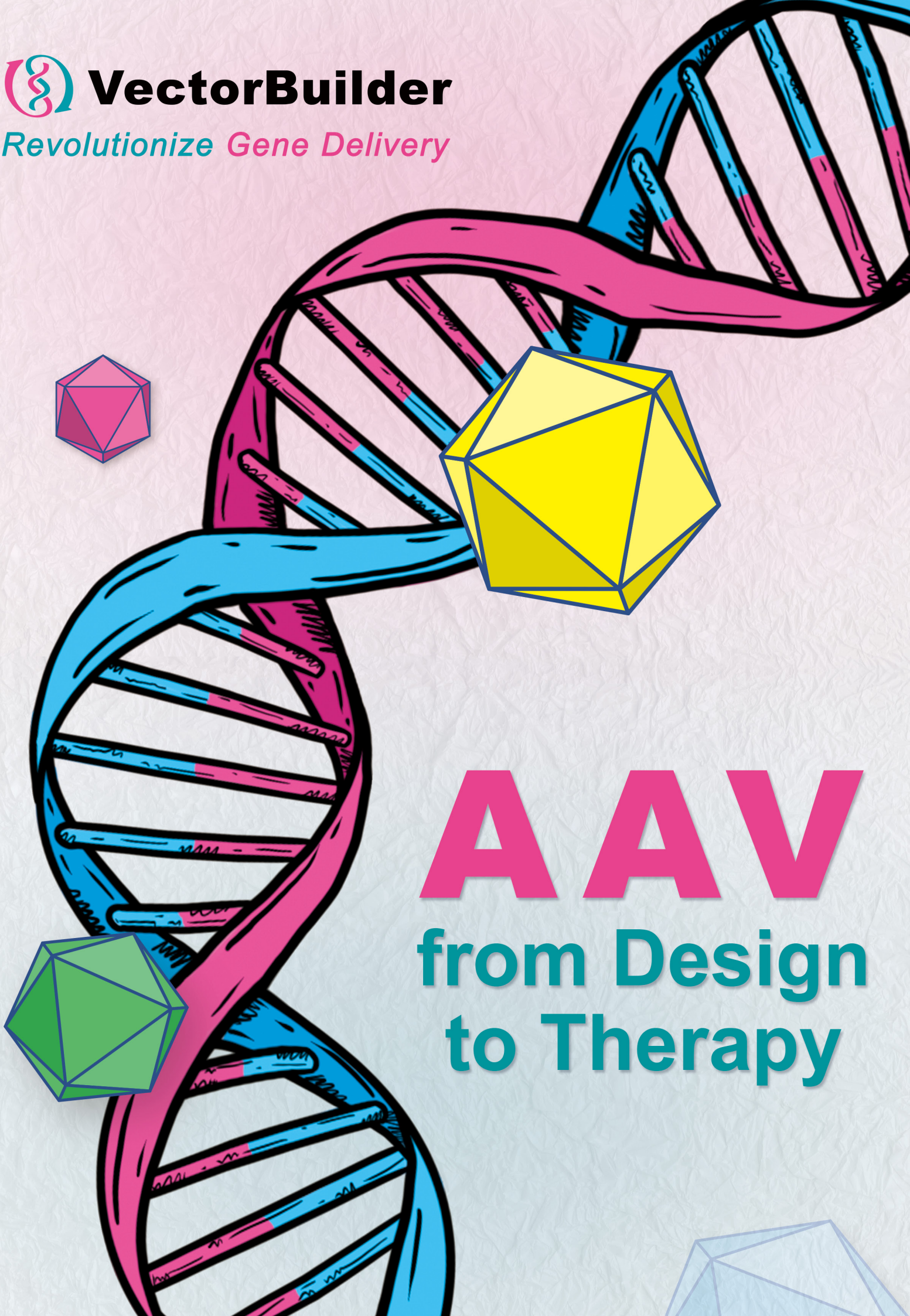
VectorBuilder

Revolutionize Gene Delivery

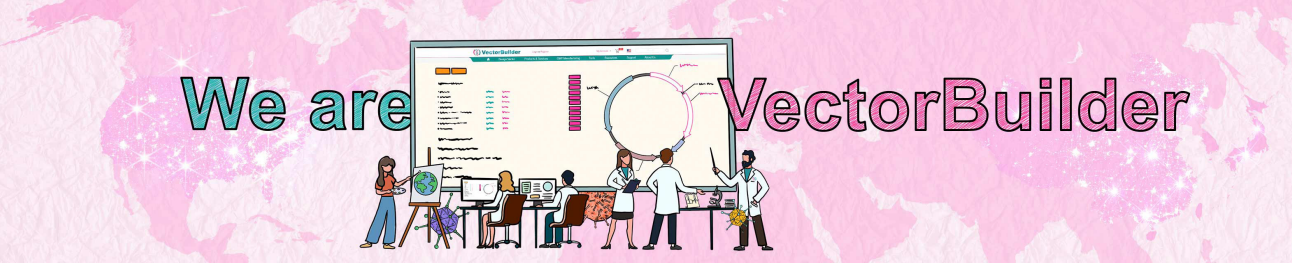


AAV

from Design to Therapy

会社概要

VectorBuilderは、遺伝子デリバリーテクノロジー開発・受託製造のグローバルリーダーです。VectorBuilderは、世界中の何千ものラボやバイオテクノロジー/製薬会社から信頼されるパートナーとして、ラボベンチから患者のベッドサイドまで、ライフサイエンス研究から臨床に至る遺伝子デリバリーのニーズを、ワンストップでご提供します。



提供しているサービス

カスタムプラスミドDNAベクターとウイルスベクターの受託製造

VectorBuilderは、ウイルスと非ウイルスの遺伝子デリバリー用カスタムベクターの世界最大のプロバイダーです。現在、世界中の数万人の研究者のために、年間80,000種類を超えるカスタムベクターを受託製造しています。当社のベクター受託サービスの強みは:

- **オンラインで一元化されたベクターデザインと見積もり発注プラットフォーム:** 研究者がカスタムベクターをオンラインでデザインし、一元化した見積もり発注システムをご提供しています。ラボベンチで、時間だけがかかるクローニングやウイルスのパッケージというルーチンワークから研究者を解放します。イノベーション賞を受けたこのオンラインプラットフォームには、ユーザーフレンドリーなモジュラー設計方法を採用したVectorデザインスタジオがあります。研究初心者でも、パソコンマウスの数回のクリックでカスタムベクターが簡単にデザインでき、ウイルスパッケージングやプラスミド精製などの関連サービスを追加して、オンラインで見積もり発注ができるようになっています。ユーザーがデザインしたベクターは、当社のベクターデザインスペシャリストが一つ一つデザインの検証を行い、デザインミスの修正や、代替オプションのご提案を行っているため、誤ったデザインのベクターを構築するミスを未然に防げます。

- **包括的なベクターシステム:** VectorBuilderのベクターバックボーンは、AAV、アデノウイルス（ガットレスを含む）、レンチウイルス、MMLV、バキュロウイルス、VSV、HSV、piggyBac、Sleeping Beautyなど、ウイルスおよび非ウイルスの遺伝子導入用ベクターシステムを網羅しています。これらのベクターは、ほぼ全てのモデル生物に対する、過剰発現、shRNAノックダウン、CRISPR、組換えタンパク質発現、in vitro転写などのアプリケーションを可能にしています。さらに、抗体産生、CAR-T、遺伝子治療、mRNAワクチン、腫瘍溶解性ウイルス治療などの臨床応用のバックボーンベクターもご用意しています。

- **膨大なベクターインベントリ:** VectorBuilderは、ウイルスおよび非ウイルスベクターシステムに対応する700種類以上の膨大なベクターバックボーンのコレクションを保持しています。さらに、よく使われるモデル生物の全遺伝子に対応するORF、shRNA、gRNA、そしてよく使われるプロモーター、レポーター、リンカー、エピトープタグなど、400,000種類を超えるベクターコンポーネントのコレクションも保持しています。現在、当社でカスタム構築しているプラスミドDNAベクターの80%以上は、すでに当社でコレクションしている既存のバックボーンとコンポーネントから構築されています。そのため、受託構築コストと作業日数が大幅に短縮されています。

CROサービス

カスタムベクターとウイルスの受託作成サービスのみでなく、VectorBuilderは、遺伝子デリバリー方法を用いた、基礎研究と新薬発見CRO（医薬品開発業務受託機構）サービスをご提供します:

- **多彩な遺伝子デリバリーソリューション:** ヒトとマウスの既製全ゲノムshRNAライブラリーとgRNAライブラリー、さらにご希望の生物の様々なカスタムライブラリー構築、in vitroおよびin vivoライブラリースクリーニングサービスを提供します。また、安定細胞株の樹立サービス、BAC編集、mRNAの合成/カプセル化、および新規ウイルスのリバースジェネティックスによるレスキューサービスも提供しています。さらに、コロナウイルス研究関連製品として、コロナウイルスのスパイク（S）タンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスやVSVなどもご提供しています。

- **前臨床ベクター試験サービス:** VectorBuilderは、ウイルスの生体内分布、AMDE / PK / PD、毒物学など、ベクターの有効性と安全性プロファイルに必要な前臨床非GLPおよびGLP試験を受託します。このサービスは、非ヒト霊長目（non-human primate: NHP）や、マウス、ラットなどのモデル動物を使い、ご依頼のin vitroおよびin vivoシステムの試験にご対応します。

- **高付加価値R＆Dサービス:** AAVキャプシド指向性進化、ウイルスGタンパク質指向性進化、プロモーターエンジニアリングとスクリーニング、mRNAおよびウイルスベクターのコドン最適化など、特定の臨床アプリケーションにカスタマイズした新しい遺伝子デリバリー方法の高付加価値R＆Dサービスの受託を開始しました。これらの研究は、ヒトへのアプリケーションを目標とした、非ヒト霊長目（non-human primate: NHP）の使用にも対応しています。

CDMOサービス

VectorBuilderは、GMPベクター製造の豊富な経験を持つフルサービスのCDMO(医薬品受託開発製造機構)です。当社は複数の最先端施設を持ち、研究グレードのベクターから、前臨床試験のためのGMP-likeベクター、臨床試験用Full-GMPグレードのベクターに至るまで、創薬パイプライン全体で多くのユーザーをサポートしてきました。米国、ヨーロッパ、日本、中国、韓国の世界中のクライアントベースにIND対応のベクターを提供しています。当社のCDMOサービスには、プロセス開発、分析開発、セルバンキング、充填/仕上げ、規制サポートが含まれます。当社が対応しているGMP製造は:

- **プラスミドDNA:** VectorBuilderはGMPグレードのプラスミドDNA製造を、現在上限 10 g でご提供しています。

- **ウイルスベクター:** 現在、AAV、レンチウイルス、MMLV、アデノウイルス、HSVなど複数のウイルスベクターシステムのGMP製造に対応しています。接着性または浮遊性細胞のウイルスパッケージングを、上限1,500 Lでご提供しています。

- **mRNA:** 当社のmRNA CDMOサービスは、シークエンスのエンジニアリング、最適化、DNA鋳型構築、mRNA in vitro転写（対象となる場合は修飾ヌクレオチドも使えます）、そして 脂質ナノ粒子（LNP）カプセル化に対応しています。

特許ライセンスアウト

強いR&D技術と知識を持つVectorBuilderは、豊富な遺伝子デリバリー技術の知的財産ポートフォリオを所有しています。当社の知財ポートフォリオの一部はライセンスアウトにも対応しています。特に引き合いの多い当社ライセンスは、新規AAVセロタイプ（血清型）、新規ウイルスGタンパク質、人工改変組織特異的プロモーター、高収量組み換えタンパク質産生細胞株などです。

我々の使命

VectorBuilderは遺伝子デリバリーの未来の形を提案します。我々の使命は、ライフサイエンス研究と医療の両方に必要とされる全ての遺伝子デリバリーツールのニーズに対して、End-to-endのソリューションを提供することです。

当社は、早い製造期間と驚くような手ごろな価格を維持しつつ、革新的で高品質な製品とサービスの提供に努めます。ユーザーに最適な遺伝子デリバリーソリューションを提案するために、当社は「コンシェルジュ」顧客ケアチームを組織し、PIやグループリーダー経験者、数十年の経験をもつ研究者など、Ph.D.レベル以上のチームメンバーが、ユーザーサポートにあたります。その結果、高インパクトジャーナルに掲載されたサイテーションを報告されるユーザーからの評価が増加しています。

現在、VectorBuilderは、北米、欧州、中国、日本、韓国、オーストラリア、イスラエルに支社を持つ多国籍企業として運営されています。当社の顧客は、大学、研究機関、バイオテクノロジー/製薬会社、政府機関など、世界中の数千の組織から50,000を超える顧客に受託サービスを提供しています。

目次

AAV Basic Biology 02

AAV Vectors 04

AAV Vector Systems 04

AAV Vector Design 05

AAV Offerings for Research 10

AAV Virus Packaging 10

AAV Serotype Testing Panel 12

shRNA (3+1) AAV Packaging 14

Control AAV Virus 14

AAV Virus-Like Particles (VLPs) 15

AAV GMP Manufacturing 16

Virus Manufacturing 16

GMP Facilities 17

AAV CRO Services 18

Library Construction 18

AAV Capsid Evolution 18

AAV Biodistribution Profiling 20

AAV Knowledge Base 22

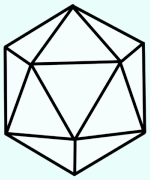
AAV Serotypes and Tropism 22

Protocols for AAV In Vitro and In Vivo Applications 23

User Citations 32

AAVの基礎生物学

アデノ随伴ウイルス（AAV）はパルボウイルス科に属するディペンドウイルス属の一種です。AAVウイルス粒子はエンベロープを持たず、小型（20nm程度）で20面体構造のカプシド中に1本鎖DNAをゲノムとして有します。分裂期にある細胞にもそうでない細胞にも感染することができ、ヒトや他の霊長類によく感染が見られますが病原性は報告されていません。AAVは宿主細胞内へ入ると非常に低い免疫原性で長期間導入遺伝子を発現することができます（野生型AAVと異なり、組換え型AAVゲノムは宿主細胞内ではエピソーマルDNAとして存在します）。このような性質を全て踏まえ、AAVは遺伝子治療に使用されるウイルスベクターとして汎用されるようになってきています



