

# PRESS RELEASE

2020年9月2日

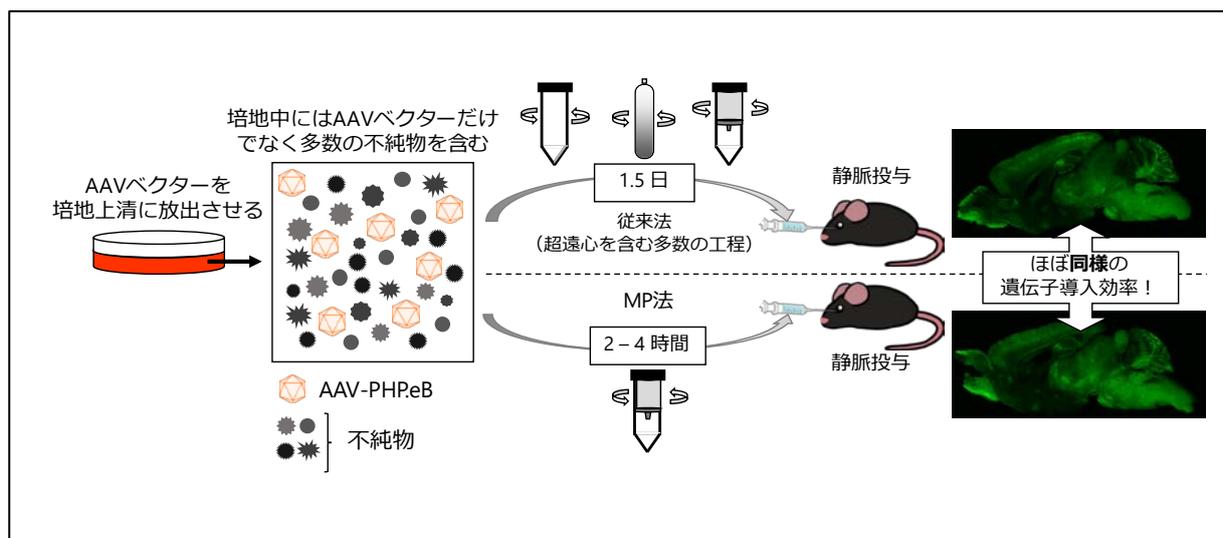
報道関係者 各位

## アデノ随伴ウイルスベクターを迅速に作製する手法を開発 — 遺伝子治療/脳神経科学の基礎研究を加速 —

分野：遺伝子治療、脳神経科学

キーワード：遺伝子治療 [\*1]、ウイルスベクター [\*2]、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター [\*3]、血液脳関門 [\*4]、AAV-PHP.eB [\*5]

群馬大学未来先端研究機構（群馬県前橋市）は、血液脳関門透過型のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであるAAV-PHP.eBを迅速かつ簡便に作製する手法を開発しました。本手法を用いれば、一般的な培養環境のある研究室において、容易にAAV-PHP.eBを作製できるようになります。このことにより、国内でも遺伝子治療用のベクターとしての利用が始まっているAAVベクターの研究開発や、脳神経科学の基礎研究を、大きく加速させる効果が期待されます。



AAVは病原性がなく安全なウイルスで、AAVベクターを用いると様々な細胞に遺伝子を効率的に導入することが可能になります。難病、脊髄性筋萎縮症の遺伝子治療薬としてAAVベクター（商品名：ゾルゲンスマ）が画期的な成果を挙げるなど、AAVベクターを用いる研究が世界中で広がっています。AAVベクターは、AAVの元となるプラスミドを培養細胞に導入すると細胞内で産生されます。培養液と細胞

内に存在するAAVベクター粒子を集め、不純物を取り除いて実験に使用します。不純物があると、AAVベクターが遺伝子を細胞に届ける効率が落ちたり、不純物が原因で免疫反応が起こったりします。そのため、これまでは不純物を取り除くことに多大な労力がかけられていました。AAVと不純物は物理的な差を利用して分けることができます。具体的には、超遠心機や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの高額な機器を用いて、手間と時間をかけて分離します。この面倒な精製過程が必要なため、多くの研究者が独自にAAVベクターを作製して使用するということができませんでした。

