

明 細 書

発明の名称：

ベクター産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞及びその製造方法
及びその選択方法

技術分野

[0001] 本発明は、ウイルスベクター産生細胞及びその製造方法、特にベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞、その製造方法、その選択方法、及びそれを含むキット等に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療等の医療分野において、ヒトを含む哺乳動物細胞に遺伝子を導入する方法として、ウイルス由来の遺伝子導入用のベクター（以下、ウイルスベクター）を用いる方法が一般的である。ウイルスベクターとは、遺伝子組み換え技術を用いて天然由来のウイルスを改変し、所望の遺伝子等を標的に移入することができるようにしたベクターのことで、近年技術開発が進んでいる。

ウイルスベクターの由来となるウイルスとしては、レトロウイルスやレンチウイルス、センダイウイルス、ならびにヘルペスウイルス等のエンベロープを持つウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（以下、AAV）等のエンベロープを持たないウイルス（以下、非エンベロープウイルス）がよく知られている。

特にAAVはヒトを含む広範な種の細胞型に感染可能で、分化を終えた非分裂細胞にも感染すること、ヒトに対する病原性がないため副作用の心配が低いこと、ウイルス粒子が物理化学的に安定であること等から、遺伝子治療法に用いる遺伝子導入用のベクターとして有望視されている。

[0003] アデノウイルスやAAV等の非エンベロープウイルスベクターは、広い組織親和性および細胞親和性、大型の発現カセットの収容能力および高い形質導入効率を示し、遺伝子送達のための望ましい特徴を有している。ウイルス

ベクターの産生には、ウイルスゲノムから除去された機能を相補し得る、操作された細胞株が必要である。ウイルスベクターの医薬の開発および商業上の製造のためには、スケールアップが可能であり、かつ十分な質（安全性）と純度でウイルスベクターを産生可能な細胞を用いることが重要である。

[0004] 例えば、HEK293細胞は、ヒト胎児腎細胞をアデノウイルスのE1遺伝子により形質転換して樹立された細胞株であり、組換えタンパク質生産や組換えアデノウイルス作製や増幅のための宿主などさまざまな用途で利用されている。しかしながら、その生産性は課題が残るものであった。一方、HEK293細胞にSV40 Large T抗原を発現させたHEK293T細胞はウイルスベクターを産生する能力が向上し生産性が高まったものの、がん原性／免疫原性のリスクから臨床での使用に際して懸念がある（非特許文献1）。

AAVベクターの製造に関して、人為的にmiRNAを導入した細胞を用いて高力価のAAVベクター液を取得する工夫などが行われている（特許文献1）が、AAVベクターの生産量は依然として不十分であり、より高い生産性を実現する製造方法の開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6093358号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Dahae Hailey Bae et al., (2020) Mol Ther Methods Clin Dev. 2020 Sep 11; 18: 631-638

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ウイルスベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞、その製造方法、その選択方法、及びそれを含むキット等を提供する

ことを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題に鑑み、高いウイルスベクター生産性を示すウイルスベクター産生細胞（以下、ウイルスベクター高生産性細胞又は単に、高生産性細胞とも称する）と低い生産性を示すウイルスベクター産生細胞（以下、ウイルスベクター低生産性細胞又は単に、低生産性細胞とも称する）のタンパク質発現プロファイルを比較し、サンプル間で発現量に乖離のあるタンパク質を探索した。その結果、ウイルスベクター高生産性細胞において発現量が増加している幾つかのタンパク質及び発現量が減少している幾つかのタンパク質を見出した。これらのタンパク質を、ウイルスベクター産生細胞内での発現調節の対象とすべき候補タンパク質とし、それらの発現乃至促進、あるいは阻害乃至抑制をすることにより、高いウイルスベクター生産能力を有するウイルスベクター産生細胞を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の通りである。

[0009] [1] ベクター生産能力が向上しているウイルスベクター産生細胞であって、該細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、調節されていることを特徴とする、ウイルスベクター産生細胞。

[2] ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して調節されている、上記[1]記載のウイルスベクター産生細胞。

[3] ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節されている、上記[1]記載のウイルスベクター産生細胞。

[4] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加している、上記[1]又は[2]に記載のウイルスベクター産生細胞。

[5] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルス

ベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1.5倍以上増加している、上記〔4〕記載のウイルスベクター産生細胞。

〔6〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加している、上記〔1〕又は〔3〕に記載のウイルスベクター産生細胞。

〔7〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1.5倍以上増加している、上記〔6〕記載のウイルスベクター産生細胞。

〔8〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記〔4〕～〔7〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔9〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記〔4〕～〔7〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔10〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔4〕～〔9〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

[0010] 〔11〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔4〕～〔10〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔12〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、NIFKおよびNOVA2またはSERBP1およびNOVA2である、上記〔4〕～〔

〔１１〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１３〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少している、上記〔１〕又は〔２〕に記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１４〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して１割以上減少している、上記〔１３〕記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１５〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK 293細胞（寄託番号ATCC CRL 1573）と比較して減少している、上記〔１〕又は〔３〕に記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１６〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、HEK 293細胞（寄託番号ATCC CRL 1573）と比較して１割以上減少している、上記〔１５〕記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１７〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記〔１３〕～〔１６〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１８〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記〔１３〕～〔１６〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔１９〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも１種である、上記〔１３〕～〔１８〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔２０〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44及びMRE11からなる群から選ばれる少なくとも１種である、上

記〔13〕～〔19〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔0011〕〔21〕動物細胞由来である、上記〔1〕～〔20〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔22〕ヒト細胞由来である、上記〔1〕～〔21〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔23〕前記ヒト細胞が、HEK293細胞である、上記〔22〕記載のウイルスベクター産生細胞。

〔24〕前記ウイルスベクターが、パルボウイルス科又はレトロウイルス科に属するウイルス由来である、上記〔1〕～〔23〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔25〕前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、上記〔1〕～〔23〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞。

〔26〕ウイルスベクター産生細胞における該ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を調節することを特徴とする、ベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔27〕該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して調節することである、上記〔26〕記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔28〕該調節が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節することである、上記〔26〕記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔29〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加させることである、上記〔26〕又は〔27〕に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔30〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1.5倍以上増加させることである、上

記〔29〕記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[0012]〔31〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加させることである、上記〔26〕又は〔28〕に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔32〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1.5倍以上増加させることである、上記〔31〕記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔33〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記〔29〕～〔32〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔34〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記〔29〕～〔32〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔35〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔29〕～〔34〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔36〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔29〕～〔35〕のいずれかに記載ウイルスベクター産生細胞の製造方法。

〔37〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、NIFKおよ

びNOVA2またはSERBP1およびNOVA2である、上記[29]～[36]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[38] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少させることである、上記[26]又は[27]に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[39] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1割以上減少させることである、上記[38]に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[40] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少している、上記[26]又は[28]に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[0013] [41] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1割以上減少させることである、上記[40]に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[42] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記[26]～[41]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造。

[43] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記[26]～[41]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[44] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記[26]～[43]のいずれかに記載のウイルス

ベクター産生細胞の製造方法。

[45] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、I S G 1 5、C D 4 4 及びM R E 1 1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記[26]～[44]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[46] 動物細胞由来である、上記[26]～[45]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[47] ヒト細胞由来である、上記[26]～[46]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[48] 前記ヒト細胞が、H E K 2 9 3 細胞である、上記[47]記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[49] 前記ウイルスベクターが、パルボウイルス科又はレトロウイルス科に属するウイルス由来である、上記[26]～[48]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[50] 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、上記[26]～[48]のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

[0014] [51] ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を調節することを特徴とする、ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[52] 該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して為される、上記[51]に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[53] 該調節が、H E K 2 9 3 細胞（寄託番号A T C C C R L 1 5 7 3）と比較して為される、上記[51]に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[54] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比

較して増加させることである、上記〔51〕又は〔52〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔55〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1.5倍以上増加させることである、上記〔54〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔56〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加させることである、上記〔51〕又は〔53〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔57〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1.5倍以上増加させることである、上記〔56〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔58〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記〔54〕～〔57〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔59〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記〔54〕～〔57〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔60〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上

記〔54〕～〔59〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[0015] 〔61〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔54〕～〔60〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔62〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、NIFKおよびNOVA2またはSERBP1およびNOVA2である、上記〔54〕～〔61〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔63〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少させることである、上記〔51〕又は〔52〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔64〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1割以上減少させることである、上記〔63〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔65〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少している、上記〔51〕又は〔53〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔66〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1割以上減少させることである、上記〔65〕に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強す

る方法。

〔67〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、上記〔63〕～〔66〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔68〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、上記〔63〕～〔66〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔69〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔63〕～〔68〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔70〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44及びMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔63〕～〔69〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[0016] 〔71〕動物細胞由来である、上記〔51〕～〔70〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔72〕ヒト細胞由来である、上記〔51〕～〔71〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔73〕前記ヒト細胞が、HEK293細胞である、上記〔72〕記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔74〕前記ウイルスベクターが、パルボウイルス科又はレトロウイルス科に属するウイルス由来である、上記〔51〕～〔73〕のいずれかに記載の

ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔75〕前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、上記〔51〕～〔74〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