Adeno-associated virus

AAVのゲノム

AAVのゲノムは約4.7kb長のプラス鎖またはマイナス鎖の一本鎖DNAです。AAVウイルスゲノムは両末端にITR（Inverted Terminal Repeats）配列を持ち、この配列がウイルス複製、カプシドアッセンブリー、そして宿主細胞の染色体へのウイルスDNAの挿入に重要な働きをします。AAVのウイルスDNAはRepとCapの二つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含みます。Rep ORFは4つの重なる遺伝子：Rep78，Rep68，Rep52，および Rep40から成ります。Cap ORF はカプシドアッセンブリーに必要な3つの重なる遺伝子：VP1，VP2，およびVP3から成ります。AAVはDNAポリメラーゼ遺伝子を持たないため、AAV ゲノムの複製には宿主細胞かヘルパーウイルスのDNAポリメラーゼを必要とします。

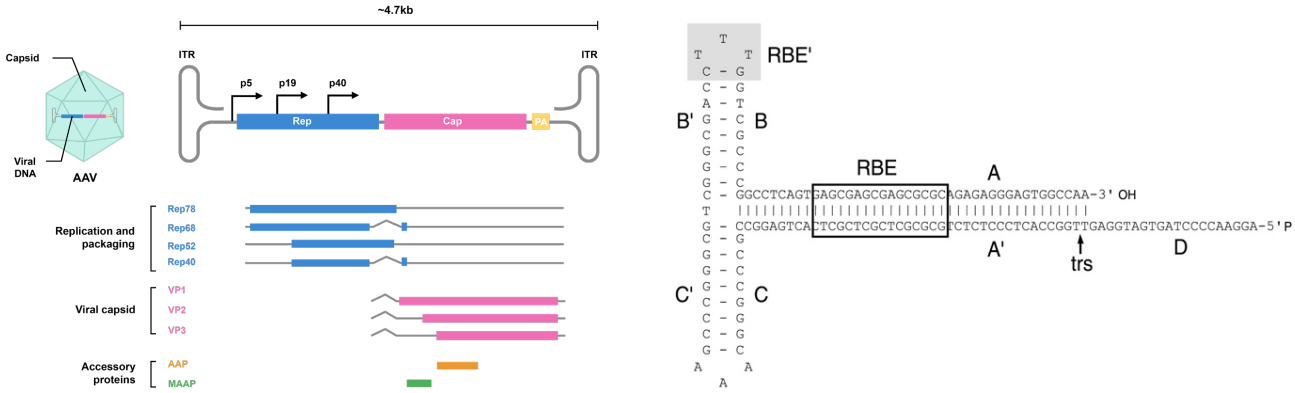


図 1. 野生型 AAVゲノム（左）とITRの構造（右）（BioRender, 2022 & Gonçalves MA, 2005より転載）.

AAVのライフサイクル

野生型のアデノ随伴ウイルスはライフサイクルを維持するためにヘルパーウイルスを必要とします。アデノ随伴ウイルスは細胞へ感染した後、ウイルス複製のための溶原化サイクルにアデノウイルスやHSVといったヘルパーウイルスが必須です。ヘルパーウイルスが無い場合はアデノ随伴ウイルスの遺伝子発現には制限が生じます。溶原化サイクルが始まると、アデノ随伴ウイルスのゲノムの一部がITRとRepタンパク質（Rep78）を介してヒト染色体19番のAAVS1サイトにインテグレートされます。研究用に使用されているリコンビナントAAVは通常このRep遺伝子を含まないため、細胞内では遊離DNAとして存在し、導入されたAAVゲノムは長期的に導入遺伝子を細胞内で発現させます。

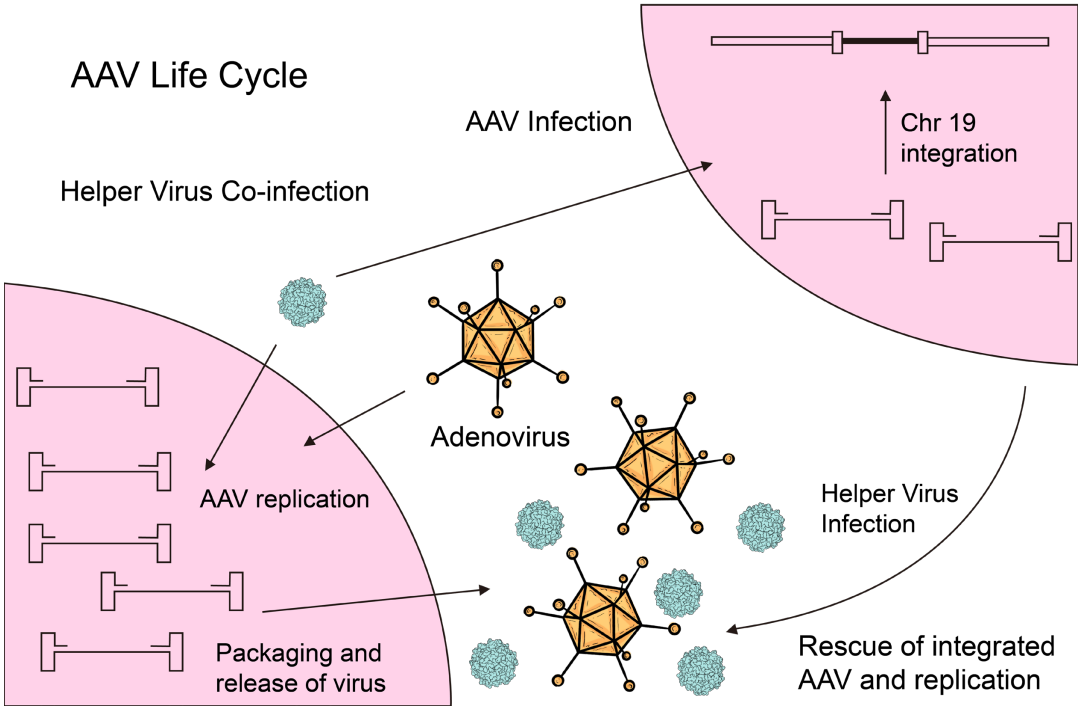
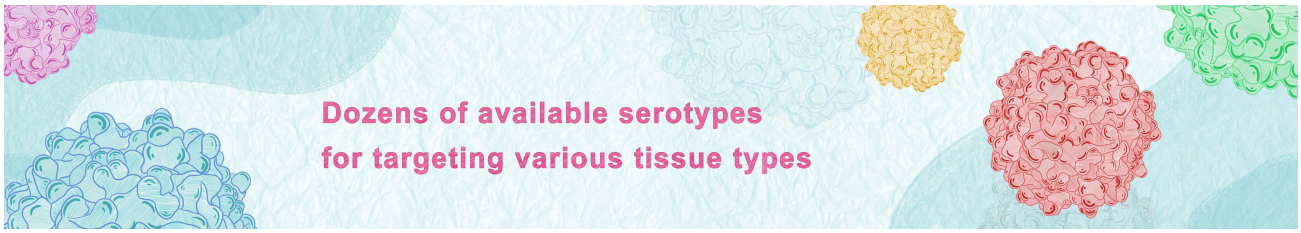


図 2. AAVウイルスのライフサイクル (Daya S & Berns KI, 2008より転載)

セロタイプと組織指向性

アデノ随伴ウイルスはヒトや他の霊長類に広範にみられます。自然界では何百というAAVバリアントやセロタイプが知られています。それらの中で、AAV2、AAV3、AAV5およびAAV6はヒトの細胞でみられ、AAV1、AAV4そしてAAV7から12は他の霊長類で観察されており、AAV2がこれまでに最も研究されています。異なるAAVセロタイプは異なる細胞または組織指向性（感染能）を示すため、AAV遺伝子治療では特定の細胞や組織を標的にする際に利用されています。遺伝子導入効率を上げるため、研究者は遺伝子発現、標的組織指向性、そして免疫原性を向上させる人工的なセロタイプを開発してきました。例えば、AAV6.2はAAV 6 カプシドタンパク質に変異を入れることで導入遺伝子の発現を増加させ、AAV-DJは何種類ものカプシドタンパク質配列を結合させることによって、広範な組織指向性と免疫原性を向上させています。

セロタイプと組織指向性については 22 ページで詳細をご覧ください。



AAV ベクター

AAV ベクターシステム

VectorBuilder は種々のAAVベクターシステムをご提供しています

- 哺乳類遺伝子発現
  - ssAAV または scAAV ベクター
  - キメラ バキュロウイルス-AAVベクター
- 哺乳類ノンコーディングRNA発現
  - ssAAVベクター
- 哺乳類誘導性遺伝子発現（Tet-Based）
  - Tet-On (All-In-One) AAV ベクター
  - TRE駆動性目的遺伝子(GOI)発現ベクター
  - Tet 調節タンパク質発現用ベクター
- 哺乳類コンディショナル遺伝子発現 (Cre-Lox Based)
  - Cre-オン遺伝子発現AAVベクター
  - Cre-オフ遺伝子発現AAVベクター
  - Cre-スイッチ遺伝子発現AAVベクター
- 哺乳類CRISPR遺伝子編集
  - gRNAとCas9共発現AAVベクター (single SagRNA)
  - シングルgRNA AAVベクター
  - デュアルgRNA AAVベクター
  - Cas9 発現 AAVベクター
- 哺乳類 shRNA ノックダウン
  - U6型 shRNA ssAAVベクター
  - U6型 shRNA scAAVベクター
  - シングルmiR30型shRNA AAVベクター
  - デュアルmiR30型shRNA AAVベクター
  - トリプルmiR30型shRNA AAVベクター
  - クアッドmiR30型shRNA AAVベクター
- 哺乳類CRISPR遺伝子調節
  - CRISPR転写活性化AAVベクター(dSaCas9-SAM system)

AAV ベクターデザイン

ssAAV または scAAV

AAVゲノムは線状１本鎖DNA（ssDNA）です。ssAAVが標的細胞に導入されても、相補鎖が合成されるまで一本鎖ウイルスDNAは転写されません。そのため、相補鎖の合成が導入遺伝子発現の律速段階となります。当社のscAAV導入ベクターはssAAVより改変したもので、2つの重要な違いがあります。まず、3’末端のITRからtrs（terminal resolution site）を欠失させ、複製時にプラス鎖とマイナス鎖のDNAをそれぞれ1本鎖として合成するようになっています。そして、その相補鎖は分子間相互作用によって2本鎖DNAを形成することが可能です。そのため、scAAVを宿主細胞に感染させると相補的なDNA鎖を合成するステップを経ることなく、目的遺伝子を発現させることができます。ssAAVの導入効率を左右する主な理由は、導入先で相補鎖の合成過程を成功にかかっていたため、scAAVはssAAVに比べて、目的遺伝子をより早くかつ高効率に発現させることが可能になりました。2つ目の違いは、野生型のAAVでは4.7kbまでの長さの1本鎖DNAを包括することができますが、scAAVでは2つの相補鎖をコンカテマーとしてパッケージングするため、5'ITRから3'ITR間に挿入できる遺伝子配列の長さはssAAVの約半分になってしまいます。ssAAVに比べて、導入できる遺伝子サイズはさらに制限されます。

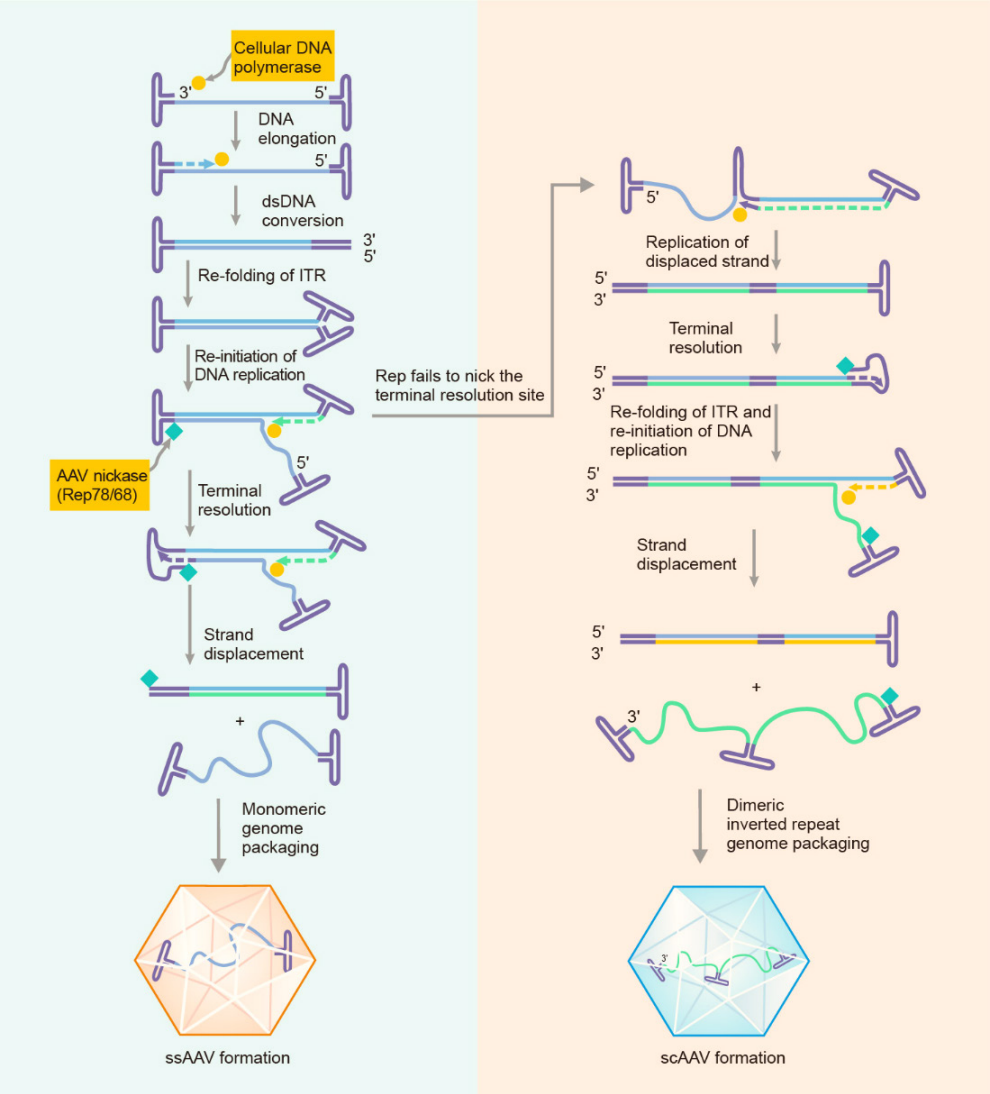
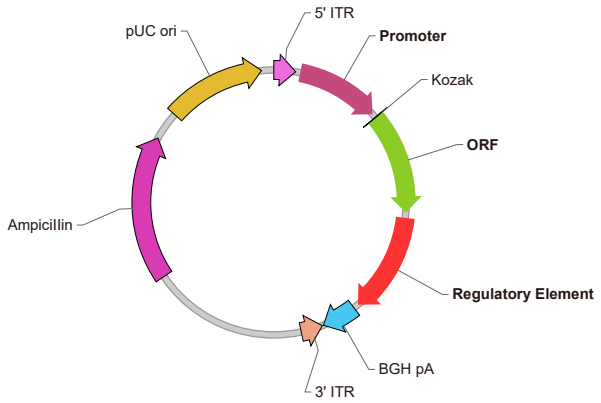


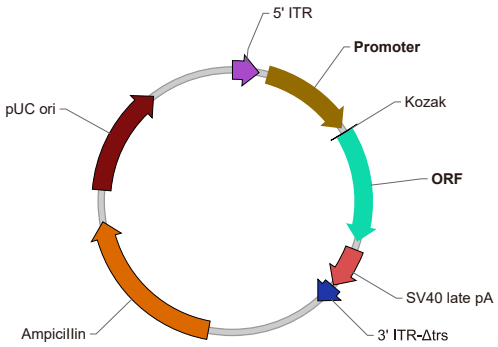
図 3. ssAAVとscAAVのウイルスゲノム形成 (McCarty DM, 2008より転載).