## 1. 研究成果のポイント

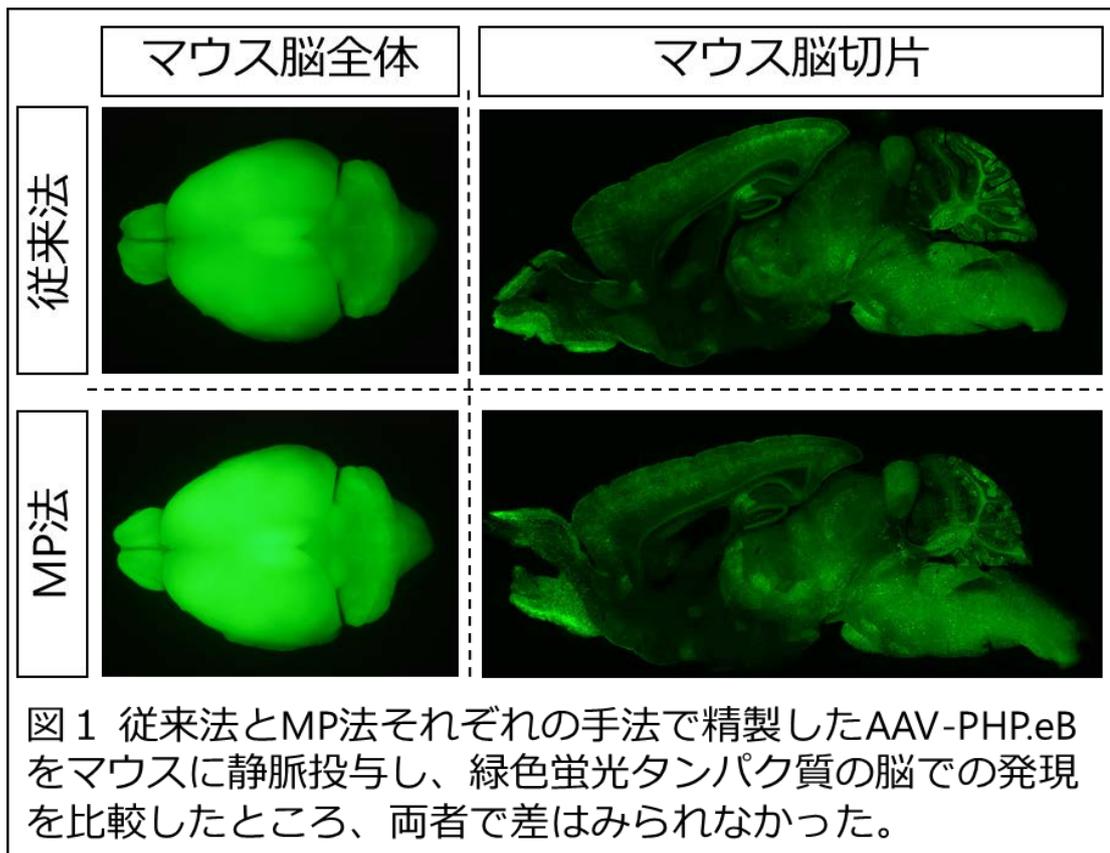
- AAV-PHP.eBを迅速かつ簡便に精製する手法を開発
- AAV-PHP.eBの精製に要する時間を1.5日から数時間に短縮
- 遺伝子治療や脳神経科学の基礎研究を加速させる効果が期待される

## 2. 研究の成果

群馬大学医学系研究科の今野歩講師及び未来先端研究機構の平井宏和教授らの研究グループは、血液脳関門透過型AAVベクターであるAAV-PHP.eBの簡易精製法（Minimally Purification Method; MP法）を開発しました。これまでAAVベクターの精製には、超遠心機による密度勾配遠心などの複雑な工程を含む作業が必要であり、1日半の時間を要していました。これらの精製工程を省くことにより、精製にかかる時間を2～4時間程度に短縮することに成功しました。手間のかかる精製工程をできる限り省いたMP法で精製したAAV-PHP.eB溶液には未だ多くの不純物が含まれるものの、経静脈投与による脳への遺伝子導入効率は、従来法で精製したものと差はありませんでした（図1）。また、この不純物による肝臓や腎臓への毒性はみとめられず、脳での炎症も観察されませんでした。