〔76〕上記〔1〕～〔25〕のいずれかに記載のウイルスベクター産生細胞又は上記〔26〕～〔50〕のいずれかに記載の製造方法によって製造されたウイルスベクター産生細胞を含む、ウイルスベクターを製造する為のキット。

〔77〕ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が調節されている細胞を選抜する工程を含む、ウイルスベクターの産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔78〕ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して調節されている細胞を選抜する工程を含む、上記〔77〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔79〕ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節されている細胞を選抜する工程を含む、上記〔77〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔80〕該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加するように為されている、上記〔77〕又は〔78〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[0017] 〔81〕該調節が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加するように為されている、上記〔77〕又は〔79〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔82〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比

較して減少するように為されている、上記〔77〕又は〔78〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔83〕該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少するように為されている、上記〔77〕又は〔79〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

〔84〕前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、CD44である、上記〔82〕又は〔83〕に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

発明の効果

〔0018〕 本発明でのウイルスベクター産生細胞は、高いウイルスベクター産生能力を有する。従って、本発明のウイルスベクター産生細胞をパッケージング細胞として用いることにより、より多くのウイルスベクターを生産することが可能となる。一度に生産できる量が増えることにより、生産におけるロット数を減らすことが可能となるので、ロット間での品質のばらつき等を低減することが可能になる。

図面の簡単な説明

〔0019〕〔図1〕図1は、AAV2ベクター生産時にPIK3C2A、NIFK、又はUBE2Cを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターの細胞画分の遺伝子導入効率を評価したグラフである（GFP陽性率で表記）。

〔図2〕図2は、AAV2ベクター生産時にPIK3C2A、UBE2C、DDX47、SERBP1又はNIFKを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターの細胞画分の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

〔図3〕図3は、AAV2ベクター生産時にNOVA2、ASNS、FTSJ3、PIK3C2A、GTPBP4、DDX49、GNL2、UBL5、DNMT1、UBE2C、SERBP1、NAT10又はNIFKを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを界面活性剤で抽出した際

の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図4]図4は、AAV1ベクター生産時にUBE2C、ASNS、PIK3C2A、PDCD4又はNFKを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV1ベクターの上清画分の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図5]図5は、AAV1ベクター生産時にNOVA2、DDX49、NAT10、FTSJ3、UBL5、GTPBP4、SERBP1又はGNL2を一過性発現させた細胞によって生産されたAAV1ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図6]図6は、AAV6ベクター生産時にNFK又はPIK3C2Aを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV6ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図7]図7は、AAV2ベクター生産時にMRE11又はISG15をノックダウンした細胞によって生産されたAAV2ベクターの細胞画分の遺伝子導入効率を評価したグラフである（GFP陽性率で表記）。

[図8]図8は、AAV2ベクター生産時にMRE11又はISG15をノックダウンした細胞によって生産されたAAV2ベクターの細胞画分の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図9]図9は、AAV2ベクター生産時にISG15、LMNA、MRE11、CD44又はAPC2をノックダウンした細胞によって生産されたAAV2ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図10]図10は、AAV1ベクター生産時にCD44、MRE11又はISG15をノックダウンした細胞によって生産されたAAV1ベクターを界面

活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図11]図11は、AAV6ベクター生産時にISG15、CD44又はMRE11をノックダウンした細胞によって生産されたAAV6ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである（対照群に対するGFP陽性率の割合で表記）。

[図12]図12は、AAV2ベクター生産時にPIK3C2A又はUBE2Cを一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを細胞画分と上清画分に分けてサンプリングした際の合計のAAVベクターゲノム量を評価したグラフである（単位面積あたりのAAVベクター生産量で表記）。

[図13]図13は、AAV2ベクター生産時にPIK3C2A、UBE2C又はDDX47を一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを細胞画分と上清画分に分けてサンプリングした際の合計のAAVベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記）。

[図14]図14は、AAV2ベクター生産時にNOVA2、ASNS、FTSJ3、PIK3C2A、GTPBP4、DDX49、GNL2、UBL5、DNMT1、UBE2C又はSERBP1を一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを界面活性剤で抽出した際のAAVベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記）。

[図15]図15は、AAV1ベクター生産時にUBE2C、ASNS、PIK3C2A又はPDCD4を一過性発現させた細胞によって生産されたAAV1ベクターを細胞画分と上清画分に分けてサンプリングした際の合計のAAVベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記）。

[図16]図16は、AAV1ベクター生産時にNOVA2、DDX49、NAT10、FTSJ3、UBL5、GTPBP4又はSERBP1を一過性発

現させた細胞によって生産されたA A V 1ベクターを界面活性剤で抽出した際のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのA A Vベクター生産量の割合で表記）。

[図17]図17は、A A V 6ベクター生産時にN I F K又はP I K 3 C 2 Aを一過性発現させた細胞によって生産されたA A V 6ベクターを界面活性剤で抽出した際のA A Vゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのA A Vベクター生産量の割合で表記）。

[図18]図18は、A A V 2ベクター生産時にM R E 1 1又はI S G 1 5をノックダウンした細胞によって生産されたA A V 2ベクターを細胞画分と上清画分に分けてサンプリングした際の合計のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（単位面積あたりのA A Vベクター生産量で表記）。

[図19]図19は、A A V 2ベクター生産時にM R E 1 1又はI S G 1 5をノックダウンした細胞によって生産されたA A V 2ベクターを細胞画分と上清画分に分けてサンプリングした際の合計のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのA A Vベクター生産量の割合で表記）。

[図20]図20は、A A V 2ベクター生産時にI S G 1 5、L M N A、M R E 1 1、C D 4 4又はA P C 2をノックダウンした細胞によって生産されたA A V 2ベクターを界面活性剤で抽出した際のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのA A Vベクター生産量の割合で表記）。

[図21]図21は、A A V 1ベクター生産時にC D 4 4、M R E 1 1又はI S G 1 5をノックダウンした細胞によって生産されたA A V 1ベクターを界面活性剤で抽出した際のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（対照群に対する単位面積あたりのA A Vベクター生産量の割合で表記）。

[図22]図22は、A A V 6ベクター生産時にI S G 1 5、C D 4 4又はM R E 1 1をノックダウンした細胞によって生産されたA A V 6ベクターを界面活性剤で抽出した際のA A Vベクターゲノム量を評価したグラフである（対

照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記)。

[図23]図23は、AAV2ベクター生産時にNOVA2単独、NIFK単独、又はNOVA2及びNIFKを同時に一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである(対照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記)。

[図24]図24は、AAV2ベクター生産時にNOVA2単独、SERBP1単独、又はNOVA2及びSERBP1を同時に一過性発現させた細胞によって生産されたAAV2ベクターを界面活性剤で抽出した際の遺伝子導入効率を評価したグラフである(対照群に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記)。

[図25]図25は、CD44を表面マーカーとしたシングルセルクローニングで回収されたクローンAと選択前の細胞集団の細胞表面におけるCD44の発現量を比較したグラフである。

[図26]図26は、CD44を表面マーカーとしたシングルセルクローニングで回収されたクローンAと選択前の細胞集団を用いてAAV2ベクターを生産させた際の遺伝子導入効率を評価したグラフである(対照群(選択前の細胞集団)に対するGFP陽性率の割合で表記)。

[図27]図27は、CD44を表面マーカーとしたシングルセルクローニングで回収されたクローンAと選択前の細胞集団を用いてAAV2ベクターを生産させた際のAAVベクターゲノム量を評価したグラフである(対照群(選択前の細胞集団)に対する単位面積あたりのAAVベクター生産量の割合で表記)。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

[0021] 1. ウイルスベクター産生細胞及びその製造方法

ウイルスベクターを産生する能力を有する細胞(以下本明細書において、

ウイルス産生細胞、ウイルス生産細胞、産生細胞、又は生産細胞ともいう)は主に1)一過性産生細胞と、2)恒常的産生細胞の2種類が知られている。レトロウイルス産生細胞について例に挙げれば、一過性産生細胞とは、ウイルスベクター産生(すなわち、ウイルス粒子形成)に必要なタンパク質をコードする核酸を搭載した核酸構築物と、ウイルス粒子に封入されるRNAを供給する核酸を搭載した核酸構築物を任意の細胞に一過性導入してレトロウイルスを産生する能力を獲得した細胞である。恒常的産生細胞とは、あらかじめウイルス粒子形成に必須なタンパク質をコードする核酸が染色体に導入され、前記タンパク質を産生する能力を恒常的に有する細胞に、レトロウイルスベクタープラスミド又はレトロウイルスベクターを導入してレトロウイルスを産生する能力を獲得した細胞である。

本発明のウイルスベクター産生細胞は、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、上記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞(以下、調節前の細胞とも称する。)における発現に比較して調節されていることによって、ウイルスベクターを産生する能力が増強された細胞であることが好ましく、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞(寄託番号ATCC CRL-1573)における発現に比較して調節されていることによって、ウイルスベクターを産生する能力が増強された細胞であることがより好ましい。一過性産生細胞であっても恒常性産生細胞であってもよいが、好ましくは一過性産生細胞である。