AAVベクターの搭載ゲノムサイズ

AAVはベクタービルダーのウイルスベクターの中で、搭載できるウイルスゲノムサイズが最小です。AAVが許容できるITR間の最大サイズは4.7kbのため、ユーザーが選択できる遺伝子やコンポーネントの合計サイズはssAAVで~4.2 kb、scAAVで~2.2 kbに制限されます。



ssAAV



scAAV

AAVによる遺伝子デリバリーのメリット

- **安全性:** AAVは研究利用されるウイルスの中で、最も安全なウイルスベクターシステムです。本質的に複製能を欠如しており、人への病原性は認められていません。
- **宿主細胞のゲノム破壊の低リスク:** 宿主細胞へ導入されたAAVベクターは、核内でエピソーマルDNAとしてとどまります。宿主ゲノムへの組み込まれないため、ヒトでの応用に望ましく、ゲノム破壊によって生じる発がんリスクを抑えることができます。
- **高いウイルスタイター:** 当社では、高タイターのパッケージングプロトコールを開発し使っているため、ウイルス作製サービスでは、10^{13}ゲノムコピー/ml（GC/ml）以上のタイターでウイルスを回収することができます。
- **広範な組織指向性:** 適切な血清型にパッケージングされれば、ヒト、マウス、およびラットなどの一般的に使用される哺乳動物種の様々なタイプの細胞および組織に導入することができます。しかしながら、使用する血清型によっては、ある種の細胞への導入は難しいことが知られています。
- **in vitro と in vivoでの両方で使用が可能:** AAVは主に生きた動物へ形質導入する場合に使用されますが、in vitroにも効率よく使用できます。

プロモーターの選択

AAVベクターはPol II RNA ポリメラーゼを転写に使用するため、GOIの発現駆動にはユビキタス又は組織特異的なプロモーターを使用することが可能です。しかし、これらのプロモーターの転写効率は細胞によって異なることが観察されています。ベクタービルダーではAAVベクターに使用できるプロモーターを数多くご用意しております。

哺乳類細胞ユビキタス プロモーター

ユビキタスプロモーターはその強力な転写活性から標的遺伝子発現のためにウイルスベクターに広く使用されています。次の表にユビキタスプロモーターの詳細を示します:

名称	説明	サイズ (bp)
CMV	強力プロモーター; 細胞種によっては強さが異なる可能性あり	589
CMV+intron	強力プロモーター; 細胞種によっては強さが異なる可能性あり; β-グロブリンイントロンの存在はスプライシングによるmRNAの核内輸送を促進し、真核生物における遺伝子発現を高めると予想されている	1242
EF1A	強力プロモーター	1179
EFS	中程度のプロモーター	232
CAG	強力プロモーター	1733
CBh	強力プロモーター	789
CBA	強力プロモーター	850
SFFV	強力プロモーター; 特に骨髄系の細胞に高い遺伝子発現を駆動する	500
MSCV	中程度のプロモーター; ほとんどのマウスまたはヒト由来のES細胞と哺乳類細胞で遺伝子発現を駆動する	515
SV40	中程度のプロモーター	344
mPGK	中程度のプロモーター	511
hPGK	中程度のプロモーター	505
UBC	弱いプロモーター	1178

哺乳類 組織特異的プロモーター

特異的なAAVセロタイプ選択に加えて、組織特異的なプロモーターを使用することで標的組織で効率的に標的遺伝子を発現させることが可能となります。通常のプロモーターと異なり、組織特異的プロモーターは特定の臓器または組織でのみ標的遺伝子を駆動するため、AAVによって導入された遺伝子の非特異的発現をかなり抑制することができます。Vectorbuilder が提供する組織特異的プロモーターは、神経系、循環器系、筋肉、肝臓、肺、骨組織、網膜など、10以上の組織や臓器をカバーしています。弊社の提供する組織特異的プロモーターを以下の表に示します:

循環器系

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
cTnT	心臓	心筋細胞	413
αMHC(short)	心臓	心筋細胞	2833
αMHC(long)	心臓	心筋細胞	5464
Hcn4	胚性心臓	心筋細胞	2780
CD68(short)	血液	単球・マクロファージ	659
CD68(long)	血液	単球・マクロファージ	3079
Tie1	血管	血管内皮細胞	1142
CD144	肺, 心臓, 卵巣, 脾臓, および腎糸球体	血管内皮細胞	2510

神経系

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
Hb9	脊髄	運動ニューロン	4003
Camk2a(short)	脳	錐体神経細胞	1337
Th	脳	海馬のCA1錐体細胞	3015
GFAP(short)	脳	アストロサイト	681
GFAP(long)	脳	アストロサイト	2178
Iba1	脳	ミクログリア	1889
SYN1	脳	成熟神経細胞	469
NSE	神経系	様々なニューロン	1807
Nes	胚時期の神経系	神経幹細胞/前駆細胞	1566
Cnp	神経系, 精巣および胸腺	オリゴデンドロサイトとシュワン細胞	3046
Tuba1a	胚と新生児期の神経系	アストロサイトとオリゴデンドロサイト以外の発達中の神経細胞	1121

筋組織

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
MHCK7	骨格筋と心筋	分化した後天性線条筋細胞	771
Myog	筋肉	筋芽細胞	1139
ACTA1	筋肉	筋芽細胞	2162
SM22a	成体平滑筋	血管平滑筋細胞	2960
EnSM22a	成体平滑筋	血管平滑筋細胞	594

肝臓

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
Afp	肝	肝細胞	2810
Alb	肝	成熟肝細胞	2336
TBG	肝	肝細胞	460

網膜

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
ProA1	網膜	錐体視細胞	2000
hRHO	網膜	桿体視細胞	839
hBEST1	網膜	RPE	623

骨組織

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
Col2a1	軟骨	軟骨細胞	1033
Runx2	骨	初期骨芽細胞	2514
CD11b	骨髄	成熟骨髄系細胞 (好中球、単球、マクロファージ)	1795
Col1a1	骨、歯、腱	骨芽細胞、線維芽細胞	3632
OC	骨、軟骨	骨芽細胞、骨細胞、肥大化軟骨細胞	2141

肺

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
SPB	肺	AT II細胞（肺胞タイプII上皮細胞）、クララ細胞（気管支上皮細胞）	635

腎臓

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
NPHS2	腎臓	有足細胞	2589

膵臓

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
HIP	膵臓	β 細胞	1867
Ins2	膵臓	β 細胞	705
Pdx1	胚発生期の膵臓、成体膵臓の膵島	膵臓前駆細胞、膵臓β細胞	2930

脂肪

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
aP2	脂肪	脂肪細胞	3708
Adipoq	脂肪	脂肪細胞	5411

乳腺

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
MMTV	乳腺	唾液腺管細胞、乳腺上皮細胞	1315
Wap	乳腺	乳腺組織の肺胞上皮細胞	2444

表皮組織

名称	組織	細胞	サイズ (bp)
K14	表皮	ケラチノサイト	2268
mTyr	表皮	メラノサイト、メラノーマ細胞	560
BK5	表皮	ケラチノサイト	5200

研究用AAV関連商品

AAVウイルスパッケージング

組み換えアデノ随伴ウイルス（Adeno associated virus, AAV）は、in vitroおよびin vivoの両系で遺伝子導入に用いることができ、最も用途が豊富で広範なアプリケーションに使用されているウイルスベクターです。VectorbuilderではAAVを用いた遺伝子治療実験に有効な高品質のAAVパッケージングをご提供しています。ウイルスタイター、純度、ウイルス生存率、および均質性に優れた組換えAAVを製造するプロトコールを大幅に改良し、独自の技術と試薬をAAVベクターシステムのために開発しました。

ご提供しているアデノ随伴ウイルスの種類

- 一本鎖AAV (ssAAV) と 自己相補型AAV (scAAV)
- 18種の血清型（セロタイプ）: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6.2, 7, 8, 9, rh10, DJ, DJ/8, PHP.eB, PHP.S, AAV2-retro, AAV2-QuadYF および AAV2.7m8
- AAV中空粒子 （ウイルス様粒子 (VLPs)）

AAV 作製とQC（品質管理）

トリプルトランスフェクションによる作製法

組み換えAAVの製造では、目的の遺伝子（GOI）をクローニングしたトランスファープラスミドを、Rep-capプラスミドおよびアデノウイルス遺伝子（E4、E2A、VA）をコードするヘルパープラスミドとともに、HEK293Tウイルス産生細胞にコトランスフェクトします。短いインキュベーション後、セロタイプ（血清型）に応じて細胞溶解物または上清からウイルス粒子を回収し、PEG沈殿によって濃縮します。超純粋AAV（in vivoグレード）の場合、ウイルス粒子は塩化セシウム（CsCl）密度勾配超遠心分離によってさらに空ベクターの除去と精製および濃縮されます。ウイルスタイターはAAV2ITRシークエンスに対するプライマーを用いてqPCRによってウイルスゲノムコピー数を計測します。

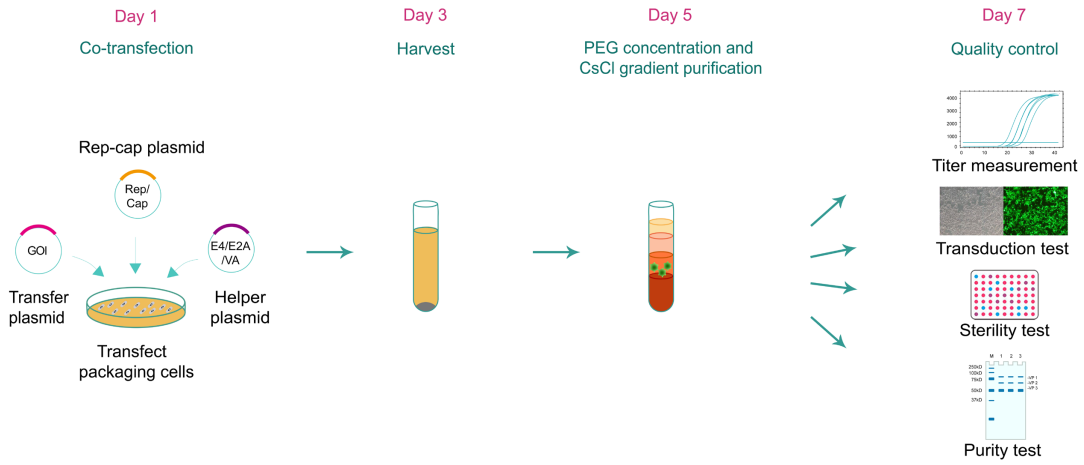


図 4. トリプルトランスフェクションによるAAVパッケージングのワークフロー

VectorBuilderが作製した各AAVの品質管理は、タイター測定、細菌と真菌の無菌性テスト、およびマイコプラズマの検出結果を含みます。トランスファーベクターが蛍光タンパク質を発現する場合、HEK293細胞にウイルスを感染させて、対応する蛍光を検出することで形質導入テストを実行します。さらに、超純粋AAVの場合、SDS-PAGE分析とエンドトキシンアッセイによってウイルスの品質を定期的にサンプリングしています。

価格と作業日数

スケール	用途	一般的なタイター	最低タイター	容量	価格 (税別・送料別))	作業日数
パイロット	培養細胞	>10^{12} GC/ml	>2x10^{11} GC/ml	250 ul (10x25 ul)	70,000円	8-16 日
中容量				1 ml (10x100 ul)	101,000円	
大容量		>5x10^{12} GC/ml	>2x10^{12} GC/ml	1 ml (10x100 ul)	170,500円	
超純粋パイロット	培養細胞 & in vivo	>2x10^{13} GC/ml	>10^{13} GC/ml	100 ul (4x25 ul)	217,000円	12-24日
超純粋中容量				500 ul (10x50 ul)	310,000円	
超純粋大容量				1 ml (10x100 ul)	480,500円	

バキュロウイルスによる作製法

バキュロウイルスベースのAAVパッケージングワークフローは、以下の図5に示すように2つの主要なステップで構成されています。ステップ1には、2種類の組み換えバキュロウイルスの作成が含まれます。具体的には、AAV逆方向末端反復（ITR）に挟まれた目的の遺伝子（GOI）を発現するバキュロウイルスと、AAVrep遺伝子とcap遺伝子を発現するヘルパーバキュロウイルスです。ステップ2では、ステップ1で作成された2つの組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞に同時感染させることにより、組み換えAAV粒子を作成します。

