。

3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

(1)新規生産システムの構築【日本医科大学】

AAV 粒子産生能が強化されている遺伝子修飾細胞株の浮遊培養系への馴化を行った。Xeno-free 浮遊培養系への切り替え初日に培養液を全量交換し、細胞の維持増殖を確認した。細胞は軽いピペッティング操作により剥離が可能であり、懸濁した細胞を培養液に希釈することで培養の継続が可能であった。

(2)精製法の開発【日本医科大学】

これまで AAV 粒子の精製時に付随する夾雑タンパク質の除去をスモールスケールで検討してきたが、今回ラージスケールで応用可能かどうかを検討した。培養上清の濃縮サンプルを、イオン交換膜に吸着・溶出させることにより劇的に夾雑タンパク質が除去できた。これにより、超遠心操作を一切用いずに最終的に高純度の AAV 粒子を精製することが可能となった (Tomono et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2016)。現在、血清型毎に精製条件を検討している(論文投稿中)。AAV 粒子精製最終製品は SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を用いて品質評価を行った。

(3)薬剤導入効果評価系の構築【日本医科大学】

中空粒子へ導入可能な送達薬剤の候補として、人工核酸以外の分子を探索するため、タンパク質の取り込みの再現の確認と、さらに最適な条件になるよう検討を進めた。蛍光標識されたタンパク質を用い、その評価は細胞への導入後の蛍光顕微鏡による観察と FACS を用いて行った。

検討を進めた結果、適正な分子分画の限外濾過カラムを用いているにもかかわらず、かなりの中空粒子をロスすること、サンプル内の界面活性剤の有無によりカラム後のタンパク質量に差が出てしまうこと、分離条件が変わりやすいなどの問題点が判明した。以上より、中空粒子とタンパク質の分離が可能か、3種のタンパク質について検討を行い SDS-PAGE により確認を行った結果、フリーのタンパク質除去を行うことが可能となった。

(4) 種々の AAV 変異体による体内動態の確認【日本医科大学】

各種 AAV 変異体による組織指向性を確認するため、AAV-Luc を作製した。また、中空粒子そのものの生体内での指向性を確認するために、中空粒子の化学修飾について検討した。さらに PET 用プローブを構築するため、候補物質と AAV 中空粒子の結合可能性について予備的検討を行った。

(5) バキュロウイルス生産系の開発【タカラバイオ株式会社】

バキュロウイルスベクターでの実製造を見据え、大量製造系と精製法の検討を行った。大量製造系としては WAVE バイオリアクターを用いてスケールアップ検討を行い、Sf9 細胞を宿主細胞として WAVE 培養システムにおいて、中空粒子産生能を確認した。WAVE 培養システムは閉鎖系での生産培養が可能であり、スケールアップも可能であることから、将来の GMP 製造の基盤となる培養プラットフォームであると考えられる。精製法としてはスケールアップおよび GMP に対応可能な方法として、遊離核酸除去工程、限外濾過濃縮工程、アフィニティークロマトグラフィーを検討し、精製度の高い中空粒子を得た。

一方で、バキュロウイルスでの AAV 中空粒子製造には昆虫細胞由来の Sf9 細胞を使用予定であるが、Sf9 細胞には外来ウイルス(Sf-Rhabdovirus)の感染履歴があることが報告され(J. Virol., 2014, 88, 6576-85.)、実際に、我々が培養している Sf9 細胞に関しても文献と同様に Sf-Rhabdovirus の配列が確認された。