本発明において、「ベクター産生能力が向上している」とは、ベクター(ここではウイルスベクター)を生産する能力が、調節前の細胞に比べて向上していることを意味する。産生能力の向上の程度は、その差が有意なものである限り特に限定されない。「ベクター産生能力」は質的なものであっても量的なものであってもよい。例えば、ベクター産生能力の質的な向上は、感染能力の高いウイルスベクター(ウイルス粒子)を産生する能力が調節前の細胞に比べて向上していることを意味し、量的な向上は、生産されるウイル

スペクター（ウイルス粒子）の量が調節前の細胞に比べて増加していることを意味する。質的な向上は、例えば産生されたウイルスベクター（ウイルス粒子）の細胞への感染能力（遺伝子導入効率）を測定することで評価することができる。産生されたウイルスベクター（ウイルス粒子）の細胞への感染能力は感染力価として表現することもできる。本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率は、調節前の細胞で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率に比較して増加していることが好ましく、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率に比較して増加していることがより好ましい。本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率は、調節前の細胞で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率に比較して、好ましくは1.01倍以上、より好ましくは1.02倍以上、さらに好ましくは1.05倍以上、特に好ましくは1.1倍以上、最も好ましくは1.15倍以上の増加を意味する。また、本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率は、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）で産生したウイルスベクターの遺伝子導入効率に比較して、好ましくは1.01倍以上、より好ましくは1.02倍以上、さらに好ましくは1.05倍以上、特に好ましくは1.1倍以上、最も好ましくは1.15倍以上の増加を意味する。量的な向上は、ウイルスベクター産生細胞から産生されたウイルスベクター（ウイルス粒子）から得られたゲノムの個数（ゲノム力価）を測定することによって評価することができる。本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターのゲノム力価は、調節前の細胞で産生したウイルスベクターのゲノム力価に比較して増加していることが好ましく、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）で産生したウイルスベクターのゲノム力価に比較して増加していることがより好ましい。本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターのゲノム力価は、調節前の細胞で産生したウイルスベクターのゲノム力価に比較して、好ましくは1.01倍以上、より

好ましくは1.02倍以上、さらに好ましくは1.05倍以上、特に好ましくは1.1倍以上、最も好ましくは1.15倍以上の増加を意味する。また、本発明のウイルスベクター産生細胞で産生したウイルスベクターのゲノム力価は、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）で産生したウイルスベクターのゲノム力価に比較して、好ましくは1.01倍以上、より好ましくは1.02倍以上、さらに好ましくは1.05倍以上、特に好ましくは1.1倍以上、最も好ましくは1.15倍以上の増加を意味する。ゲノム力価の測定方法としては、例えば核酸分解酵素処理とそれに引き続くプロテアーゼ処理を行うことで核酸不純物が分解されたウイルスベクター含有試料中のウイルスゲノムのコピー数をPCR法で検定する方法が例示される。ウイルスベクターの遺伝子導入効率の測定方法としては、例えばウイルスベクター含有試料の系列希釈液を適当な標的細胞に感染させ、導入遺伝子の発現、細胞の形状変化（細胞変性）の検出、細胞に導入されたプロウイルスのコピー数の測定、といった方法が例示される。より具体的には後述の実施例において実施される方法が挙げられる。

[0022] 本発明において、ウイルスベクターの由来となるウイルスとしては、レトロウイルスやレンチウイルス、センダイウイルス、ならびにヘルペスウイルス等のエンベロープを持つウイルス、アデノウイルス、AAV等のエンベロープを持たないウイルス（以下、非エンベロープウイルス）等が挙げられるがこれらに限定されない。エンベロープは、ウイルスが核、小胞体、ゴルジ装置、原形質膜、細胞膜等の膜を貫通して出芽する際に形成され、通常宿主由来のタンパク質又は宿主の細胞膜上に発現したウイルスのタンパク質を伴っており、標的細胞への感染に重要な役割を担っている。

具体的には、アデノウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ヒトパピローマウイルス等のDNAウイルス、ロタウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、サポウイルス、ノロウイルス、ポリオウイルス、エコーウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ライノウイルス、アストロウイルス等のRNAウイルスが挙げられる。より好ましくは、レトロ

ウイルス科のウイルス、アデノウイルス科のウイルス、及びパルボウイルス科のウイルスであり、特にパルボウイルス科のアデノ随伴ウイルス（AAV）が好ましい。AAVはエンベロープを持たない正20面体の外殻（キャプシド）とその内部に1本の線状一本鎖DNAを有する。キャプシドは3つのキャプシドタンパク質（VP1、VP2、及びVP3）を有する。本明細書において、AAVは野生型ウイルス及びその派生物を含み、特に記載する場合を除き全ての血清型及びクレードを含む。AAVの血清型については種々の報告があるが、ヒトに感染するAAVの血清型としては、少なくともAAV1、AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAV11、AAV12及びAAV13の15種類が知られている。

[0023] 「ウイルス粒子」とはキャプシドタンパク質の殻から構成された粒子を意味する。さらに本発明では、「ウイルス粒子」は、ウイルスゲノム（核酸形状）を含むものだけでなく、ウイルスゲノムを含んでいないキャプシドタンパク質のみから構成されたウイルス様の粒子である中空粒子も包含する。

[0024] 本発明において、ウイルスベクターとは、上記ウイルス粒子を意味する場合と該ウイルス粒子に包含されているウイルスゲノム（核酸形状）を意味する場合の両方が含まれ、例えば、AAVの場合、組換えAAV（rAAV）ベクターはrAAV粒子もしくはrAAV粒子内に存在するウイルスゲノムDNAのいずれかを意味する。

[0025] 本発明において、ウイルスベクター産生細胞の由来となる細胞としては、所望のウイルスが増殖可能であれば特に制限はなく、好ましくはウイルスベクターの産生に必要な遺伝子の一部が導入された細胞であり、そのみではウイルスベクターの産生が起こらないパッケージング細胞である。真核細胞由来であり、好適にはトランスフェクション効率が高いHEK293細胞やHEK293T細胞、HEK293F細胞、HEK293FT細胞、G3T-hi細胞、Sf9細胞、市販のウイルス産生用細胞株、AAV293細胞等が挙げられる。好ましくはHEK293細胞である。また、例えば、前記

HEK293細胞等はアデノウイルスE1タンパク質を恒常的に発現するが、このような、rAAVに必要なタンパク質の1つ又はいくつかを一過的もしくは恒常的に発現するように改変した細胞であってもよい。

[0026] 一例として、rAAV産生に必要な要素として、(A) AAV由来Repタンパク質、Capタンパク質、(B) アデノウイルス由来要素、例えばE1a、E1b、E2、E4、VARNA遺伝子、などが例示される。これらの核酸の形態には限定はなく、使用される細胞においてそれぞれの要素を供給可能な1又は複数の核酸構築物として、プラスミドやウイルスベクターに搭載して、細胞に導入することができる。

[0027] 本発明のウイルスベクター産生細胞は、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、調節前の細胞における発現に比較して調節されていることが好ましく、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現に比較して調節されていることがより好ましい。かかるタンパク質の発現が調節されていることによって、当該細胞のベクター産生能力が向上することを本発明者らは見出した。本発明において「タンパク質の発現が調節されている」とは「タンパク質の発現が増加している」こと又は「タンパク質の発現が減少している」ことを意味し、好ましくは「ウイルスベクター産生時に、調節前の細胞における発現と比較して1.5倍以上増加していること」又は「ウイルスベクター産生時に、調節前の細胞における発現と比較して1割以上減少していること」を意味し、より好ましくは「ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して1.5倍以上増加していること」又は「ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して1割以上減少していること」を意味する。また、「タンパク質の発現が調節されている」とは、「タンパク質の活性が調節されている」としてもよい。さらに、発現が調節されているタンパク質は2種以上であってもよい。

[0028] ベクター産生能力を向上する為に、その発現を調節すべきタンパク質とし

ては、所望の効果が得られる限り特に限定されない。発現の調節は、調節前の細胞における発現と比較して1.5倍以上、好ましくは2.0倍以上、3.0倍以上、4.0倍以上、より好ましくは5.0倍以上、6.0倍以上、7.0倍以上、いっそう好ましくは8.0倍以上、9.0倍以上、最も好ましくは10.0倍以上の増加を意味し、あるいは1割以上、好ましくは2割以上、より好ましくは3割以上の減少を意味する。また、発現の調節は、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して1.5倍以上、好ましくは2.0倍以上、3.0倍以上、4.0倍以上、より好ましくは5.0倍以上、6.0倍以上、7.0倍以上、いっそう好ましくは8.0倍以上、9.0倍以上、最も好ましくは10.0倍以上の増加を意味してもよく、あるいは1割以上、好ましくは2割以上、より好ましくは3割以上の減少を意味してもよい。

[0029] ウイルスベクター産生時に、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して発現が増加しているタンパク質としては、以下のタンパク質が例示される（後述の表1も参照のこと）。

phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha

Protein FAM162A

Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C
Guanine nucleotide-binding protein-like 3

Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]

MK167 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein

Programmed cell death protein 4

Probable ATP-dependent RNA helicase
DDX47

Nucleolar GTP-binding protein 1
pre-rRNA processing protein FTSJ3
Probable ATP-dependent RNA helicase
ddx49

