

論文内容の要旨

**Protocol optimization for the production of the non-cytotoxic J $\Delta$ NI5 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J $\Delta$ NI5 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 年掲載予定

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）ベクターは長年研究され、癌性疼痛コントロール目的や腫瘍溶解目的など様々な医療分野への応用が期待されてきた。そして現在、有望な遺伝子治療薬および抗腫瘍薬が登場するまでに なった。しかし従来の HSV ベクターの致命的な問題点として、その高い細胞傷害性があり、これが弊害となりその応用範囲は依然、限定的なものであった。近年、我々は本課題を解決すべく、その細胞傷害性を完全に排除した無毒化 HSV ベクター JΔN15 の開発に成功した。本ベクターの開発により HSV ベクターは極めて安全性・汎用性の高いベクターシステムとなり、現在様々な疾患を対象とした遺伝子治療研究が活発に進められている。一方、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。そこで我々は本ベクターの生産系として新規にウイルス産生細胞 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。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 ベクターを大量培養・安定供給する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、及び培地交換頻度を評価した。初期感染濃度に検討したところ、 $MOI=10^{-5}$ での感染 9 日目に物理的力価・機能的力価共に最高値を示すことが判明した。またこの物理的力価と機能的力価の比（gc / PFU）がベクターの機能性の指標となりうることを明らかとした。また細胞培養条件については、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影響を与えるか検討した。その結果、培地 pH に関して 7.5~8.0、培養温度に関しては 33~35℃がベクター増殖に最適であることがわかった。一方、グルコース濃度・血清濃度は、ウイルスの成長速度や収量に大きな違いは見られなかった。これはウイルス製剤生産の際に不純物となる血清を、本システムの培地から除去できることを示唆している。続いて、培養液の回収頻度に伴うウイルス回収量について検討した。その結果、培養開始後 6、8、10 日目の 3 回収した場合、ベクター回収量・gc / PFU のそれぞれで最も優れており、これらは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、無毒化 HSV ベクターの増幅における化学化合物の影響について検討した。本検討では、これまでに HSV 複製を促進することが知られているヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤やプロモドメインおよび末端外モチーフ（BET）阻害剤に注目し、本培養系に適用可能か検討した。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、その中でも特に、VPA（10mM）、BEL（10μM）、NaB（0.1mM）、SAHA（0.1μM）でベクター収量を有意に増加させることを明らかとした。これらの薬剤の中で最も高い収量を

示した SAHA について、さらなる詳細な検討を進めた。その結果、SAHA を細胞へ感染前にだけ投与し除去する「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明らかとした。

さらに、産生細胞を NaCl や CsCl で処理することにより、産生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、活性度の高く感染能力に悪影響を及ぼさない簡便なウイルス回収法を提案した。

最後に、収量が増加すると考えられる今回の検討項目を組み合わせた「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、機能的力価は 3.8 倍、gc/pfu は 1.3 倍と増加した。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、神経細胞に対する遺伝子導入効率が大きく上昇することがわかった。

以上の成果は、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、本ベクターを用いた遺伝子治療の実現への一助になると考える。