

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Protocol optimization for the production of the non-cytotoxic JΔNI5 herpes simplex virus vector deficient in expression of immediately early genes

無毒化ヘルペスウイルスベクターJΔNI5 の生産系の至適化

日本医科大学大学院医学研究科 分子遺伝医学分野
大学院生 黒田 誠司

Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 2020 掲載

DOI information: 10.1016/j.omtm.2020.03.014

高い遺伝子搭載許容量と遺伝子導入効率を兼ね備えたヘルペスウイルス（HSV）ベクターは、悪性腫瘍患者に対する癌性疼痛コントロールや腫瘍溶解目的、脊髄小脳失調症患者に対する遺伝子導入目的など様々な医療分野への応用が期待されている。海外では遺伝子治療用製品として承認済みのものもあるが、付加型遺伝子治療の場合には細胞傷害性のためその応用範囲は限定的なものであった。

近年、本課題を解決するべく、その細胞傷害性を完全に排除した無毒化 HSV ベクター JΔNI5 が開発された。ただし、本ベクターは HSV 複製に必須な即時型（IE）遺伝子を複数欠損させているため、通常の培養系では生産することはできない。そこで本ベクターの生産系として新規にウイルス複製細胞 U2OS-ICP4/27 を樹立した。本株はウイルス感染依存的に欠損遺伝子を供給することが可能であり、無毒化 HSV ベクターは本細胞株でのみ効率的に増殖することができる。しかし欠点として、遺伝子欠損 HSV ベクターは野生型 HSV に比べて複製効率がおおよそ 1/1000 と低く、膨大な生産コストが発生する。

本研究では本培養系を用いた様々な細胞培養・回収条件を詳細に検討することにより、高品質な無毒化 HSV ベクターを大量に製造するための培養系の確立を目指した。

まず本培養系において、ベクターを効率良く増殖できるウイルス初期感染条件、培養環境条件、および培地交換頻度を検証した。第一に物理的力価・機能的力価共に最高値を示す初期感染濃度・回収タイミングを同定するとともに、胎児ラット後根神経節初代培養細胞 (rDRG) への遺伝子導入効率を比較することで、この物理的力価と機能的力価の比 (gc per pfu) がベクターの機能性の指標となることを明らかとした。第二に、細胞培養液の pH・温度・グルコース濃度および血清濃度がベクターの増殖に与える影響を検討し、至適培養環境条件を決定した。第三に、培養液の回収頻度に伴うウイルス総回収量について検討した結果、複数回の培養液の回収・交換によりベクターの収量と品質を改善できることを証明

した。

次に、HSV 複製を促進することが報告されている HDAC 阻害剤や BET 阻害剤に着目し、本培養系に適用可能か否かを検討した。その結果、多くの HDAC 阻害剤はベクター収量を増加させたが、特にポリノスタット(SAHA)がベクター収量を有意に増加させることを見出し、さらに SAHA を細胞へ感染前に投与し除去する「前処理」を行なった方がウイルス複製に効果的であることを証明した。

さらに、ベクター回収時に産生細胞を NaCl や CsCl で処理することにより、複製細胞の表面または内部からベクターを速やかに回収できることを見出し、活性度が高く感染能力に悪影響をおよぼさない効率的なウイルス回収法を提案した。

最後に、効果的と考えられた培養条件を組み合わせた「至適プロトコル」と「従来法」とを比較培養した。その結果、「至適プロトコル」で生産されたベクター収量が物理的力価は 2.8 倍、生物的力価は 3.8 倍、gc per pfu は 1.3 倍と改善した。さらに本プロトコルで作製した無毒化 HSV ベクターは従来法で生産したベクターと比較し、rDRG 細胞に対する遺伝子導入効率が有意に上昇することが明らかとなった。

第二次審査では、①脳炎のリスク、②本ベクターの gc per pfu が wild type に比べて劣る原因、③臨床試験に必要な生産量、④本ベクターの rDRG 細胞への親和性と感染経路、⑤塩処理効果のメカニズム、⑥臨床対応に向けた今後の研究の方向性等について質疑が行われ、いずれも的確な回答を得た。

以上、本研究で得られた知見は高品質な無毒化 HSV ベクターを経済的に大量生産するプロセスを設定する上で極めて有益な情報であり、HSV ベクターを用いた遺伝子治療の展開に大きく寄与すると考えられ、本論文は学位論文として十分に価値のあるものと認定した。