Nucleolar GTP-binding protein 2
RNA cytidine acetyltransferase
Translation machinery-associated protein 7

ubiquitin-like protein 5
DNA (cytosine-5)-methyltransferase
1

Plasminogen activator inhibitor 1
RNA-binding protein
RNA-binding protein Nova-2
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1

[0030] ウイルスペクター産生時に、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号 ATCC CRL1573）における発現と比較して発現が減少しているタンパク質としては、以下のタンパク質が例示される（後述の表2も参照のこと）。

Ubiquitin-like protein ISG15
CD44 antigen
Prelamin-A/C
Lysosomal acid phosphatase
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
, cytoplasmic

Double-strand break repair protein
MRE11

[0031] ウイルスペクター産生時に、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して発現が増加しているタンパク質として、好ましくはphosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha (PIK3C2A)、MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein (NIFK)、Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C (UBE2C)、Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (ASNS)、Nucleolar GTP-binding protein 1 (GTPBP4)、pre-rRNA processing protein FTSJ3 (FTSJ3)、Probable ATP-dependent RNA helicase ddx49 (DDX49)、Nucleolar GTP-binding protein 2 (GNL2)、Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SERBP1)、及びRNA-binding protein Nova-2 (NOVA2)が挙げられる。より好ましくはNIFK、FTSJ3、DDX49、SERBP1、及びNOVA2が挙げられる。さらに好ましくは、FTSJ3、NOVA2が挙げられる。

PIK3C2Aは、PI3 kinase familyの一つで細胞増殖、細胞内タンパク質輸送等におけるシグナル伝達に関与しているタンパク質である。

NIFKは、機能は未解明な部分が多いが、RNAと結合し、有糸分裂や細胞周期亢進に寄与するタンパク質である。

UBE2Cは、ユビキチンをE1から受容し、他のタンパク質への共有結

合を触媒する酵素として知られている。

ASNSはアスパラギン合成酵素であり、L-aspartateとL-glutamineからATP依存的にL-asparagineとL-glutamateを合成する。

GTPBP4はGTPaseの一種で、様々な癌細胞や増殖細胞において高発現していることが知られている。

FTSJ3は、methyltransferaseの一種であり、細胞の自然免疫系が内因性と外因性のmRNAを区別するための分子マーカーであるRNAの2'-O-メチル化に関与することが、近年報告されている。

DDX49は、ウイルス感染等に関与することが示唆されているRNAヘリカーゼで、詳細な機能は未解明である。

GNL2は60Sリボソームサブユニットの輸送や成熟に関与するGTPaseであり、細胞増殖促進効果なども報告されている。

SERBP1はmRNAの安定性調節に関与することが示唆されている。

NOVA2は1本鎖RNAに結合し、神経細胞などでRNAのスプライシングや代謝に関与することが示唆されている。

[0032] ウイルスベクター産生時に、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して発現が減少しているタンパク質として、好ましくはUbiquitin-like protein ISG15 (ISG15)、Double-strand break repair protein MRE11 (MRE11)、及びCD44 antigen (CD44) が挙げられる。

ISG15は、ウイルス感染に対する自然免疫応答で重要な働きをされると考えられているユビキチン様分子である。

MRE11は、二重鎖切断の修復、組換え、テロメアの維持等で主要な働きを果たすMRN complexの構成要素である。

CD44は、ヒアルロン酸レセプターとして知られ、細胞の凝集や細胞周辺のマトリックス保持等に関与するタンパク質である。

[0033] ウイルスベクター産生時に、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して2種以上のタンパク質の発現が調節されることでウイルスベクターを産生する能力が増強される。2種以上のタンパク質の組み合わせとしては、RNA-binding protein Nova-2 (NOVA2) とMKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein (NIFK) や、RNA-binding protein Nova-2 (NOVA2) とPlasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (SERBP1) が挙げられる。

[0034] タンパク質の発現の調節は、所望の効果、即ち、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現に比較して増加又は減少、好ましくは1.5倍以上増加又は1割以上減少させることができればその方法は特に限定されないが、例えば、添加剤の添加によりウイルスベクター産生細胞におけるタンパク質の発現を誘導する方法（態様1）、添加剤の添加によりウイルスベクター産生細胞におけるタンパク質の発現を抑制（阻害）する方法（態様2）、ウイルスベクター産生細胞にタンパク質の発現を誘導する外来のプラスミドを導入してその発現量を増加させる方法（態様3）、ウイルスベクター産生細胞にタンパク質の発現を抑制（阻害）する外来のプラスミドを導入してその発現量を減少させる方法（態様4）が挙げられる。タンパク質の発現レベルを測定する方法としては、ウエスタンブロッティングやELISAが挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 態様1で用いるウイルスベクター産生細胞におけるタンパク質の発現を誘導する為の添加剤としては、ウイルスベクター産生細胞内での発現の増強が所望されるタンパク質又はそれをコードする遺伝子（例、mRNA）が挙げられる。当該遺伝子としては、例えば表1に記載のタンパク質の少なくとも1種が挙げられる。遺伝子の導入は、核酸導入の為に当分野で通常実施され

る方法（例、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、ポリエチレンジイミン法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスベクターによる導入）によって実施することができる。当該添加剤として、ウイルスベクター産生細胞内での発現の増強が所望されるタンパク質をコードする遺伝子である外来性プラスミドを用いる場合を態様3として詳述する。

また、該添加剤は、当該タンパク質の発現を誘導し得る活性化剤（例、アロステリックに働いて酵素活性を高めるような低分子化合物）であってもよい。

[0036] 態様2で用いるウイルスベクター産生細胞におけるタンパク質の発現を抑制（阻害）する為の添加剤としては、ウイルスベクター産生細胞内での発現の低減が所望されるタンパク質の細胞内での発現を抑制することができるものが挙げられる。具体的には当該タンパク質の発現を抑制（阻害）し得る核酸（例、アンチセンス核酸、siRNA、shRNA）が挙げられる。例えば表2に記載のタンパク質の少なくとも1種の発現を抑制（阻害）する核酸が挙げられる。核酸の導入は、核酸導入の為に当分野で通常実施される方法（例、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、ポリエチレンジイミン法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスベクターによる導入）によって実施することができる。当該添加剤として、ウイルスベクター産生細胞内での発現の低減が所望されるタンパク質の発現を抑制（阻害）し得る核酸である外来性プラスミドを用いる場合を態様4として詳述する。

また、該添加剤は、当該タンパク質の発現を低減せしめる阻害剤（例、低分子化合物、タンパク質）であってもよい。

[0037] 態様3で用いるタンパク質の発現を誘導する外来のプラスミド（以下、外来性誘導プラスミドとも称する）とは、ウイルスベクター産生細胞に対して外来の、例えば表1に記載のタンパク質の少なくとも1種、好ましくはPIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、

GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種、より好ましくは、PIK3C2A、NIFK、UBE2C、ASNS、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、SERBP1、及びNOVA2からなる群より選ばれる少なくとも1種を発現可能なプラスミドである。NIFKおよびNOVA2またはSERBP1およびNOVA2の組み合わせを発現可能なプラスミドであってもよい。各プラスミドは、それぞれ、表1記載の各タンパク質の遺伝子情報に基づいて調製することができる。

[0038] 態様4で用いるタンパク質の発現を抑制（阻害）する外来のプラスミド（以下、外来性抑制プラスミド）とは、ウイルスベクター産生細胞に対して外来の、例えば表2に記載のタンパク質の少なくとも1種、好ましくはISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種、より好ましくはISG15、MRE11及びCD44からなる群より選ばれる少なくとも1種の発現を抑制（阻害）可能なプラスミドである。発現の抑制（阻害）は、遺伝子をノックアウト、あるいはノックダウンさせることによって実施してもよい。遺伝子のノックダウンとは、特定の遺伝子の転写量を減少させること、あるいは特定の遺伝子からの翻訳を阻害することを指す。遺伝子そのものを破壊する遺伝子ノックアウトとは異なり、ノックダウンは、遺伝子の機能を大きく減弱させるものの完全には失わせない。ある遺伝子をノックアウトする方法としては、標的遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（ターゲティングベクター）を用いて当該遺伝子を破壊する方法（ジーンターゲティング法）や、標的遺伝子の任意の位置にトラップベクター（プロモーターを持たないレポーター遺伝子）を挿入して当該遺伝子を破壊しその機能を失わせる方法などの、当技術分野で周知の方法を用いることができる。ある遺伝子をノックダウンする方法としては、例えば、mRNAのアンチセンス鎖に相当するRNAを細胞に導入するアンチセンス法、siRNA、shRNA、microRNAなどを用いるRNAi法などの、当技術分野で周知の方法を用いることができる。