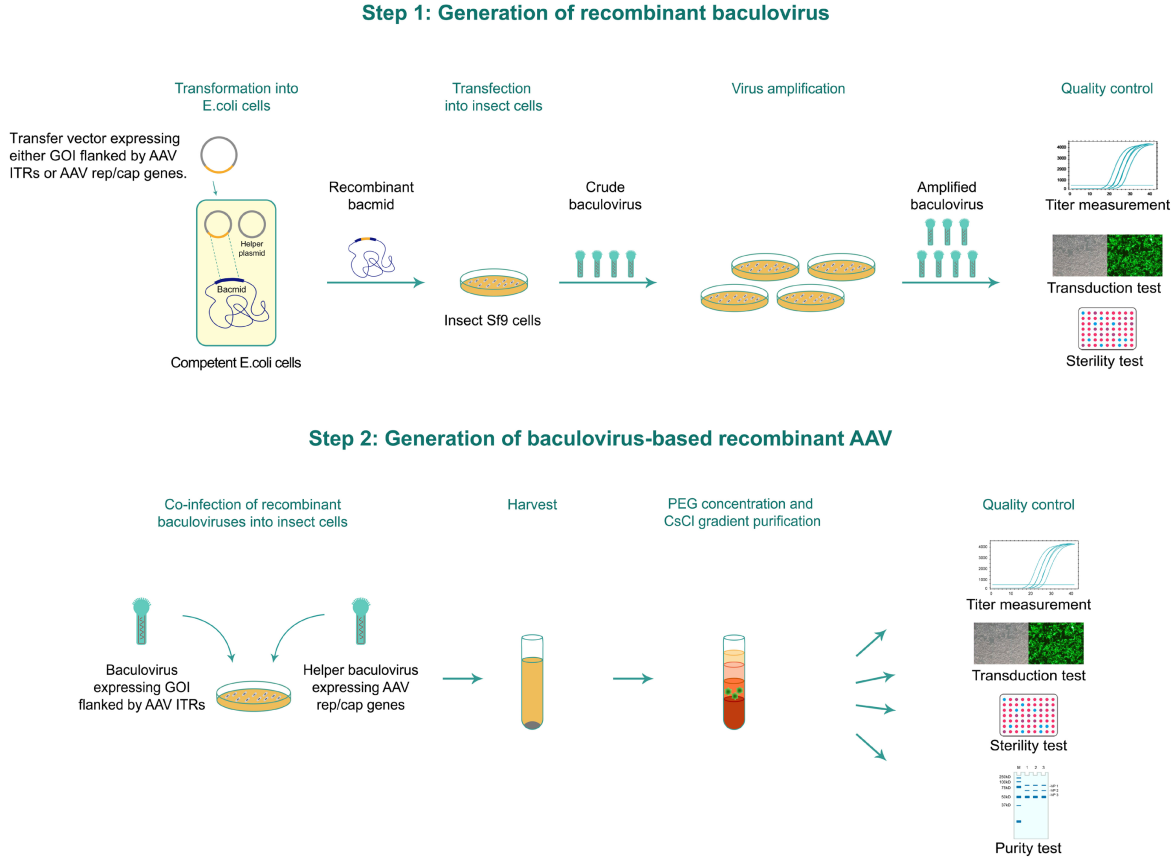


図 5. バキュロウイルスを使用したAAVの大量製造ワークフロー

2種類の組み換えバキュロウイルス（一方はAAV ITR内にGOIを発現するウイルス、他方はAAV rep/cap遺伝子を発現するウイルス）を生成するには、まずバキュロウイルストランスファーベクターに各発現カセットをクローニングします。次に、バキュロウイルス導入プラスミドを、Tn7トランスポザーゼを発現するヘルパープラスミドとともに、空のバキュロウイルスシャトルベクター（別名バクミド）を含む細菌宿主に同時形質転換して、組み換えバキュロウイルスを生成します。次に、組み換えバクミドを昆虫のSf9細胞にトランスフェクトします。短期間のインキュベーション後、ウイルス粒子を培地から回収し、ショ糖勾配遠心分離によってさらに濃縮します。バキュロウイルスタイターをqPCRベースアプローチを使用して測定します。次に、両方の組み換えバキュロウイルスを昆虫Sf9細胞に同時感染させます。 約72～96時間のインキュベーションの後、AAV粒子を細胞溶解物および上清から回収し、PEG沈殿によって濃縮します。超純粋AAV（in vivoグレード）の場合、ウイルス粒子は塩化セシウム（CsCl）勾配超遠心分離によってさらに精製および濃縮されます。AAVのタイターは、qPCRベースアプローチを使用して測定します。

価格 と作業日数

スケール	用途	最低タイター	容量	価格 (税別・送料別))	作業日数
超純粋パイロット	培養細胞 & in vivo	>5x10^{13} GC/ml	1 ml (10x100 ul)	868,000円	42-56 日
超純粋中容量			5 ml (25x200 ul)	3,121,000円	49-63 日
超純粋大容量			10 ml (50x200 ul)	5,921,000円	56-70 日

注: バキュロウイルスを用いた作製法については セロタイプ 1, 2, 5, 6, 8, 9が可能です。

AAVセロタイプテストパネル

アデノ随伴ウイルス （AAVs） は幅広い哺乳類細胞への導入が可能であることと低い免疫原性を示すため、、遺伝子治療用ベクターとして最も有望なウイルスベクターとして知られています。ベクタービルダーでは研究目的に応じた最適なAAVセロタイプを選択できるよう、多種類のセロタイプを細胞や動物で比較検討できるテストパネルをご用意しました。

AAVセロタイプテストパネルの注文情報

製品名	カタログ番号	タイターと容量	価格 (税別・送料別)
In vitro grade AAVセロタイプテストパネル (CMV-EGFP)	PANEL-AAVS01	>10^{12} GC/ml, 25 ul	12,500円 1ユニット当たり
In vitro grade AAVセロタイプテストパネル (CAG-EGFP)	PANEL-AAVS02		
In vivo grade AAV セロタイプテストパネル (CMV-EGFP)	PANEL-AAVSP01	>10^{13} GC/ml, 25 ul	22,000円 1ユニット当たり
In vivo grade AAV セロタイプテストパネル (CAG-EGFP)	PANEL-AAVSP02		

実験による検証

哺乳動物細胞で当社カスタム製造のウイルスで高い形質導入効率を得られるように、トリプルトランスフェクション用のAAVパッケージング プロトコールを最適化しています。当社独自の技術や試薬を数多く開発してウイルスを作製しています。

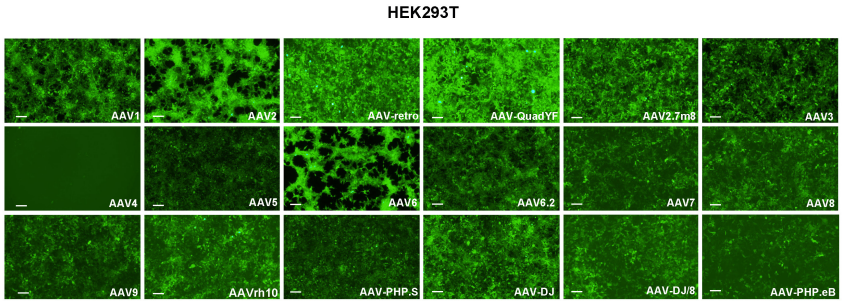


図6. HEK293T細胞に、18種類の異なるAAVセロタイプキャプシドでパッケージングしたCMV>EGFP vector（VB010000-9394npt）を遺伝子導入した。ウイルス感染から48時間後のEGFP蛍光を異なるセロタイプ間で比較観察した。スケールバー:100 μm

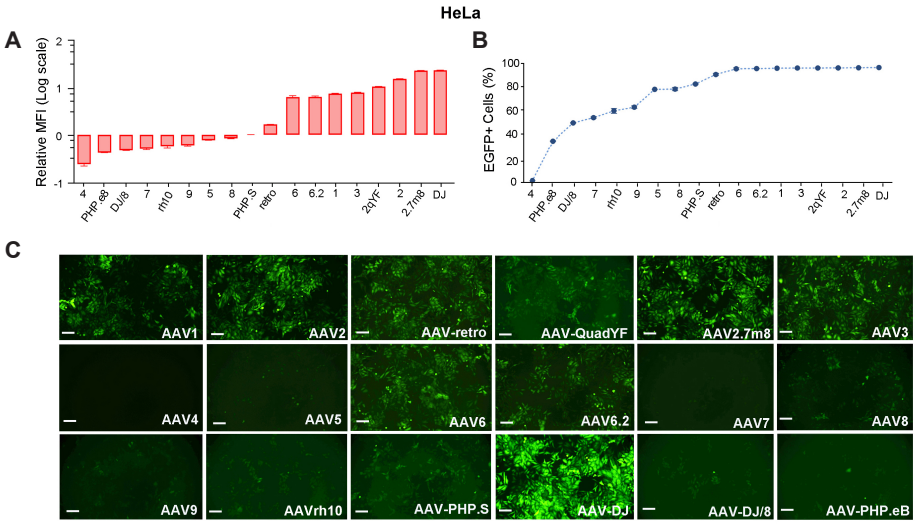


図 7. HeLa細胞に、18種類の異なるAAVセロタイプキャプシドでパッケージングしたCMV>EGFP vector(VB010000-9394npt)を遺伝子導入した。ウイルス感染から48時間後にフローサイトメトリーを使用して、EGFPの(A) 平均蛍光強度 (MFI) および (B) 陽性細胞を定量化した。 (C) EGFP蛍光を異なるセロタイプ間で比較観察した。スケールバー: 100 μm.

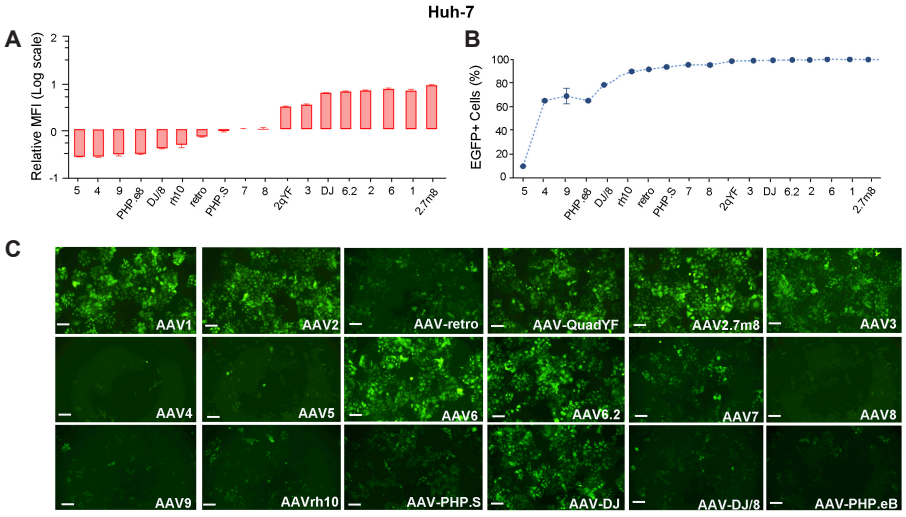


図 8. Huh-7 細胞に、18種類の異なるAAVセロタイプキャプシドでパッケージングしたCMV>EGFP vector (VB010000-9394npt). を遺伝子導入した。ウイルス感染から48時間後にフローサイトメトリーを使用して、EGFPの(A) 平均蛍光強度 (MFI) および (B) 陽性細胞を定量化した。 (C) EGFP蛍光を異なるセロタイプ間で比較観察した。スケールバー: 100 μm.

shRNA (3+1) ウイルスパッケージング

経験的にデザインされたshRNAのノックダウン効果は一つ一つのshRNAによってその特異性や効率が異なります。よって、目的のGOIを最も良いshRNAでノックダウンするためには複数種のshRNAを試すことが肝要です。VectorBuilder のshRNA (3+1)ウイルスパッケージングは標的遺伝子に最適なshRNAを選択することを、できるだけ安価に行えるようになっております。本製品には標的遺伝子標的遺伝子に対する3つのカスタムshRNAウイルスとコントロール（スクランブル配列）ウイルスがセットになっています。

shRNAウイルス注文情報

スケール	用途	価格 (税別・送料別)*	作業日数**
パイロット	培養細胞	232,500円	13-26 日
中容量		310,000円	
大容量		465,000円	
超純粋パイロット	培養細胞 & in vivo	651,000円	17-34 日
超純粋中容量		883,500円	
超純粋大容量		1,364,000円	

** 価格にはベクター構築とウイルスパッケージングの両方が含まれます。*

*** 作業日数にはベクター構築とウイルスパッケージングの両方が含まれています。納品の際の輸送に関する時間は含まれておりません。*

コントロールAAVウイルス

AAVコントロールウイルスは、カスタムウイルスの生物学的用途に合わせてデザインされ、AAVトランスダクションに使用されます。トランスダクションに使用されます。例えば、カスタムウイルスがある遺伝子を過剰発現している場合、提供されるコントロールウイルスはEGFPコントロールAAV（EGFPを過剰発現するAAV）であり、カスタムウイルスが遺伝子に対するshRNAを発現する場合、提供されるコントロールウイルスは、スクランブルshRNAを発現するウイルスとなります。コントロールウイルスの詳細情報を以下に示します:

ベクターシステム	コントロールウイルスベクターの名称	ベクターID
ssAAV 遺伝子発現システム	pAAV[Exp]-CMV>EGFP:WPRE	VB010000-9394npt
scAAV 遺伝子発現システム	pscAAV[Exp]-CMV>EGFP	VB010000-9304aud
ssAAV U6-based shRNA ノックダウンシステム	pAAV[shRNA]-EGFP-U6>Scramble_shRNA	VB010000-0023jze
scAAV U6-based shRNA ノックダウンシステム	pscAAV[shRNA]-EGFP-U6>Scramble_shRNA	VB010000-9343nhh
ssAAV miR30-based shRNA ノックダウンシステム	pAAV[miR30]-CMV>EGFP:Scramble_miR30-shRNA:WPRE	VB010000-9397wgw
ssAAV CRISPR システム	pAAV[Exp]-CMV>EGFP:WPRE	VB010000-9394npt

AAVウイルス様粒子 (VLPs)

VectorBuilderは遺伝子治療ベクター開発に使用できる既製品およびカスタムのAAVウイルス様粒子をご提供しています。解析におけるキャリブレーションおよび最適化に使用されるだけでなく、生体内分布解析や特定AAVセロタイプカプシドに対する生体内免疫反応の検定など、創薬プロセスの多様な用途に使用されています。弊社の既製品AAVウイルス様粒子は徹底的に特性評価されているため、信頼性の高いウイルス様粒子の品質評価基準試料として使用できます。さらに、AAVウイルス様粒子は実験で観察された現象がAAVカプシドに起因するものではなく、AAVベクターから発現される遺伝子に起因することを確かめるためのネガティブコントロールとしても利用できます。