MP法ではAAVベクターを産生させる培養細胞を低栄養条件下で培養することにより、細胞の中にあるAAVベクターを培地中に放出させます。この培地のみからAAVベクターを回収するため、不純物（余分なタンパク質等）が比較的少ない状態から精製を始められる利点があります。また血液中の不純物が脳に入るのを妨げるバリア（血液脳関門）があり、経静脈的に投与したウイルス溶液に多少の不純物が含まれていても、この関門がフィルター役目を果たして不純物の侵入を防いだものと推測されます。これらのことから、MP法はAAV-PHP.eBの精製法として有用であることが示されました。

本研究成果は、2020年8月15日付の「*Journal of Neuroscience Methods*」の電子版に掲載されました。



タイトル : Efficient whole brain transduction by systemic infusion of minimally purified AAV-PHP.eB

掲載サイト : <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108914>

なお、本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費補助金 基盤研究（C）および日本医療研究開発機構（AMED）革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトの助成を受け、行われました。

### 3. 今後の展開

本研究成果により、多くの研究者が気軽にAAV-PHP.eBを利用できることになるため、遺伝子治療研究や脳神経科学の基礎研究がさらに加速することが期待されます。予備的な実験で他の種類のAAVベクターも低栄養条件下で培地中に放出されることを確認しています。様々な組織へ直接投与した場合の感染能への影響や毒性などは今後検証が必要ですが、MP法はAAVベクターの汎用的な精製手法として利用できる可能性があります。近年、遺伝子改変により様々な機能を有したAAVベクターの開発研究が進められていますが、MP法を用いることにより、研究過程で作られる多数のAAVベクターの特性解析を迅速に行う事ができるようになります。

今回使用したAAV-PHP.eBのように、マウスの血液脳関門を効率的に透過するAAVベクターは数年前に米国で開発され世界中に普及しました。しかし、ヒトを含む霊長類の血液脳関門を透

過できるAAVベクターはなく、世界中で開発が待ち望まれています。群馬大学は小型霊長類であるマーマセットの実験施設やウイルスベクター開発研究センターなど、霊長類の血液脳関門透過型AAVベクターの開発を進めるための環境が整っています。今後、このような革新的AAVベクターの開発にMP法を活用していきたいと考えています。

【本件に関するお問合せ先】

群馬大学医学系研究科 教授

未来先端研究機構ウイルスベクター開発研究センター長 平井 宏和

群馬大学医学系研究科 講師 今野 歩

群馬大学研究推進課未来先端研究支援係

TEL : 027-220-8116

E-MAIL : [kk-kensui4@jimu.gunma-u.ac.jp](mailto:kk-kensui4@jimu.gunma-u.ac.jp)

【用語説明】

**【\* 1】遺伝子治療**：遺伝性疾患などの難治性疾患に対して、遺伝子を用いて治療する治療法。国内でもいくつかの遺伝子治療がすでに承認され、これまで治療が困難だった病気に対する治療法として臨床応用が始まっています。

**【\* 2】ウイルスベクター**：ウイルスのゲノム（遺伝情報を担うDNA やRNA）から増殖や病原性に関わる部分を取り除いたものです。空いたスペースに導入したい遺伝子を組み込むことで、細胞に効率的に任意の遺伝子を導入することが可能となります。

**【\* 3】アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター**：治療用遺伝子のベクター（運び屋）として、現在最も注目されているウイルスベクターです。AAVは元来病原性を持たないウイルスであるため、安全性が高いとされています。

**【\* 4】血液脳関門**：脳の血管内皮に存在し、タンパク質や病原体などを脳に侵入させないためのバリアーとしての役割を果たしています。

**【\* 5】AAV-PHP.eB**：近年開発されたマウスの血液脳関門を高効率に透過することができる特殊なAAVベクターです。マウスへの静脈投与により脳全域に遺伝子導入が可能であるため、脳神経科学研究のツールとして利用が拡大しています。

【研究者からのコメント】

本手法はAAVベクター作製の際に培地中に放出されたAAVベクターを、濃縮フィルター（限外濾過膜；100 kDaカットオフ）に直接かけた溶液がウイルス溶液として使用可能なのか？という単純な興味から始まっています。実際に実施したところ、予想に反して、感染力も遜色なく、われわれが使用した範囲では毒性も認められなかったため、論文として報告することにしました。すでに国内外の知り合いの研究者が、本手法を用いてAAVベクターを作製しており、「外部に依頼して

数ヶ月から半年かかっていたAAVベクターの作製を自分たちでできるようになり、研究の進捗が飛躍的に早まった」と大変喜ばれています。AAVベクターに興味がある研究者の方は気軽にお問い合わせください。（今野）