例えば、ISG15の発現をノックダウンする手法としては、Uniprot ID: P05161の遺伝子情報に基づいて調製したsiRNAの導入を挙げることができる。MRE11の発現をノックダウンする手法としては、Uniprot ID: P05161の遺伝子情報に基づいて調製したsiRNAの導入を挙げることができる。CD44の発現をノックダウンする手法としては、Uniprot ID: P16070の遺伝子情報に基づいて調製したsiRNAの導入を挙げることができる。ノックダウン効率は、mRNAレベルやタンパク質発現レベルの変化を測定することで確認できる。mRNAレベルを測定する方法としては、リアルタイム定量PCR (qPCR)、ノザンブロッティングが挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質発現レベルを測定する方法としては、ウエスタンブロッティング、ELISAが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明において、ノックダウン効率は、得られたウイルスベクター産生細胞においてウイルスベクター生産性が向上され得る限り、特に限定されないが、例えば、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の効率である。

[0039] 外来性誘導プラスミド及び外来性抑制プラスミドを総称して外来性調節プラスミドとも称する。

[0040] プラスミドの導入の方法としては、一過性、又は恒常的な導入方法が例示される。ウイルスベクター産生用のプラスミドと同一のプラスミド中に搭載することも別々のプラスミドに搭載することもできるが、好ましくは別々のプラスミドとする。

一過性に導入する方法は特に限定はなく、公知の一過性導入方法、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、ポリエチレンイミン法、エレクトロポレーション法などが使用可能である。また市販の試薬を用いてもよい。

プラスミドを細胞に恒常的に導入する方法は特に限定はなく、公知の恒常的導入方法、例えばレトロウイルスベクターを用いる方法、プラスミドの一過性導入方法と同様の方法で導入し、染色体に組み込まれた細胞を選択する方法などが使用可能である。レトロウイルスベクターを用いる方法においては、市販の試薬を用いてもよい。

[0041] 本発明のウイルスベクター産生細胞は、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、調節前の細胞やH E K 2 9 3細胞（寄託番号A T C C C R L 1 5 7 3）における発現に比較して調節する工程を含む以外は当分野で通常実施されている方法と同様にして製造することができる。

材料となる、ウイルスベクターを産生する能力を有する細胞にウイルス粒子に封入される核酸が導入され、且つ、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、調節前の細胞やH E K 2 9 3細胞（寄託番号A T C C C R L 1 5 7 3）における発現に比較して調節する工程を実施することにより本発明のウイルスベクター産生細胞を製造することができる。前記のウイルス粒子に封入される核酸は、例えばA A Vの場合、A A V由来のI T R配列とA A Vベクターに搭載することが望まれる核酸で構成される。前記のA A Vベクターに搭載することが望まれる核酸としては、任意の外来遺伝子、例えばポリペプチド（酵素、成長因子、サイトカイン、レセプター、構造タンパク質など）、アンチセンスRNA、リボザイム、デコイ、RNA干渉を起こすRNAなどをコードする核酸が例示される。前記の外来遺伝子の発現の制御のため、適当なプロモーター、エンハンサー、ターミネーターやその他の転写調節要素が前記の核酸に挿入されていてもよい。ウイルス粒子に封入される核酸はプラスミドの形態で細胞に導入することができる。

ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、調節前の細胞やH E K 2 9 3細胞（寄託番号A T C C C R L 1 5 7 3）における発現に比較して調節する工程は、該タンパク質の発現を増強あるいは低減することを目的とした工程であり、例えば上記のタンパク質の発現を調節する方法として例示した態様1～態様4の方法が挙げられる。

かくして得られたウイルスベクター産生細胞はウイルスベクターを産生する能力が増強された細胞である。従って、本発明は、ウイルスベクター産生能力が向上されているウイルスベクター産生細胞の製造方法を提供するが、当該方法は、ウイルスベクター産生細胞のウイルスベクター産生能力を向上する方法でもある。

即ち、本発明は、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して調節することを含む、ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法を提供する。

所望のウイルスが増殖可能な、好ましくはウイルスベクターの産生に必要な遺伝子の一部が導入された細胞において、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して調節（増強又は低減）することにより、該ウイルスベクター産生細胞のウイルス産生能力を向上させることができる（ここで、各用語の定義は上述の通りである）。

また、本発明は、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して調節されている細胞を選抜する工程を含む、ウイルスベクター産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞の選択方法を提供する。

所望のウイルスが増殖可能な、好ましくはウイルスベクターの産生に必要な遺伝子の一部が導入された細胞において、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が調節前の細胞やHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）における発現と比較して調節（増強又は低減）されている細胞は、ウイルスベクターの産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞であって、本発明により、かかるウイルスベクター産生細胞の選択が可能になる（ここで、各用語の定義は上述の通りである）。例えば、ある細胞群からCD44 antigenの発現が調節前の細胞やHEK293細胞（

寄託番号ATCC CRL 1573)における発現に比較して低減されている細胞を選択することで、ウイルスベクターの産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞を得ることができる。

[0042] 2. ウイルスベクターの製造方法

本発明は、ウイルスベクターを製造する方法、特に効率よく製造する方法に関する。本発明のウイルスベクターを製造する方法は、本発明のウイルスベクター産生細胞、即ち、ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、調節前の細胞における発現に比較して調節されていることが好ましく、HEK293細胞(寄託番号ATCC CRL 1573)における発現に比較して調節されていることがより好ましく、ベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞をパッケージング細胞として用いること以外は、当分野で通常実施されている方法と同様にして製造することができる。

本発明のウイルスベクターの製造は、本発明のウイルスベクター産生細胞にウイルスの粒子形成に必須な要素を供給する核酸を一過性又は恒常的に導入する工程を含む方法により得られた、ウイルスベクター産生細胞を培養することで実施される。核酸を一過性又は恒常的に導入する方法としては、特に限定はなく、例えば、プラスミドの導入方法として上記した公知の一過性導入方法又は恒常的導入方法を用いてもよい。

[0043] また、当該細胞の培養は、公知の培養条件で行うことができる。例えば温度30～37℃、湿度95%RH、CO₂濃度5～10%(v/v)での培養が例示されるが、これらに限定されるものではない。ウイルスベクター産生細胞の増殖やウイルス粒子の産生が達成できるのであれば前記の範囲以外の温度、湿度、CO₂濃度で実施してもよい。また、培養期間は特に限定はなく、例えば12～150時間、好適には48～120時間である。ウイルスベクター産生細胞の培養に使用される培地としては、細胞の培養に必要な成分を含んでいればよく、例えば、DMEM、IMDM、DMEM:F-12等の基本合成培地、また必要に応じてこれらの基本合成培地にウシ胎児血清、成長因子類、ペプチド類を添加したり、アミノ酸類を増量したりしたものが

挙げられる。

ウイルスベクター産生細胞からのウイルスベクターの回収は、当分野で通常実施される方法で行うことができる。機械的攪拌、超音波破碎、凍結融解、溶液抽出方法、抽出する溶液のpHや塩濃度を適宜調節する化学的な方法、及びこれらを組み合わせた方法等が挙げられる。

[0044] 本発明のウイルスベクター産生細胞を用いて製造するウイルスベクターには特に限定はなく、既存の血清型もしくは天然から新たに取得した野生型ウイルスに由来する組換えウイルスベクターが例示される。AAVの場合、本発明の細胞を作製する際に適切な材料、例えばRepタンパク質をコードする核酸やCapタンパク質をコードする核酸を選択することにより、使用したい血清型のAAVに基づく組換えAAVベクターを作成することができる。

[0045] 3. キット（ウイルスベクターを製造する為のキット）

本発明は、本発明のウイルスベクター産生細胞又は本発明のウイルスベクター産生細胞の製造方法によって得られたウイルスベクター産生細胞を含む、ウイルスベクターを製造する為のキットを提供する。本キットには、ウイルスベクターのウイルス粒子形成に必要なタンパク質を供給する核酸（例、AAVの場合；Repタンパク質をコードする核酸、Capタンパク質をコードする核酸、アデノウイルス由来タンパク質をコードする核酸）を含み得る。

また、本発明のウイルスベクター産生細胞の製造及びウイルスベクターの製造とを一連の工程で実施するためのキットとして、（i）調節前のウイルスベクター産生細胞、（ii）外来性調節プラスミド（外来性誘導プラスミド又は外来性抑制プラスミド）、及び（iii）ウイルスベクターのウイルス粒子形成に必要なタンパク質を供給する核酸を含むキットが挙げられる。調節前のウイルスベクター産生細胞に外来性調節プラスミドを導入し、ウイルスベクター産生能力が増強されたウイルスベクター産生細胞を得、該細胞を用いてウイルスベクターを製造する。

[0046] 以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は何ら限定されるものではない。使用する試薬及び材料は特に限定されない限り商業的に入手可能であるか、既知文献等によって調製可能である。また、同様の効果、作用を有するものであれば代替可能であることを当業者は理解している。

実施例

[0047] 実施例 1

(1) ウイルスベクター産生細胞ペレットおよび非産生細胞ペレットの調製
T225 フラスコ (コーニング社) に、10% FBS (gibco 社) 及び 1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (100×) (ナカライテスク社) を含む DMEM (シグマ社) に懸濁した HEK293 細胞 (寄託番号 ATCC CRL1573) 及び、10% FBS を含む DMEM に懸濁した HEK293T 細胞 (タカラバイオ社製、製品番号 632273) を播種した。その後、37℃ の CO₂ インキュベーターで培養を続け、およそ 70–80% コンフルエントになっていることを確認した。