特徴

- 既製品in vivoグレードのAAVウイルス様粒子（セロタイプ1、2、5、8、9）
- AAVウイルス様粒子のカスタムサービスとして、どのようなセロタイプ、生産システム、精製システムおよび品質要求事項にも対応できます。
- SDS-PAGE、BCA、エンドトキシン試験、マイコプラズマ検査、フル/空カプシド比解析などを使用した、徹底的な特性解析が可能です。

注文情報

スケール	容量	価格 (税別・送料別)
10 ug (1.6x10^{12} VPs)	25 ul	62,000円
100 ug (1.6x10^{13} VPs)	0.1 ml (1x100 ul)	356,500円
500 ug (8x10^{13} VPs)	0.5 ml (5x100 ul)	1,302,000円
1 mg (1.6x10^{14} VPs)	1 ml (10x100 ul)	1,953,000円

実験による検証

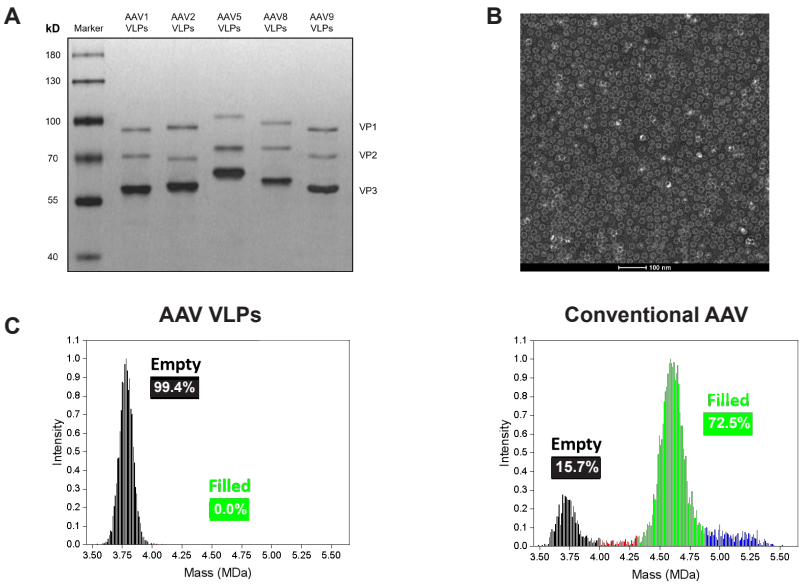


図 9. (A) 既製品AAVウイルス様粒子（セロタイプ1，2，5，8，9）のSDS-PAGE後の銀染色像
(B) セロタイプ 9 のAAVウイルス様粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)イメージ。中空粒子や 空ウイルスは内部が黒く現れる。組換えAAVウイルスゲノムを含むフルウイルスでは、内部が白くなる。(C) セロタイプ 8 のAAVウイルス様粒子の電荷型質量分析結果。黒は中空粒子、 緑はウイルスゲノムを含むAAVを示す。

AAV GMP 製造

ウイルス製造

VectorBuilderは、様々な種類のウイルスの作成に関する広範な専門知識と経験を持っています。当社は、遺伝子治療薬開発パイプラインに沿った、あらゆる要求に応えるため、様々な規模と品質のウイルス製品を提供します。アデノ随伴ウイルス（AAV）の大規模GMP製造のためのプラットフォーム技術を確立し検証しています。

提供しているウイルスのグレードの種類

リサーチグレードAAV

リサーチグレードウイルスは、基礎研究や創薬研究を目的としています。製造は従来の細胞培養施設で行います。ウイルスの品質が、要求基準を満たすことを保証するために、厳格な品質管理検査を実施しています。

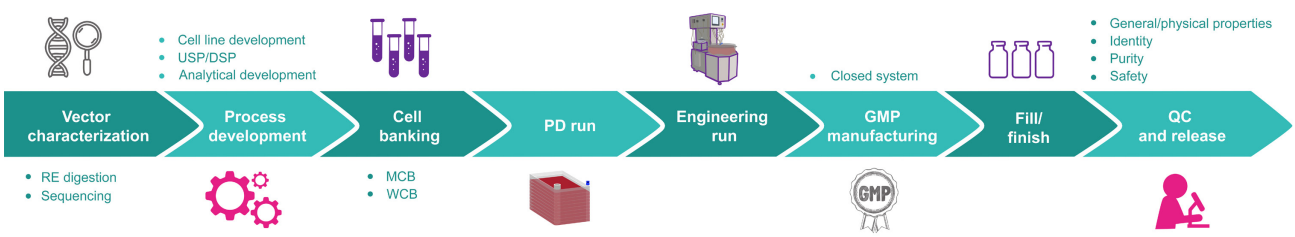
GMP-like AAV

GMP-likeウイルスは、薬物の安全性と代謝研究のための動物実験などの前臨床研究を目的使用を目的としています。これはGMPガイドラインのうち主要な項目を満たす条件で製造され、GMPと同等の製造プロセスで製造され、同等の品質を満たすウイルスとなっています。ウイルスの製造は、ドキュメント管理と、トレーサビリティーを備えた、隔離製造スイートで行われます。したがってGMP-likeグレードでは最終的なGMP製品をスモールスケールで模倣しているとみなせます。GMP-likeグレードの特徴は、GMPに比べてコストがはるかに低く、タイムラインも短縮されます。品質検査証明書(certificate of analysis :COA) が、製品のリリース時に発行されます。ご依頼に応じてTSE/BSE証明書も発行します。

GMP AAV

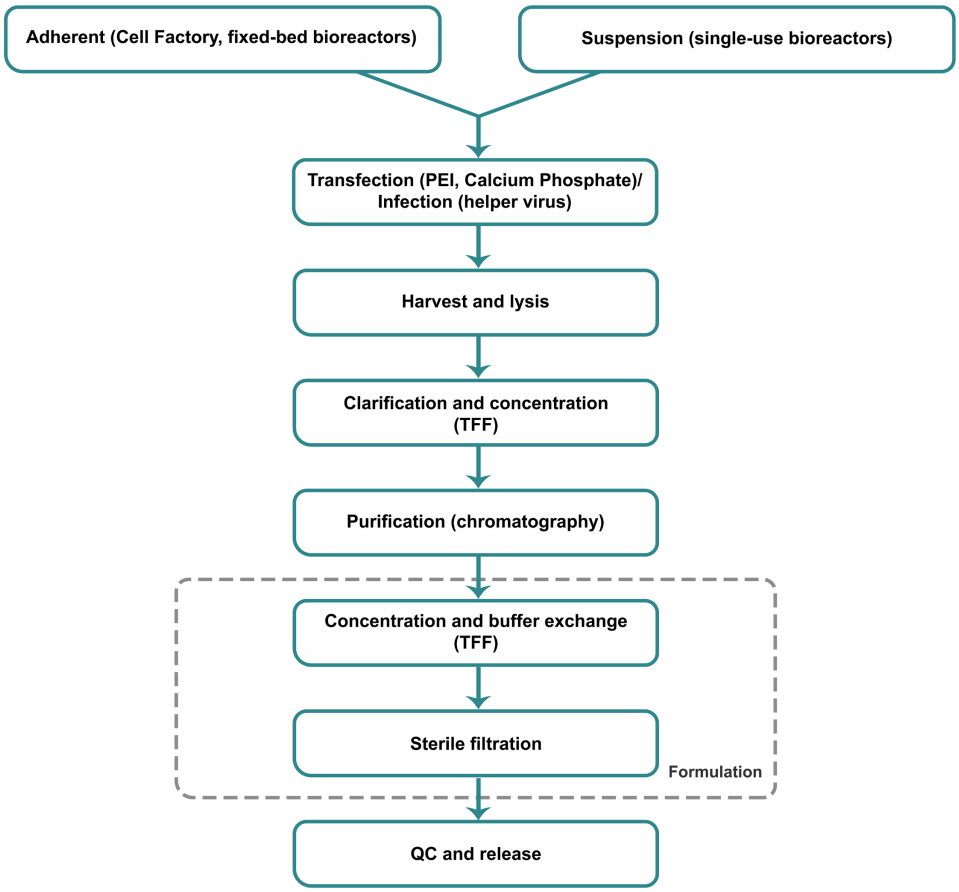
GMPグレードのウイルスは厳格なGMPガイドラインに従って、認定されたGMP細胞培養スイートで生産されます。一連のインプロセス(in-process)およびリリースQC アッセイを含む包括的な品質管理保証システムが製造プロセスを通じて組み込まれています。ウイルスが品質と安全性に関して、仕様と規制基準を確実に満たすようにしています。製品リリース時には、品質検査証明書(Certificate of analysis: COA)と、製造プロセスを漏らすことなくドキュメント化したバッチリリース報告書が発行されます。

GMPウイルス製造のワークフロー



プラットフォームテクノロジー

AAVパッケージングはHEK293細胞を使用し、培養条件は接着培養(Cell Factory または 固定床バイオリアクター/fixed-bed bioreactors）または無血清浮遊培養（200L までのシングルユーズのバイオリアクターを使用）に対応しています。昆虫由来のSf9 細胞を使用したAAVパッケージングにも対応しています。バッチ当たりの最大スケールは10^{17} GCです。



GMP施設

VectorBuilderは現在、>100,000 sq. ft.の最先端の施設デザインと最新式の機材を備えたGMP準拠製造施設を稼働させています。米国、欧州、日本、中国、PIC/SのGMP規制とガイドラインに適合するように設計されています。これらはフェーズI/II/IIIと商業生産に適しています。弊社の施設は現在、10室のGMP製造スイート、複数の充填/仕上げ用スイートとQCラボスイートがあり、合計敷地面積が 9,500 sq ft にわたります。また、合計敷地面積が 8,000 sq ft の複数のGMPスイートを製造開発・パイロット運転用スイートとして運用しています。

さらに2024年初めの始動を目指して、ステージ 3 GMP施設(~500,000 sq ft)を建設中です。このGMP製造施設は、大規模な商業用の遺伝子・細胞治療用ベクターの製造を担うことを目標として建設しています。

AAV CRO サービス

ライブラリー構築

VectorBuilderは大規模な機能スクリーニングを可能にするカスタムライブラリーの受託構築サービスを提供しています。当社は独自技術と最適化されたベクター群を利用して高品質なカスタムライブラリーの構築してきた豊富な実績を持ちます。構築されたライブラリーは要望に応じて大腸菌のストック、DNA、組み換えウイルスの形態で納品されます。当社のライブラリーは納品前に次世代シークエンス技術(NGS)を用いた検証がなされているので、受領したライブラリーの正確な品質情報を得ることができます。

提供しているライブラリー

- CRISPRライブラリー(CRISPR KO, CRISPRa/i, CROP-seq, Perturb-seqなど)
- shRNAライブラリー
- Barcodeライブラリー
- エンハンサー/プロモータースクリーニングライブラリー
- ペプチド発現ライブラリー
- DNAシャッフリングライブラリー
- ハイブリッドライブラリー
- カプシドスクリーニングライブラリー
- その他

AAVカプシド指向性進化

指向性進化は、新規AAVカプシドを人工的に作製するために広く用いられているハイスループットアプローチで、進化遺伝学的な多様化と選択による自然淘汰のプロセスを模倣しています。AAVカプシドの指向性進化は、野生型AAVカプシド遺伝子を変異させ、非常に多様なAAVキャプシドライブラリーを構築することから始めます。次に、これらのライブラリーをスクリーニングして、目的の機能が増強された新規カプシド変異型を同定します。

提供しているカプシド指向性進化サービス

- 多様性に富むAAVカプシドライブラリーを作製するためのフルサービスプラットフォーム
- 多様なアプローチによる高複雑なカプシドライブラリーの構築（エラープローンPCR、ランダムペプチドディスプレイ、DNAファミリーシャッフリング、in silicoデザインなど）
- 1ステップまたは2ステップの高タイターパッケージングによるカプシドライブラリー
- マウス、ラット、そして非ヒト霊長類でin vivoスクリーニングが可能です
- 経験豊富な当社の研究者が、ライブラリー構築からin vivoスクリーニング、ライブラリの設計からNGS分析まで、AAVカプシドプロジェクトのあらゆる側面をカバーする包括的な技術サポートを提供します。