AAV ベクター産生群の HEK293 細胞および HEK293T 細胞に対して、(i) ~ (iii) のプラスミドをトランスフェクションした。

(i) AAV2 の Rep タンパク質及び Cap タンパク質をコードするプラスミド

(タカラバイオ社、pRC2-mi342 Vector)

(ii) アデノウイルスの E2A 配列、VA 配列、E4 配列を含むプラスミド

(タカラバイオ社、pHelper Vector)

(iii) AAV2 の 2 つの ITR の間に蛍光タンパク質 GFP の発現カセットを含むプラスミド

(CELL BIO LABS 社、pAAV-GFP)

対照群の HEK293 細胞および HEK293T 細胞に対しては、AAV ベクター産生群と同量のトランスフェクション試薬および DMEM のみを添加した。

37℃のCO₂インキュベーターで培養し、トランスフェクションの24時間後に、HEK293細胞培養フラスコは2%FBS及び1%MEM 非必須アミノ酸溶液(100×)を含むDMEMに、HEK293T細胞培養フラスコは2%FBSを含むDMEMに培地交換した。

37℃のCO₂インキュベーターで培養し、トランスフェクションの48時間後に、0.5M EDTA (pH8.0) (シグマ社)を1/80容量添加した。室温で10分間静置した後、剥離した細胞を遠心チューブに回収した。400×g、4℃で5分間遠心後、上清を除き、細胞ペレットをDPBS (WAKO社)で洗浄した。2×10⁶ cellsの細胞懸濁液をチューブに移液し、400×g、4℃で5分間遠心後、上清を除き、細胞ペレットを使用するまで-80℃で保存した。

[0048] (2) LC-MS/MS測定による宿主細胞タンパク質の同定

実施例1-(1)の2×10⁶ cellsから成る細胞ペレットに対し100μLのLysis buffer (8M Urea (富士フイルム和光純薬社)、50mM TEAB (Thermo社)、pH8.0)を添加した。

Endonuclease (カネカ社)を添加し、粘性を低下させた後、16,000×g、4℃で10分間遠心し、上清を回収した。その後、回収した溶液に含まれる総タンパク質量を、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo社)を用い、製造会社のプロトコールに従って測定した。測定結果をもとに、総タンパク質濃度が1μg/μLの溶液100μLを調製した後、5μLの200mM TCEP (Thermo社)を添加し、55℃で1時間反応させた。

5μLの375mM iodoacetamide (Thermo社)を添加し、遮光状態において、室温で30分間反応させた。アセトン (関東化学社)を600μL添加し、-30℃で一晩静置することでタンパク質を沈殿させた。8,000×g、4℃で10分間遠心後、上清を除去し、ペレットを乾燥させた後に、1mLの50mM TEABを加え溶解させた。2

． 5 μ g のトリプシン（P r o m e g a 社）を添加し、37℃で一晩消化した。溶液のpHを3程度に調整し消化反応を終了させた後、総タンパク質約50 μ g 相当のサンプルをそれぞれ分取し、100mM T E A B で100 μ L に調製した。

TMT-10plex（T h e r m o 社）を用いて、製造会社のプロトコールに従いLC-MS/MS測定にかける試料を調製した。Easy-nLC1200（T h e r m o 社）とOrbitrap Eclipse（T h e r m o 社）を接続したシステムを用いてLC-MS/MSを実行し、Orbitrap Eclipseにより分析した。Proteome Discoverer 2.4（T h e r m o 社）を使用し、TMT標識サンプルの同定及び定量解析を実施した。

4つの異なる細胞ライセート試料（AAVベクター産生HEK293細胞、対照のHEK293細胞、AAVベクター産生HEK293T細胞、対照のHEK293T細胞）をLC-MS/MS分析に供した。実施例1-（1）から実施例1-（2）までの作業を独立して2回実施し、各バッチの試料について3回のMS分析を実施した。同定された宿主細胞由来のタンパク質から、 $p < 0.05$ を満たし、HEK293細胞もしくはHEK293T細胞において、ウイルスベクター生産時に非生産時と比較して存在量が1.5倍以上変動しており、ウイルスベクター生産時のHEK293細胞とHEK293T細胞とで存在量が1.5倍以上差のあるタンパク質を抽出した。条件を満たしたタンパク質を表1及び表2に列挙する。

これらのタンパク質に対し、AAVベクター生産時のHEK293細胞とHEK293T細胞での存在量比にもとづき、下記の通りランク付けをした。

AAVベクター産生HEK293T細胞／AAVベクター産生HEK293細胞もしくはAAVベクター産生HEK293細胞／AAVベクター産生HEK293T細胞が、10.0倍以上のものをA、3.0倍以上10.0倍未満のものをB、1.5倍以上3.0倍未満のものをCとした。表1にお

いては、AAVベクター生産時のHEK293T細胞でのタンパク質の存在量が、AAVベクター生産時のHEK293細胞より増加していることを意味し、表2においては、AAVベクター生産時のHEK293T細胞でのタンパク質の存在量が、AAVベクター生産時のHEK293細胞より減少していることを意味する。

[0049] [表1]

Uniprot ID	タンパク質名	AAVベクター生産HEK293T細胞／ AAVベクター生産HEK293細胞			
		試験1	試験2	平均	ランク
000443	phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	25.65	13.24	19.44	A
Q96A26	Protein FAM162A	2.43	12.71	7.57	B
Q00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	6.97	2.46	4.72	B
Q9EVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	4.54	4.35	4.44	B
P08243-1	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	4.54	2.97	3.75	B
Q9BYG3	MEK167 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	4.24	3.09	3.66	B
Q53EL6-1	Programmed cell death protein 4	4.28	2.29	3.28	B
Q9H054	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	3.32	3.10	3.21	B
Q9BZE4	Nucleolar GTP-binding protein 1	2.62	3.67	3.14	B
Q81Y81	pre-rRNA processing protein FTSJ3	3.27	2.82	3.05	B
Q9Y6V7	Probable ATP-dependent RNA helicase ddx49	2.44	3.48	2.96	C
Q13823	Nucleolar GTP-binding protein 2	2.79	3.05	2.92	C
Q9H0A0	RNA cytidine acetyltransferase	3.07	2.64	2.85	C
Q9Y2S6	Translation machinery-associated protein 7	2.85	2.26	2.55	C
Q9BZL1	ubiquitin-like protein 5	3.21	1.79	2.50	C
P26358-1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	2.24	2.60	2.42	C
Q9NC51-1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	2.17	2.66	2.41	C
Q9UNW9	RNA-binding protein Nova-2	2.14	2.51	2.32	C
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	2.52	1.63	2.07	C

[0050] [表2]

UniProt ID	タンパク質名	AAVベクター産生HEK293細胞/A AVベクター産生HEK293T細胞			
		試験1	試験2	平均	ランク
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	14.29	21.76	18.02	A
P16070	CD44 antigen	—	127.9	127.9	A
P02545	Prelamin-A/C	2.09	2.00	2.04	C
P11117	Lysosomal acid phosphatase	1.93	2.05	1.99	C
Q01581	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	1.54	2.10	1.82	C
P40939	Double-strand break repair protein MRE11	1.62	1.58	1.60	C

[0051] 実施例2

(1) 生産細胞におけるPIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1及びNOVA2の一過性発現

表1におけるphosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alphaをPIK3C2A、Ubiquitin-conjugating enzyme E2 CをUBE2C、Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] をASNS、MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoproteinをNIFK、Programmed cell death protein 4をPDCD4、Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47をDDX47、Nucleolar GTP-binding protein 1をGTPBP4、pre-rRNA processing protein FTSJ3をFTSJ3、Probable ATP-dependent RNA helicase ddx49をDDX49、Nucleolar GTP-binding protein 2をGNL2、RNA cytidine acet

yltransferase をNAT10、ubiquitin-like protein 5 をUBL5、Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein をSERBP1、RNA-binding protein Nova-2 はNOVA2とそれぞれ表記する。

細胞培養用6 well plate (コーニング社) に、10%FBSを含むDMEMに懸濁したHEK293細胞 (Agilent社製、製品番号240073) を播種した。その後、37℃のCO₂インキュベーターで培養を続け、およそ70-80%コンフルエントになっていることを確認した。細胞の培養上清を除去し、血清不含のDMEMに置換し、(i) ~ (iv) のプラスミドをトランスフェクションした。対照群の細胞に対しては、(ii) ~ (iv) のプラスミド及び空ベクターを同様にしてトランスフェクションした。

(i) 該当因子をコードするプラスミド

(Vector Builder社、pRP-Neo-CAG-hPIK3C2A Vector 又は pRP-Neo-CAG-hUBE2C Vector 又は pRP-Neo-CAG-hASNS Vector 又は pRP-Neo-CAG-hNIFK Vector 又は pRP-Neo-CAG-hPDCD4 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hDDX47 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hGTPBP4 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hFTSJ3 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hDDX49 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hGNL2 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hNAT10 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hUBL5 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hSERBP1 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector)

[0052]

[表3]

該当因子名	プラスミド名
PIK3C2A	pRP-Neo-CAG-hPIK3C2A Vector
UBE2C	pRP-Neo-CAG-hUBE2C Vector
ASNS	pRP-Neo-CAG-hASNS Vector
NIFK	pRP-Neo-CAG-hNIFK Vector
PDCD4	pRP-Neo-CAG-hPDCD4 Vector
DDX47	pRP-Neo-CAG-hDDX47 Vector
GTPBP4	pRP-Neo-CAG-hGTPBP4 Vector
FTSJ3	pRP-Neo-CAG-hFTSJ3 Vector
DDX49	pRP-Neo-CAG-hDDX49 Vector
GNL2	pRP-Neo-CAG-hGNL2 Vector
NAT10	pRP-Neo-CAG-hNAT10 Vector
UBL5	pRP-Neo-CAG-hUBL5 Vector
SERBP1	pRP-Neo-CAG-hSERBP1 Vector
NOVA2	pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector

[0053] (ii) pRC2-mi342 Vector 又は pRC1 Vector (タカラバイオ社) 又は pRC6 Vector (タカラバイオ社)

[0054] [表4]

セロタイプ	プラスミド名
AAV2	pRC2-mi342 Vector
AAV1	pRC1 Vector
AAV6	pRC6 Vector

[0055] (iii) pHelper Vector

(iv) pAAV-GFP

トランスフェクション後37℃のCO₂のインキュベーターで3日間培養した。

[0056] (2) 上清画分AAVベクターのサンプリング

実施例2-(1)の培養終了後、培養液の一部をサンプリングし、遠心分離(1, 800×g、10分、4℃)した。遠心後の上清を回収し「AAVベクター上清画分サンプル」とした。サンプリング後、ウェルプレートに残

った培養液に0.5 M EDTA (pH 8.0) を培養液の1/80容量添加し、よく混合した。室温で10分間反応後、細胞を剥離させた。剥離した細胞は溶液のまま回収し、遠心分離(1,800×g、10分、4℃)した。遠心後、上清は除去し、細胞ペレットを得た。

[0057] (3) 細胞画分AAVベクターのサンプリング

実施例2-(2)の細胞ペレットに、Extraction Solution A (AAVpro (登録商標) Extraction Solution タカラバイオ社) を80μL添加し、ボルテックスで15秒間細胞を懸濁した。室温で5分間静置後、さらに15秒間ボルテックスして細胞を懸濁した。細胞懸濁液は遠心分離(9,000×g、10分、4℃)した。さらにボルテックスで15秒間細胞を再懸濁した。室温で5分間静置後さらに15秒間ボルテックスして細胞を懸濁した。遠心分離(9,000×g、10分、4℃)後、上清を回収し、そこに8μLのExtraction Solution B (AAVpro (登録商標) Extraction Solution タカラバイオ社) を添加し、よく混合した後「AAVベクター細胞画分サンプル」とした。

(4) 界面活性剤によるAAVベクターのサンプリング

実施例2-(2)(3)と異なるAAVベクターのサンプリング手法として、界面活性剤を用いたサンプリングを行った。実施例2-(1)の培養終了後培養液の1/1000容量Tween 20 (シグマ社) を加え、さらに終濃度となるように2 mM MgCl₂を、終濃度50 U/mLとなるようにEndonuclease (KANAKA社) を添加しよく攪拌した。37℃のCO₂のインキュベーターで2時間インキュベートして細胞を溶解させた後、培養液を遠沈管に移し、1,800×g、で10分遠心した。遠心分離後の上清を「AAVベクター界面活性剤抽出サンプル(上清画分+細胞画分)」とした。

[0058] 実施例3

(1) 生産細胞におけるMRE11、ISG15、CD44、LMNA及び

ACP2のノックダウン

表2におけるUbiquitin-like protein ISG15をISG15、Double-strand break repair protein MRE11をMRE11、CD44 antigenをCD44、Prelamin-A/CをLMNA、Lysosomal acid phosphataseをACP2と表記する。

細胞培養用6 well plateに、10%FBSを含むDMEMに懸濁したHEK293細胞(Agilent社製、製品番号240073)を播種した。その後、37℃のCO₂インキュベーターで培養を続け、およそ70-80%コンフルエントになっていることを確認した。培養上清を除去し、血清不含のDMEMに培地交換をした。Lipofectamine3000(invitrogen社)を用いて、(i)のsiRNAおよび(ii)～(iv)のプラスミドをトランスフェクションした。対照群の細胞に対しては、(ii)～(iv)のプラスミドを同様にしてトランスフェクションした。

(i) 該当因子発現抑制用siRNA

(シグマ社、si-MRE11 又は si-ISG15 又は si-CD44) (Thermo社、LMNA Silencer 又は ACP2 Silencer)

[0059] [表5]

該当因子名	siRNA名	配列
MRE11	si-MRE11	GCAUCCUGGUGAGGAAUACAAGGG (配列番号1)
ISG15	si-ISG15	AAGAACCUGGUCCCAGAGGAG (配列番号2)
CD44	si-CD44	GGACCAAUUAACCAUAAUATT (配列番号3)
LMNA	LMNA Silencer	-
ACP2	ACP2 Silencer	-

[0060] (ii) pRC2-mi342 Vector 又は pRC1 Vector 又は pRC6 Vector

[表6]

セロタイプ	プラスミド名
AAV2	pRC2-mi342 Vector
AAV1	pRC1 Vector
AAV6	pRC6 Vector

[0061] (iii) pHelper Vector

(iv) pAAV-GFP

トランスフェクション後37℃のCO₂のインキュベーターで3日間培養した。

[0062] (2) 上清画分AAVベクターのサンプリング

実施例3-(1)の培養終了後、培養液の一部をサンプリングし、遠心分離(1,800×g、10分、4℃)した。遠心後の上清を回収し「AAVベクター上清画分サンプル」とした。サンプリング後、ウェルプレートに残った培養液に0.5M EDTA (pH 8.0)を培養液の1/80容量添加し、よく混合した。室温で10分間反応後、細胞を剥離させた。剥離した細胞は溶液のまま回収し、遠心分離(1,800×g、10分、4℃)した。遠心後の上清は取り除き、細胞ペレットを得た。

[0063] (3) 細胞画分AAVベクターのサンプリング

実施例3-(2)の細胞ペレットに、Extraction Solution Aを80μL添加し、ボルテックスで15秒間細胞を懸濁した。室温で5分間静置後、さらに15秒間ボルテックスして細胞を懸濁した。細胞懸濁液は遠心分離(9,000×g、10分、4℃)した。さらにボルテックスで15秒間細胞を再懸濁した。室温で5分間静置後さらに15秒間ボルテックスして細胞を懸濁した。遠心分離(9,000×g、10分、4℃)後、上清を回収し、そこに8μLのExtraction Solution Bを添加しよく混合した後「AAVベクター細胞画分サンプル」とした。

(4) 界面活性剤によるAAVベクターのサンプリング

実施例3-(2)(3)と異なるAAVベクターのサンプリング手法として、界面活性剤を用いたサンプリングを行った。実施例3-(1)の培養終了後培養液の1/1000容量Tween20を加え、さらに終濃度となるように2mM MgCl₂を、終濃度50U/mLとなるようにEndonuclease (KANAKA社)を添加しよく攪拌した。37℃のCO₂のインキュベーターで2時間インキュベートして細胞を溶解させた後、培養液を遠沈管に移し、1,800×g、で10分遠心した。遠心分離後の上清を「AAVベクター界面活性剤抽出サンプル(上清画分+細胞画分)」とした。

[0064] 実施例4

該当因子mRNA量の分析

実施例2-(1)及び実施例3-(1)の培養細胞に対して、High pure RNA Isolation Kit (Roche社)を用いて、製造会社のプロトコールに従いmRNA抽出を実施した。キット付属のカラムによりクリーンアップしたRNA溶液の一部を取り、NanoDrop (Thermo社)を用いて吸光度を測定した。測定結果に基づきサンプル間のRNA濃度を揃え、iScript Adv cDNA kit for RT-qPCR (BIO-RAD社)を用いて、製造会社のプロトコールに従いcDNAを合成した。

調製したcDNA溶液を鋳型とし、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO社)を用いてリアルタイムPCRを行った。リアルタイムPCR反応はCFX96 TouchリアルタイムPCR解析システム (BIO-RAD社)を用いた。各サンプルに対してGAPDH mRNA量を測定し、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1、MRE11、ISG15、CD44、LMNA及びACP2の測定結果をノーマライズした。

対照群(調節前の細胞)の該当因子mRNA量を1としたときの各サンプ

ルにおける比率を表7に、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1、ISG15及びLMNAのGAPDH mRNA量についてHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）の平常時（AAVベクター非生産時）の該当因子mRNA量を1としたときの各サンプルにおける比率を表8に示す。

[0065] [表7]

因子名	R a t i o
P I K 3 C 2 A	38
U B E 2 C	37
A S N S	1.8.E+02
N I F K	32
P D C D 4	8.7.E+02
D D X 4 7	1.4.E+02
G T P B P 4	9.2.E+02
F T S J 3	15
D D X 4 9	1.3.E+02
G N L 2	1.8.E+02
N A T 1 0	1.6
U B L 5	3.2
S E R B P 1	49
I S G 1 5	0.58
M R E 1 1	0.73
C D 4 4	0.87
L M N A	0.39
A C P 2	0.64