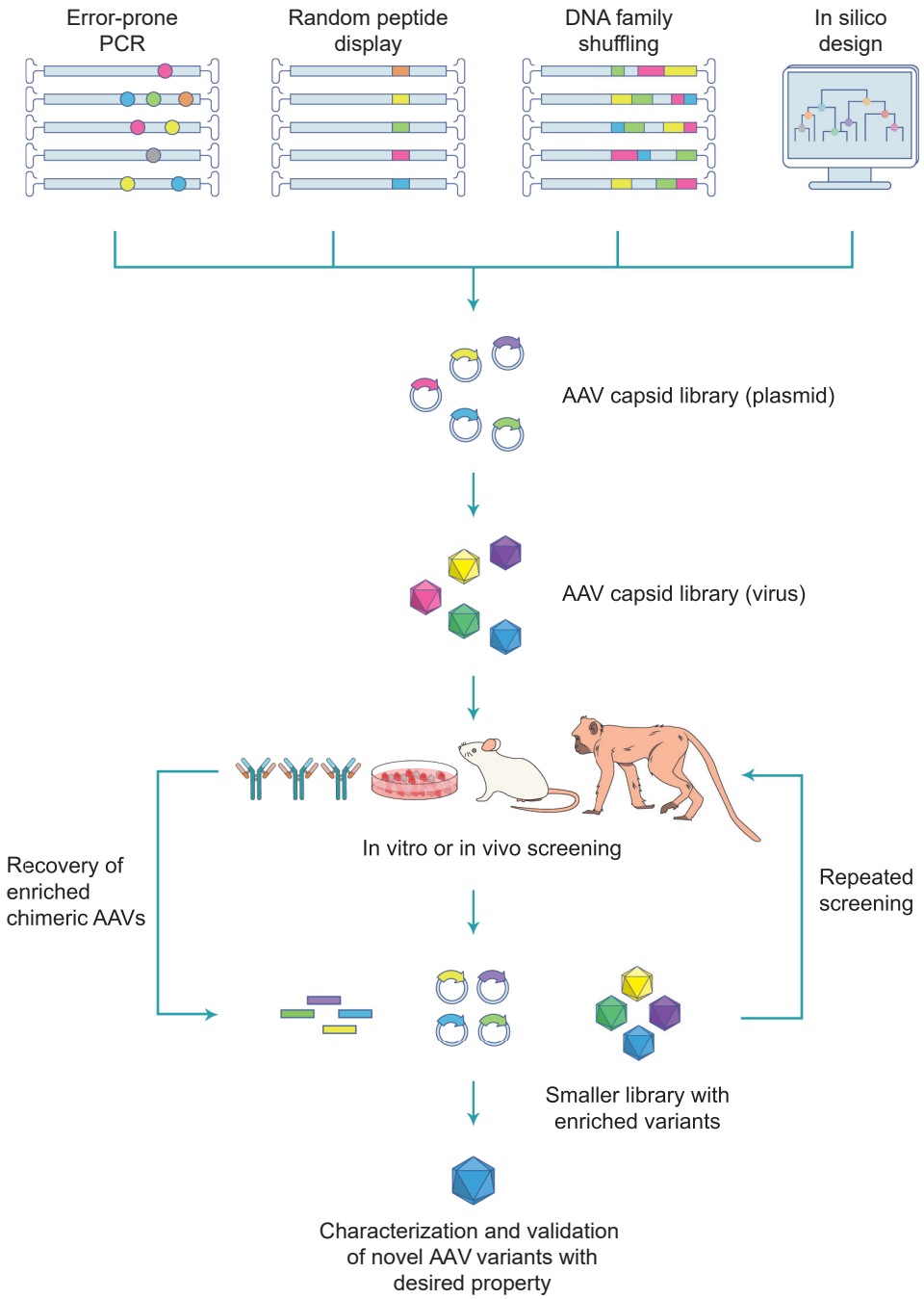


図 10. 指向性進化(directed evolution)による新規AAVカプシドスクリーニングの一般的なワークフロー
AAVカプシド進化のワークフロー全体における最も重要なステップは、rep遺伝子とカプシド遺伝子変異型からなるキメラAAVゲノムを運ぶプラスミドDNAからなる非常に多様なAAVカプシドライブラリーの構築です。 カプシド遺伝子変異型は、エラープローンPCR、ランダムペプチドディスプレイ、DNAファミリーシャッフリング、または in silico デザインなど、さまざまなアプローチを使用して効率的に構築できます。次に、カプシドライブラリーはウイルス粒子にパッケージングされ、各ウイルス粒子はキメラゲノムカプシド変異体を保持します。次にウイルスライブラリーは、キメラAAVの特性をテストするスクリーニングを行います。スクリーニングに合格したウイルスゲノムは、標的細胞から回収され、2回目のスクリーニング用の小ライブラリーに集められます。信頼性の高いヒットを単離するするために、通常、数ラウンドのスクリーニングが実行されます。最後に、得られたヒットを検証し特性の評価を行い、目的の特性が強化された新規AAVカプシド変異型として確立します。

AAV生体内分布プロファイリング

様々な生体組織や臓器おけるAAVベクターの分布や持続性を評価することはAAVを用いた遺伝子治療の開発や非臨床試験段階でその治療法が成功するかどうかを見極めるために非常に重要です。AAV生体内分布解析はオフターゲットの影響を調べるために非常に有効な手段であり、AAVベクターの安全性評価をするために重要な役割を担っています。

サービスの特徴

- AAVベクターの生体内分布検証のワークフローを全てカバーするプラットフォーム
- マウス、ラット、非ヒト霊長類(NHP)を含む複数の種に対応
- 種々な解析方法：蛍光イメージング、フローサイトメトリー解析、ルシフェラーゼアッセイ、qPCRやRT-qPCRなど
- NGSによるマルチプレックス解析：同一動物内で別々のベクターの生体内分布解析が行えるよう、バーコードラベルをAAVベクターに組み込む独自のプラットフォームも用意しています
- 与方法の種類：　　AAVの投与方法も尾静脈注射、顔静脈注射（新生児マウスやラット用）、脳室内注入、髄膜注射、網膜下注入、硝子体内注入、中耳内注入、筋肉内注射など、各種取り揃えています。
- AAV生体内分布プロジェクトのあらゆる側面をカバーする完全な技術サポート

実験的検証

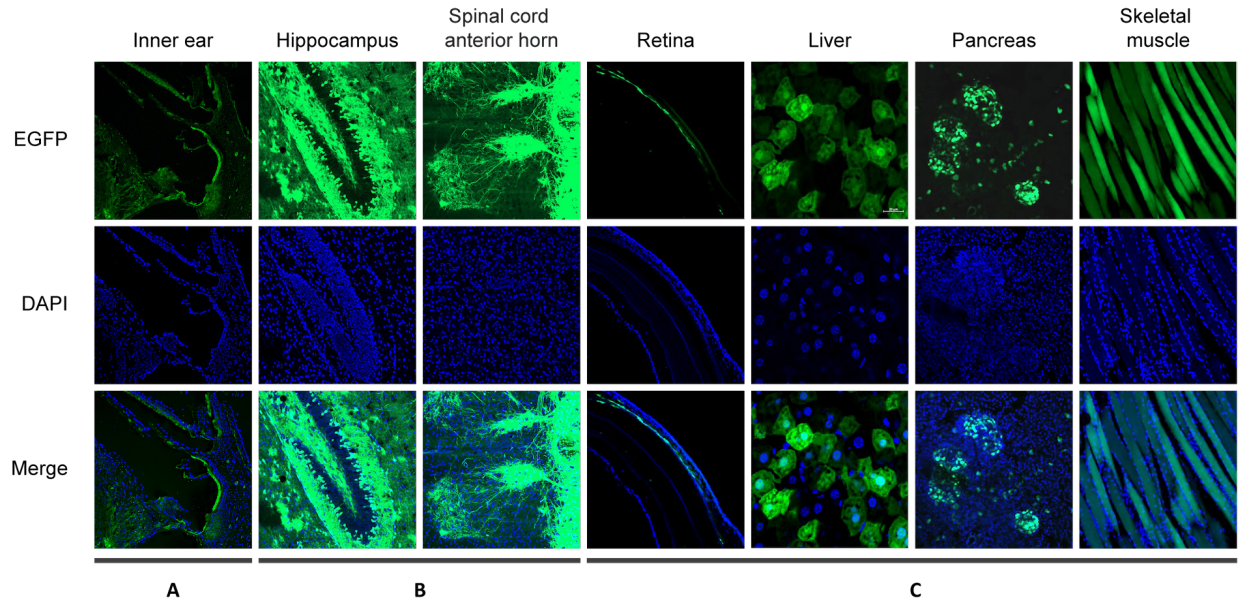


図 11. AAV9ウイルスを様々なルートでマウスにインジェクションし、CAG-EGFPの発現を観察した:（A）左耳への鼓室内注射から13日後の内耳;（B） 顔面静脈注射から10日後の海馬と脊髄前角;（C） 尾静注から12日後の網膜、肝臓、すい臓、骨格筋でのEGFP発現。EGFP(緑)、DAPI(青)

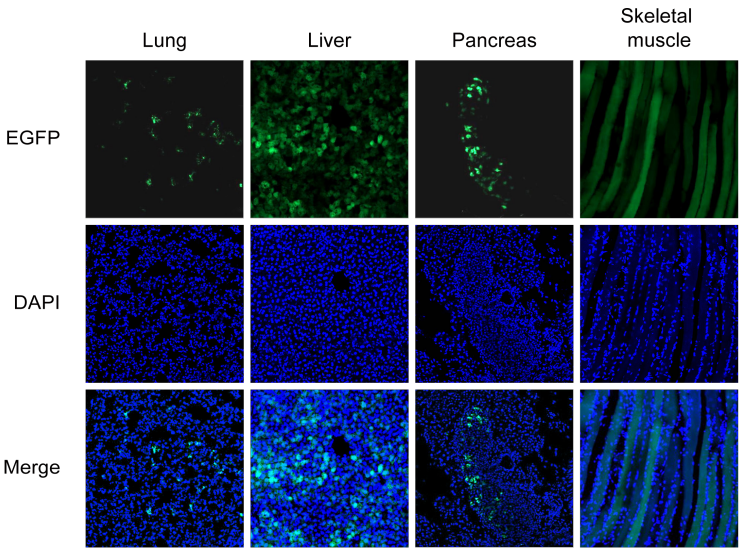


図 12. AAV1ウイルスをマウスの尾静脈に注入し、インジェクションから12日後のマウス各組織のCMV-EGFP発現をコンフォーカルセクションで確認した。EGFP(緑), DAPI(青)

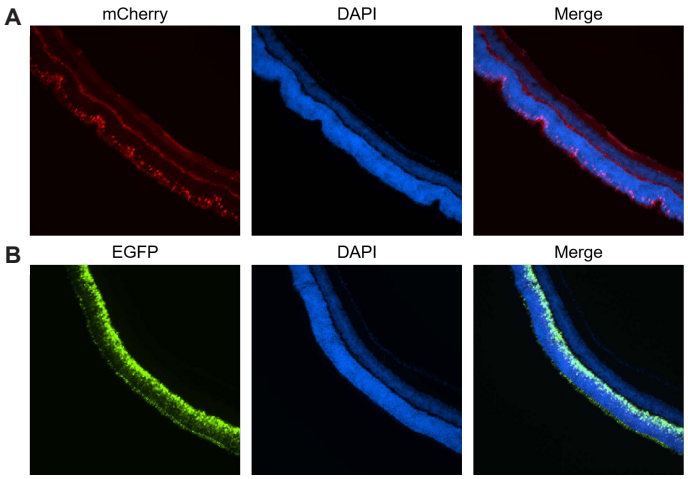


図 13. AAV8ウイルスをマウス網膜下注入し、インジェクションから20日後のマウス眼のコンフォーカルセクションを観察した。(A) ProA1-mCherry(赤)発現, (B) hRHO-EGFP(緑) 発現。DAPI(青)

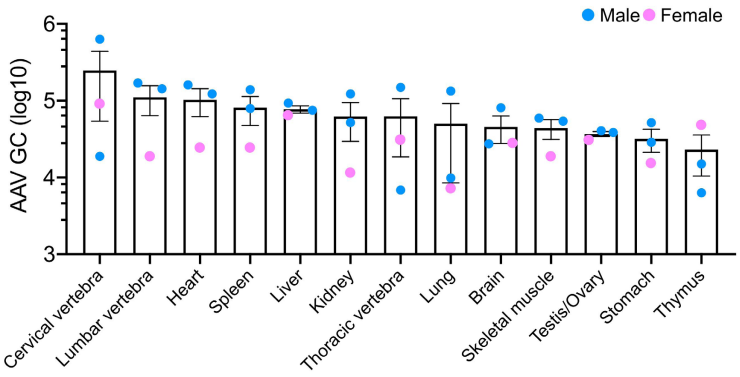


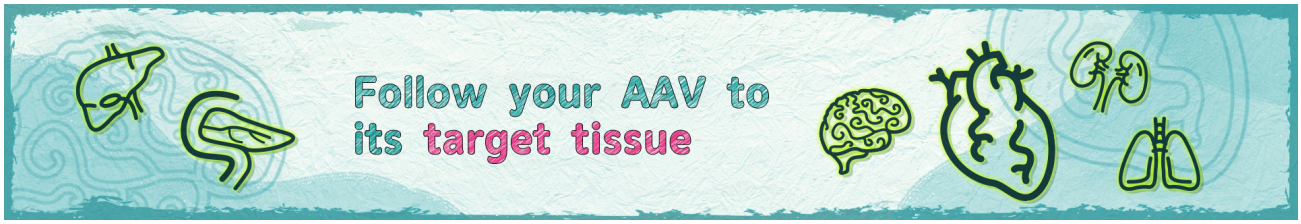
図 14. AAV9ウイルス (~1.5X1010 GC/mouse)を、出生後48時間以内の新生児マウス(オス2匹、メス1匹) に静脈内投与した。インジェクションから6週間後にqPCRによって各臓器でのAAV9の生体内分布を定量化した。

AAVの基礎知識

AAVセロタイプと組織指向性

自然界では多くのAAV株が同定されてきました。それらはウイルス表面のカプシドタンパク質の抗原性の違いによって異なるセロタイプに分類されています。異なるセロタイプはウイルスの異なる組織指向性（感染の組織特異性）を表しています。弊社のAAVベクターをウイルスパッケージングする際は、異なるカプシドタンパク質を使用して異なるセロタイプを作製することが可能です。下記の表は異なるAAVセロタイプによる組織特異性をリストにしています。

組織	推奨される AAV セロタイプ
平滑筋	AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10
骨格筋	AAV1, AAV9
CNS	AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-PHP.eB
PNS	AAV-PHP.S
脳	AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV-DJ/8
網膜	AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV2-QuadYF, AAV2.7m8
内耳	AAV1, AAV2, AAV6.2, AAV8, AAV9, AAV2.7m8
肺	AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV9, AAVrh10
肝臓	AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ, AAV-DJ/8
膵臓	AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10
心臓	AAV1,AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ
腎臓	AAV2, AAV4, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ, AAV-DJ/8
脂肪	AAV6, AAV8, AAV9
精巣	AAV2, AAV9
脾臓	AAV-DJ, AAV-DJ/8
脊椎	AAV2-retro
内皮細胞	AAV2-QuadYF



AAVプロトコール（ In Vitro および In Vivo用）

保存および取り扱い

1. VectorBuilderの超純粋以外のAAVはin vitroの使用を推奨しています。このAAVはTris組成バッファーに保存されています。超純粋AAVはin vivo実験への使用を推奨しています。超純粋AAVはPBS組成バッファーに保存されています。
2. AAVは解凍後、実験に使用する量に応じて少量ずつ分注し、再凍結できます。ウィルスを希釈する必要がある際はPBSによって行い、必ず使用直前に希釈するようにして下さい。
3. お受け取り後は、長期保存の場合は-80 °C（少なくとも1年間は安定）、短期保存の場合（例：2〜3 週間）は-20 °Cで保存してください。
4. AAVのバイアルは使用前に氷上で解凍し、実験中も氷上で取り扱いください。解凍したAAVは生物学的活性を大きく低下させることなく、 4°Cで 1-2 週間保存が可能です。

注意: 凍結融解を繰り返すことは避けてください。 AAVは活性損失を最小限に数回は凍結融解が可能ですが、可能な限り避けることで最良の結果が得られます。

AAV In Vitro 形質導入(トランスダクション)

標的細胞への形質導入

AAVの形質導入は細胞種に依存します。細胞種によっては導入効率が低いものもあれば、非常に導入しやすいものもあります。AAV形質導入実験を計画する際には、eGFP発現AAV　　などのレポーターベクターを異なる血清型(セロタイプ)（ベクタービルダーのAAVセロタイプテストパネル参照）にて使用し、目的の組織や培養細胞の形質導入に最適な血清型を決定することをお勧めします。細胞が容易に形質導入可能である場合は、細胞あたり $1x10^4$〜$1x10^6$ ゲノムコピー（GC）の間の多重感染度（MOI）で細胞への形質導入を開始します。細胞株によっては、より高いMOIが必要な場合があります。細胞死を最小限に抑え、高効率の導入条件を検討してください。一部の細胞株では、高い導入レベルが達成できない場合もあります。

哺乳類細胞株の形質導入プロトコール

1. **導入前日 (0日目)**

   形質導入時に30〜50%のコンフルエントになるように、標的細胞を播種します。加湿した5% CO_2インキュベーター内、37°Cで18〜20時間培養します。例として、当社では293T細胞を使用する場合、6 ウェルプレートの1ウェルあたり$3x10^5$細胞を播種します。

2. **形質導入 (1日目)**

   - ウイルスを氷上で解凍します。目的のMOIを達成するために必要な量のウイルスを取り、適量の培地に加え、穏やかに混合します（ボルテックスはかけない）。形質導入効率を最大にするために、プレートの表面を覆うのに必要な最低限の培地量を使用してください。例えば、6ウェルプレートで感染を行う場合、ウェルあたり1mlの培地を使用します。
   - 標的細胞から古い培地を吸引し、ウイルスを含む培地を細胞に添加します。
   - プレートを静かに回転させて混ぜ合わて細胞を覆い、加湿した5% CO_2インキュベーター37°Cで一晩培養します。

注意: ウイルス混合液への暴露が細胞に有害作用を及ぼす可能性が懸念される場合は、形質導入を6-8時間に制限してください。

3. **2日目**

   ウイルスを含む培地を除去し、新鮮な完全培地と交換します。そして、加湿した5% CO_2インキュベーター内、37°Cで一晩培養します。

4. 3日目以降

ウイルス感染後の望ましい時点で遺伝子発現を解析します。一般的に、検出可能なレベルの遺伝子産物は、形質導入後24-48時間後に発現すると考えられます。

注意: 分裂が活発な細胞（例：倍化時間が約24時間)では、導入された遺伝子は24時間以内に発現が見られ、48〜96時間後（2〜4日後）に一番多く発現が観測できます。多くの場合、発現レベルは5日目から減少し始めます。より長い倍化時間を要する細胞株や非分裂細胞株では、高レベルの導入遺伝子発現はより長く持続します。目的の哺乳類細胞株に初めて導入する場合は、経時的解析を行い、導入遺伝子の発現に最適な時間を検討することをお勧めします。

結果の一例

形質導入の成功例を示します:

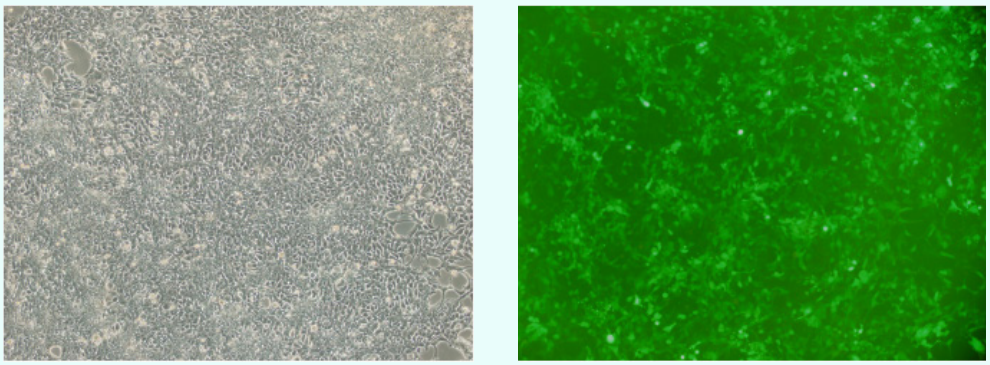


図 15. EGFP発現AAV2をMOI 10000で293T細胞に形質導入した例。画像は100倍にて撮影。左: 明視野； 右: EGFP

AAV In Vivo 形質導入(トランスダクション)

尾静脈注射によるマウスへの投与プロトコール

尾側静脈を介した静脈内注射は、AAVをマウス組織に導入するための効率的な手段です。尾静脈注射は手術や麻酔を必要とせず、簡便であることから多用されています。他の注入部位として門脈と頸静脈等がありますが、これらは手術を必要とします。門脈注射と比較して、組織へのAAV導入においては尾静脈注射がより効率的です。

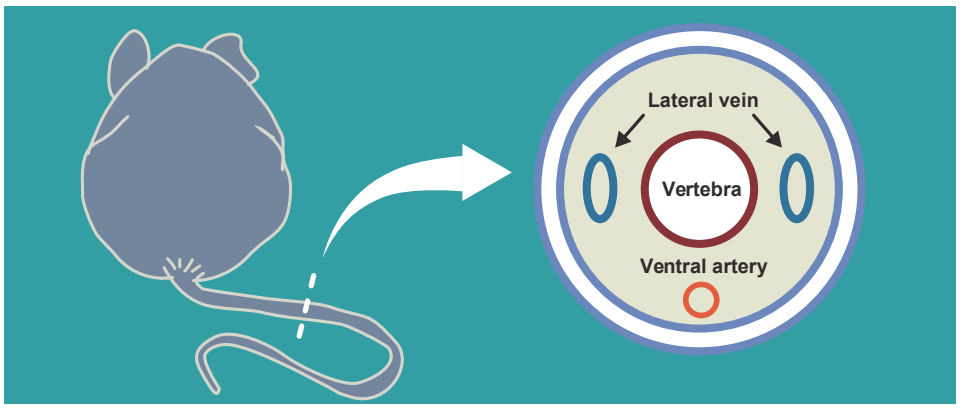


図 16. マウス尾側静脈および尾腹動脈の横断面図

1. **保定**

   マウスは市販の保定器を使用して身体的に固定することができます。尾が次の処置のために露出していることを確認して、保定器にマウスを穏やかに入れます。

2. **血管拡張**

   末梢血管を拡張させるために、注射の前に尾を温水（43°C）に浸すか、5〜10分間ヒートランプの近くに動物を置いてマウスを温めてください。

注意: ヒートランプを使用する場合は、ケージの上約15〜25cmにランプを配置し、5分間マウスを観察します。マウスがケージの隅に集まってきたら加熱を止めます。

3. **注射**

   - マウスが軸位置で保定器に入っていることを確認します。尾側静脈が見えるようにするために、尾を少し回転させます。70%エタノールで注射部位を消毒し、ガーゼパッドで拭き取ります。
   - 27ゲージの針付き0.5 mlシリンジを使用して、少なくとも0.1 mlの超精製AAV粒子を吸引します。針から空気を注意深く取り除きます。
   - 尾の先端部分をつかみ、片側に少しひねって外側の静脈を確認します（図16）。針を浅い角度で挿入し（尾静脈が表面に比較的近いため）、0.1mlの希釈した組換えAAVを静脈に注入します。針が正しく挿入されていれば、注射は抵抗なくスムーズに進行し、静脈は一時的に透明な色に変わります。局所的な腫れが観察された場合はウイルスは静脈ではなく尾の組織に注入されているため、注入を停止します。

注意: 尾静脈注射は尾の先端から約 1/3 の位置から注射を開始します。注入を失敗した場合、注入場所を失敗した箇所より尾静脈に沿って、さらに上に移動して行うことができます。

   - 注入し終えたら針を抜き、出血が止まるまで清潔なガーゼで押さえます。
   - マウスをケージに戻します。.

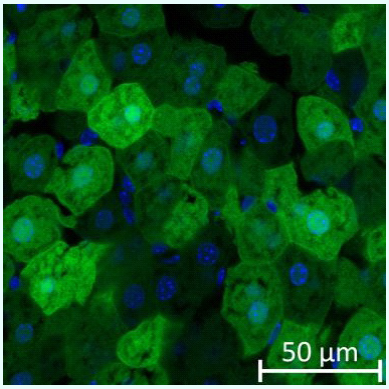
4. **検証**

   AAV粒子は静脈内注射後、組織に留まります。in vivo 形質導入の効率を検証するために、ウィルス注入後7日目に目的組織を摘出し、解析を行います。

結果例

in vivo 形質導入の成功例を示します。:

図 17. 超純粋EGFP発現AAV9（1×10^{13} GC/kg）をマウスに尾静脈注射して10日後、解析のために肝臓を摘出しました。画像は共焦点レーザー顕微鏡にて撮影。
緑：EGFP、青：DAPI



筋肉注射（IM）によるマウスへの投与プロトコール

1. マウスを保定します。保定器具を使用するか麻酔をするとよいでしょう。
2. 自身に近い方の後ろ脚を確保します。
3. 注入は大腿の背面側の大腿骨との間の筋肉（半腱様筋 - 半膜様筋）、又は大腿の前側の筋肉（四頭筋）に行います。
4. 注入する筋肉を指でつまみます。
5. 坐骨神経を避けるように針を差し込みます。太腿の裏側の筋肉の場合は尾に向かって、太腿の前側の場合（四頭筋）は頭に向かって針を刺します。25-30 G 針を使用します。
6. 少し引いてみて血液が入ってこないかを確認します。もし、血液が入ってきたら針を刺し直し、再度確認します。通常、マウスに注入する容量は25µlです。血液が引けないことを確認したら、ゆっくりと試料を注入します。
7. 針を抜き、注射した部位から出血があれば約1分間圧を加え、止血します。
8. マウスをケージに戻し、しばらく痛みや不具合が無いかを観察します。

腹腔内注射（IP）によるマウスへの投与プロトコール

腹腔内注射は簡便、迅速かつ非侵襲的なAAV投与方法です。市販のAAV遺伝子治療薬であるグリベラ（リポ蛋白質エステラーゼ欠損症の治療薬）は腹腔内注射によって投与されます。以下、腹腔内投与のプロトコールです:

1. 投与するAAVウイルス量を注射器に採取します。（腹腔内注射最大量は10ml/kg）
2. 適切な方法でマウスを拘束する。利き手でない方の手でマウスの背をつかみ（皮を集める）し、頭を腹部より少し下げた状態で保持します。
3. 解剖学的な位置を確認し、適切なIP注射部位を決定します。一般的には、膀胱、盲腸、その他の腹部臓器に損傷を与える可能性を減らすために、動物の右下腹部に注射します。
4. 注射部位を7 0%エタノールで消毒し、動物の水平面に対して30～40° の角度で針の傾斜面を上にして挿入します。
5. 針は頭部に向けて刺し、25-27Gの針で針の長さのおよそ半分を挿入します。
6. 針を腹部に刺したら、注入前にシリンジを少し引いて陰圧にし、何も吸引されないことを確認してください。

注意: **吸引物が緑色ならば、腸に穴が開いてる可能性があります。吸引物が黄色ならば、膀胱に穴が開いています。吸引液に血液、尿、胃腸の内容物が含まれる場合は、シリンジを廃棄して新しい注射器と針を使ってやり直してください。どのような合併症の可能性も記録してください。**

7. 注入を開始します。注入は 1～2 秒で完了します。注射針は腹部の内外に動かさないでください。
8. 注入が終わったら、刺した時と同じ角度で針を腹部から抜きます。
9. マウスをケージに戻して合併症の有無を観察します。

マウス脳室内注入（ICV）プロトコール

脳室内（intra-cerebroventricular: ICV）注射は左右の側脳室内に超純粋AAVを注入し、その後中枢神経系（CNS）内に拡散させる方法です。脳室とCNSには二つの側脳室で作られる脳脊髄液（CSF）が含まれています。CSFは側脳室から循環し始め、最終的にくも膜下腔に流れ込みます。くも膜下空は脳、脊髄と仙骨の全体をカバーするため、ICV注射によってウィルスや他の治療薬を血液脳関門で遮断されずに中枢神経系に行き渡らせることが可能です。
研究の目的に適した注入条件を検討するために、EGFP発現AAVなどのレポーターAAVを使用してパイロットテストを実施することができます。

1. **手術前準備**
   - 手術台を70%エタノールで拭きます。
   - 脳定位置固定装置の溝に5ml　純エタノールを加え、冷やします。定期的にドライアイスをエタノールに加え、手術台の温度を約0°Cに保ちます。同時にヒーティングパッドを温めておきます。

注意: マウスを死亡させないために、手術環境は0°C以下に保つようにして下さい。

2. **注入シリンジの準備**
   - 33～34 ゲージ針をPEチューブの端にしっかりとはめ込み、チューブのもう片方の端を10 ul シリンジを取り付けます。
   - 5 ul の 超純粋AAV を針の中に吸い込み、注意深く空気を抜きます。
   - シリンジと針を脳定位置固定装置に固定します。
3. **麻酔**

   マウスの意識を失わせるためにマウスを氷の上にやさしく置き、4分間待ちます。
4. **保定**

   意識を失ったマウスを脳定位置固定装置に保定します。
5. **注入**

5.1. 左側脳室
   - マウスの頭部を 70% エタノールで拭き、ガーゼで余分なエタノールをふき取ります。
   - 針をマウスのラムダ構造の真上に移動します（図18）。スケールのxとy軸の値を記録します。

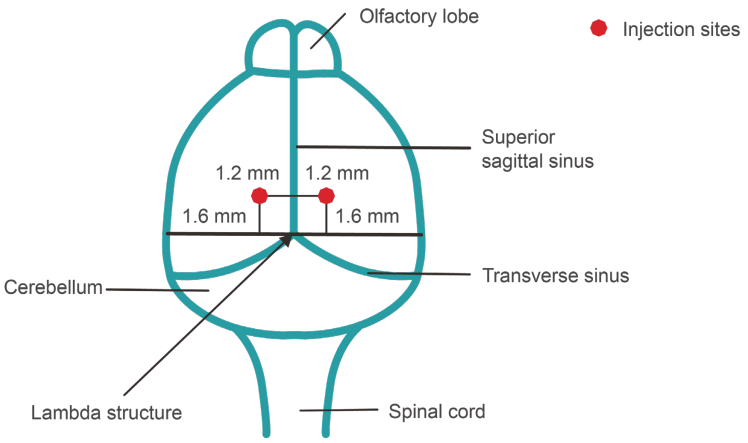


図 18. マウスラムダ構造と注入箇所を真上から見た図

- 針を左測脳室の真上に移動します（x + 1.2 mm, y + 1.6 mm）。そしてz軸方向に調整して、頭蓋骨に針で穴を開けます。
- 頭蓋骨に穴を開けたらすぐにゆっくりと針をマウスから抜きます。

注意: 穴を開ける際は針の圧がかかっているので、z軸方向にほんの少しだけ動かします。穴を開けた後にすぐに針を除去すると頭蓋骨が元の位置に戻ります。

- 再度、注意深く針を穴の中に入れ、ちょうど脳に触れるまで下げます。z軸方向のスケールの値を記録します。
- 左側脳室の中心に針先が来るように針をゆっくりとさらに2.5〜3 mm 下げます。スケールの値は x + 1.2 mm, y+ 1.6 mm, z - 2.5〜3 mmとなります。
- シリンジをゆっくりと押し、2.5 ul のウィルス溶液を左側脳室に注入します。 AAVが脳から漏れないように、ウィルス注入後は一分以上待ちます。
- ゆっくりとz軸方向に針を引き上げ、マウスから針を抜きます。この工程は2 分ほどかけて行います。早く抜きすぎるとAAVの漏れにつながります。

5.2. 右側脳室

- 針を右測脳室の真上に移動します（x - 1.2 mm, y + 1.6 mm)。そしてz軸方向に調整して、頭蓋骨に針で穴を開けます。
- 頭蓋骨に穴を開けたらすぐにゆっくりと針をマウスから抜きます。

注意: 穴を開ける際は針の圧がかかっているので、z軸方向にほんの少しだけ動かします。穴を開けた後にすぐに針を除去すると頭蓋骨が元の位置に戻ります。

- 注意深く、再度針を穴の中にちょうど脳に触れるまで下げます。z軸方向のスケールの値を記録します。
- 右側脳室の中心に針先が来るように針をゆっくりとさらに2.5〜3 mm 下げます。スケールの値は x - 1.2 mm, y +1.6 mm, z - 2.5〜3 mmとなります。
- シリンジをゆっくりと押し、2.5 ul のウィルス溶液を左側脳室に注入します。 AAVが脳から漏れないように、ウィルス注入後は一分以上待ちます。
- ゆっくりとz軸方向に針を引き上げ、マウスから針を抜きます。この工程は2分ほどかけて行います。早く抜きすぎるとAAVの漏れにつながります。

注意: マウスを死亡させないために、30分以上マウスを低温にさせないようにして下さい。

6. 回復

注入後すぐにマウスを温めておいたヒーティングパッドの上に載せ、体温と動きが回復するまで待ちます。

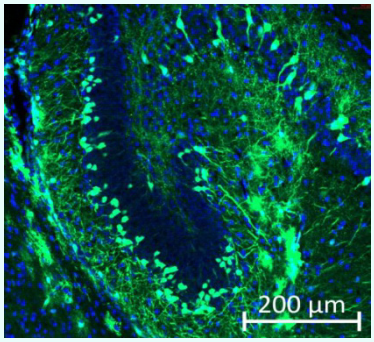
7. 観察

母マウスのいるケージに戻します。さらに実験を進めるまで体調を観察します。

結果例

in vivo 形質導入の成功例を示します:

図 19. 本プロトコールに従って、超純粋EGFP発現AAV9、1×1013 GC/kgをICVにて注入して10日後、解析のために脳を摘出し、解析しました。海馬の画像を共焦点レーザー顕微鏡にて撮影。緑：EGFP、青：DAPI



In VivoにおけるAAV 導入方法の比較

CNS 遺伝子導入

導入方法	メリット	デメリット
直接注入	小さい領域に効率よく透過させることが可能	浸潤性あり
髄膜注射 脳室内注射	中枢神経系にベクターを広く分布させることができる	脳実質への浸透が限定的
髄腔内注射	CSFを介してベクターを分布させるが、主に脊髄と後根神経節（DRG）をターゲットとする	N/A
筋肉注射	逆行性輸送により運動神経と感覚神経をターゲットとする	N/A
血管内投与	中枢神経系に広く伝播する	高いベクター濃度を要し、末梢への暴露が多い

肝臓への遺伝子導入

導入方法		メリット	デメリット	生物種
肝への直接注入	肝葉注射	高い導入率	浸潤性が高く、大小の手術を必要とし、凝固不全動物モデルにおける術中・術後合併症の危険性	マウス
	門脈注射（PV）			ラット, イヌ, NHP
	脾臓カプセル注射			マウス
	肝動脈注射 (HA)			NHP
末梢からのベクター注入	腹腔内注射 (IP)	浸潤性は比較的低く、操作が簡単	大動物モデルでは腹膜腔の容積が大きくなるため、効果が劣る	マウス
	静脈注射 (IV)		腹腔内注射に比べ、注射量が制限される	マウス, イヌ, NHP, ヒト

循環器系への遺伝子導入

導入方法	メリット	デメリット
末梢静脈注射	• 非浸潤性 • 簡単	• 希釈の問題 • 非標的臓器での高発現 • 心筋への導入率が低い
順行性冠状動脈注射	• 臨床的意義 • 低侵襲性	• 導入効率が低い • 虚血領域への送達が制限される
逆行性冠状動脈注射	高い導入効率	順行性の流れの遮断が必要
大動脈クランプ法	高い導入効率	高侵襲性
心筋内直接注入	• 内皮バリアーなし • 肝臓や脾臓への一次影響が出ない • T細胞による炎症が抑制される • 中和抗体に依存しない • 心筋内へのアプローチは侵襲性が低い	• 外科的送達は最も侵襲的な導入方法である • 針跡の損傷 • 注入範囲が限定されるため、目的部位が完全にカバーされない可能性がある • 注入部位の漏れによるベクター導入の制限
心嚢注射	• 最小限の侵襲性 • 高濃度・長時間のベクター投与が可能 • 全身へのベクター分布が少ない	• 心膜細胞への導入がほとんどで、心筋細胞への導入はごく限られる • 注入した薬剤が胸腔内に漏れ、非標的臓器に導入される可能性がある • 臨床応用では、心膜炎や心筋梗塞の既往がある場合、適用が困難

筋への遺伝子導入

導入方法		メリット	デメリット	病態
局所的導入	筋肉注射	• 投与が容易 筋肉への高い導入率 • オフターゲットへの導入が低い • 低い免疫反応	容量の大きい範囲に導入することが難しい	A1ATD, LGMD2D, ポンペ病, 他
	経静脈的四肢灌流			DMD
	冠動脈内注入			心不全, 心筋梗塞 および LGMD
	循環型導入			心不全
	経心筋注入			心不全および DMD
全身性導入	血管内注射	大きな筋肉の広範囲に導入、全身の筋肉導入できる可能性がある	• オフターゲットへの導入、免疫反応 • 高い濃度のベクターが必要 • 特定の AAVセロタイプに限定	FSHD, myocardial infarction
	腹腔内注射			DMD, LGMD

参考文献

Wang D, Zhong L, Nahid MA, Gao G. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Mar;11(3):345-364. doi: 10.1517/17425247.2014.871258.

Moscoso CG, Steer CJ. The Evolution of Gene Therapy in the Treatment of Metabolic Liver Diseases. Genes (Basel). 2020 Aug 10;11(8):915. doi: 10.3390/genes11080915.

Palaschak B, Herzog RW, Markusic DM. AAV-Mediated Gene Delivery to the Liver: Overview of Current Technologies and Methods. Methods Mol Biol. 2019;1950:333-360. doi: 10.1007/978-1-4939-9139-6_20.

Gray SJ, Woodard KT, Samulski RJ. Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy. Ther Deliv. 2010 Oct;1(4):517-34. doi: 10.4155/tde.10.50.

Ishikawa K, Tilemann L, Fish K, Hajjar RJ. Gene delivery methods in cardiac gene therapy. J Gene Med. 2011 Oct;13(10):566-72. doi: 10.1002/jgm.1609.

ユーザーによる発表論文

Sun, Wenfei, et al. "snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis."

***Nature* 7832.587 (2020): 98-102.**

Helseth, Ashley R., et al. "Cholinergic neurons constitutively engage the ISR for dopamine modulation and skill learning in mice."

***Science* 372.6540 (2021): eabe1931.**

Johansen, Sveidahl O. et al. "Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPRR3 to induce adipose thermogenesis."

***Cell* 184.13 (2021): 3502-3518.**

Schaub, Johanna R., et al. "De novo formation of the biliary system by TGFβ-mediated hepatocyte transdifferentiation."

***Nature* 557.7704 (2018): 247-251.**

Haywood, Tom, et al. "Positron emission tomography reporter gene strategy for use in the central nervous system."

***Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.23 (2019): 11402-11407.**

Magalhaes, Joana, et al. "PIAS2-mediated blockade of IFN-β signaling: a basis for sporadic Parkinson disease dementia."

***Molecular Psychiatry* 26.10 (2021): 6083-6099.**

Kanda, Hirosato, et al. "TREK-1 and TRAAK are principal K+ channels at the nodes of Ranvier for rapid action potential conduction on mammalian myelinated afferent nerves."

***Neuron* 104.5 (2019): 960-971.**

Cripe, Timothy P., et al. "Leveraging gene therapy to achieve long-term continuous or controllable expression of biotherapeutics."

***Science Advances* 8.28 (2022): eabm1890.**

Deng, Yuanyuan, et al. "Loss of LAMP5 interneurons drives neuronal network dysfunction in Alzheimer's disease."

***Acta Neuropathologica* (2022): 1-14.**

Chatterjee, Snehajyoti, et al. "Endoplasmic reticulum chaperone genes encode effectors of long-term memory."

***Science Advances* 8.12 (2022): eabm6063.**

Morris, Emma L., et al. "Single-cell transcriptomics of suprachiasmatic nuclei reveal a Prokineticin-driven circadian network."

***The EMBO Journal* 40.20 (2021): e108614.**

Weston, Mikail, et al. "Olanzapine: A potent agonist at the hM4D (Gi) DREADD amenable to clinical translation of chemogenetics."

***Science Advances* 5.4 (2019): eaaw1567.**

Guo, Yuanjun, et al. "Cardiomyocyte homeodomain-interacting protein kinase 2 maintains basal cardiac function via extracellular signal-regulated kinase signaling."

***Circulation* 140.22 (2019): 1820-1833.**

Marcus, David J., et al. "Endocannabinoid signaling collapse mediates stress-induced amygdalo-cortical strengthening."

***Neuron* 105.6 (2020): 1062-1076.**

Motori, E., et al. "Neuronal metabolic rewiring promotes resilience to neurodegeneration caused by mitochondrial dysfunction."

***Science Advances* 6.35 (2020): eaba8271.**

Gonzalez-Rellan, Maria J., et al. "O-GlcNAcylated p53 in the liver modulates hepatic glucose production."

***Nature Communications* 12.1 (2021): 1-21.**

Yshii, Lidia, et al. "Astrocyte-targeted gene delivery of interleukin 2 specifically increases brain-resident regulatory T cell numbers and protects against pathological neuroinflammation."

***Nature Immunology* 23.6 (2022): 878-891.**

Acin-Perez, Rebeca, et al. "Ablation of the stress protease OMA1 protects against heart failure in mice."

***Science Translational Medicine* 10.434 (2018): eaan4935.**

Patel, Suraj J., et al. "Hepatic IRF3 fuels dysglycemia in obesity through direct regulation of Ppp2r1b."

***Science Translational Medicine* 14.637 (2022): eabh3831.**

Byun, Sangwon, et al. "Fasting-induced FGF21 signaling activates hepatic autophagy and lipid degradation via JMJD3 histone demethylase."

***Nature Communications* 11.1 (2020): 1-15.**

Ma, Xia--Hu, et al. "ALOX15-launhed PUFA-phospholipids peroxidation increases the sysceptibility of ferroptosis in ischemia-induced myocardial damage."

***Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (2022): 288.**

Sancar, Gencer, et al. "FGF1 and insulin control lipolysis by convergent pathways"

***Cell Metabolism* 34.1 (2022):171-183.**

Li, Hongde, et al. "YAP/TAZ drives cell proliferation and tumor growth via a polyamine-eIF5A hypusination-LSD1 axis"

***Nature Cell Biology* 24.3 (2022): 373-383.**

Jin, June-Young, et al. "Protein kinase N2 mediates flow-induced endothelial NOS activation and vasuclar tone regulation"

***The Journal of Clinical Investigation* 131.21 (2021): e145734.**

グローバル本社 アメリカ
VectorBuilder Inc.
1010 W 35th Street, Suite 515
Chicago, IL 60609, USA
Tel: (800) 517-2189　+1 773-475-7751(international)
Fax: (408) 649-5280
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

日本法人本社
222-0033
ベクタービルダー・ジャパン株式会社
神奈川県横浜市港北区新横浜 2 丁目 12-16
Tel: +81-45-628-9207
Email: service-jp@vectorbuilder.com
(基礎研究や高度受託サービスに関するお問い合わせやお見積もり)
cdmo-jp@vectorbuilder.com
(GMP 製造を含む、非臨床、臨床研究用受託サービスに関するお問い合わせ)

西日本支社： 神戸医療産業都市オフィス
650-0047
兵庫県神戸市神戸市中央区港島南町 1-5-2
神戸キメックセンタービル 9H
日本国内から：078-945-9155
日本国外から：+81(0)78-945-9155

英国
VectorBuilder Ltd.
Suite F1 Bush House, Edinburgh Technopole
Penicuik, EH26 0PH, United Kingdom
Tel: +44 (0) 7448341295
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

ヨーロッパ
VectorBuilder GmbH
Martin-Behaim-Str. 15
63263 Neu-Isenburg, Germany
Tel: +49 (0) 6102-2486890
Fax: +49 (0) 6102-2486891
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

中国 (Mainland)
VectorBuilder China
Building D, 3rd Floor, 3 Juquan Road, Science City
Guangzhou, 510663, China
Tel: +86 20-28069042
Email: service@vectorbuilder.cn (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

オーストラリア
Tel: 1800-719-779
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

韓国
Tel: +82-2-833-9631
Email: service-kr@vectorbuilder.com
(for general inquiry, Korean)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

イスラエル
Tel: + 34631 821 941
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)
cro@vectorbuilder.com (for CRO inquiry)

September 2022 (EN)