[0066]

[表8]

因子名	R a t i o
P I K 3 C 2 A	5.9
U B E 2 C	15
A S N S	2.0.E+03
N I F K	43
P D C D 4	3.9.E+03
D D X 4 7	2.5.E+02
G T P B P 4	4.9.E+02
D D X 4 9	1.1.E+04
G N L 2	6.7.E+02
N A T 1 0	15.9
U B L 5	5.4
S E R B P 1	19
I S G 1 5	0.09
L M N A	0.74

[0067] 表7に示すとおり、実施例2－(1)でP I K 3 C 2 A又はU B E 2 C又はA S N S又はN I F K又はP D C D 4又はD D X 4 7又はG T P B P 4又はF T S J 3又はD D X 4 9又はG N L 2又はN A T 1 0又はU B L 5又はS E R B P 1の発現プラスミドをトランスフェクションした細胞では、いずれについても対照群（調節前の細胞）と比較して該当因子発現量の向上が見られた。また、実施例3－(1)でM R E 1 1又はI S G 1 5又はC D 4 4又はL M N A又はA C P 2に対するs i R N Aを導入した細胞では、いずれについても対照群（調節前の細胞）と比較して該当因子発現量の抑制が見られた。

表8に示すとおり、H E K 2 9 3細胞（寄託番号A T C C C R L 1 5 7 3）の平常時（A A Vベクター非生産時）と比較して、当該因子発現量の増強または抑制が見られた。

[0068] 実施例5

A A Vベクターの遺伝子導入効率評価

細胞培養用24 w e l l p l a t e（コーニング社）に、10% F

B Sを含むDMEMに懸濁したHEK293細胞（Agilent社製、製品番号240073）又は10% FBSを含むEMEM（WAKO社）に懸濁したHeLa細胞（ATCC社製、製品番号CCL-2）を播種した。その後、37℃のCO₂インキュベーターで培養を続け、およそ70-80%コンフルエントになっていることを確認した。

各ウェルにAAV2ベクターについて実施例2-（3）及び実施例3-（3）で調製したAAVベクター細胞画分サンプル、AAV1ベクターについて実施例2-（2）で調製したAAVベクター上清画分サンプル、AAV2ベクター及びAAV1ベクター及びAAV6ベクターについて実施例2-（4）及び実施例3-（4）で調製したAAVベクター界面活性剤抽出サンプル（上清画分+細胞画分）を添加した。なお、AAV2ベクターは主に細胞画分、AAV1ベクターは主に上清画分に存在するため、AAVベクターのセロタイプにより使用するサンプルの画分を変更している。37℃のCO₂インキュベーターで3日間培養後、フローサイトメトリー分析に供し、各サンプルにおけるGFP陽性率を測定し、対照群に対する遺伝子導入ユニット（Transduction unit、以下TU）の割合を算出した。その結果を図1、図2、図3、図4、図5、図6、図7、図8、図9、図10及び図11に示す。

図1、図2、図3、図4、図5及び図6に示すとおり、AAVベクター生産時のPIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、DNMT1、SERBP1及びNOVA2の一過性発現により、対照群と比較してより多くの感染性を保持するAAVベクターが生産された。また、図7、図8、図9、図10及び図11に示すとおり、AAVベクター生産時のMRE11、ISG15、CD44、LMNA及びACP2のノックダウンにより、対照群と比較してより多くの感染性を保持するAAVベクターが生産された。

またこれらの結果から、ウイルスベクター産生細胞において、表1および

表2に記載のランクAからCのいずれかの遺伝子の発現を調節することで、AAVベクターの遺伝子導入効率を向上できることが分かった。

[0069] 実施例6

(1) AAVベクターのゲノム抽出

実施例2-(2)、実施例3-(2)で調製したAAVベクター上清画分サンプル、実施例2-(3)、実施例3-(3)で調製したAAVベクター細胞画分サンプル、及び実施例2-(4)、実施例3-(4)で調製したAAVベクター界面活性剤抽出サンプル(上清画分+細胞画分)に対し、DNase I (タカラバイオ社)を添加し37℃で15分間反応させ、遊離ゲノム及びプラスミドを除去した。その後95℃で10分間熱処理を行い、DNase Iを失活させた。

1/10量のProteinase K (QIAGEN社)及び等量のBuffer AL (QIAGEN社)を添加し、56℃で10分間静置した後、等量のエタノール(関東化学社)を加え、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社)を用いて、製造会社のプロトコルに従いAAVベクターゲノム抽出液のクリーンアップを行った。

(2) リアルタイムPCRによるゲノムタイター測定

実施例6-(1)で調製したAAVベクターゲノム抽出液を鋳型とし、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mixを用いてリアルタイムPCRを行った。検量線用スタンダードは線状化したpAAV-GFPを 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 copies/ μ Lになるよう段階希釈した溶液を使用し、プライマーはAAVベクターゲノムのプロモーター領域を増幅するものを使用した。リアルタイムPCR反応はCFX96 TouchリアルタイムPCR解析システム(BIO-RAD社)を用いた。

AAVベクター上清画分サンプルとAAVベクター細胞画分サンプルについてAAVベクターゲノムの定量を行い、上清画分と細胞画分の合計値から、実施例2及び実施例3における単位培養底面積あたりのAAVベクターゲ

ノム量 ($\text{viral genome}/\text{cm}^2$ 、以下 vg/cm^2) を算出し、対照群に対する割合を得た。また、AAVベクター界面活性剤抽出サンプル (上清画分+細胞画分) についてAAVベクターゲノムの定量を行い、実施例2及び実施例3における単位培養底面積あたりのAAVベクターゲノム量 (vg/cm^2) を算出し、対照群に対する割合 (vg/ratio) を得た。これらの結果を図12、図13、図14、図15、図16、図17、図18、図19、図20、図21及び図22に示した。

図12、図13、図14、図15、図16及び図17に示すとおり、AAVベクター生産時のPIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、DNMT1、SERBP1及びNOVA2の一過性発現により、対照群と比較してより高いAAVベクターゲノム力価が得られた。また、図18、図19、図20、図21及び図22に示すとおり、AAVベクター生産時のMRE11、ISG15、CD44、LMNA及びACP2のノックダウンにより、対照群と比較してより高い単位培養底面積あたりのAAVベクターゲノム力価が得られた。

またこれら結果より、ウイルスベクター産生細胞において、表1および表2に記載のランクAからCのいずれかの遺伝子の発現を調節することで、AAVベクターのゲノム力価を向上できることが分かった。

[0070] 実施例7

(1) 生産細胞におけるNIFK、SERBP1及びNOVA2の単独または複数での一過性発現

細胞培養用6 well plate (コーニング社) に、10% FBSを含むDMEMに懸濁したHEK293細胞 (Agilent社製、製品番号240073) を播種した。その後、37℃のCO₂インキュベーターで培養を続け、およそ70-80%コンフルエントになっていることを確認した。細胞の培養上清を除去し、血清不含のDMEMに置換し、(i) ~ (iv) のプラスミドをトランスフェクションした。対照群の細胞に対しては、(

(i) ~ (iv) のプラスミド及び空ベクターを同様にしてトランスフェクションした。

(i) 該当因子をコードするプラスミド

(Vector Builder 社、pRP-Neo-CAG-hNIFK Vector 又は pRP-Neo-CAG-hSERBP1 Vector 又は pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector)

[0071] [表9]

該当因子名	プラスミド名
NIFK	pRP-Neo-CAG-hNIFK Vector
SERBP1	pRP-Neo-CAG-hSERBP1 Vector
NOVA2	pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector
NOVA2+NIFK	pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector +pRP-Neo-CAG-hNIFK Vector
NOVA2+SERBP1	pRP-Neo-CAG-hNOVA2 Vector +pRP-Neo-CAG-hSERBP1 Vector

[0072] (ii) pRC2-mi342 Vector

(iii) pHelper Vector

(iv) pAAV-GFP

トランスフェクション後37℃のCO₂のインキュベーターで3日間培養した。

[0073] (2) 界面活性剤によるAAVベクターのサンプリング

実施例7-(1)の培養終了後培養液の1/1000容量Tween20 (シグマ社)を加え、さらに終濃度となるように2mM MgCl₂を、終濃度50U/mLとなるように Endonuclease (KANEKA 社)を添加しよく攪拌した。37℃のCO₂のインキュベーターで2時間インキュベートして細胞を溶解させた後、培養液を遠沈管に移し、1,800×g、で10分遠心した。遠心分離後の上清を「AAVベクター界面活性剤抽出サンプル(上清画分+細胞画分)」とした。

[0074] (3) AAVベクターの遺伝子導入効率評価

細胞培養用24 well plateに、10% FBSを含むEME

Mに懸濁したH e L a細胞を播種した。その後、37℃のCO₂インキュベーターで培養を続け、およそ70–80%コンフルエントになっていることを確認した。

各ウェルに実施例7–(1)で調製したAAVベクター界面活性剤抽出サンプル(上清画分+細胞画分)を添加し、37℃のCO₂インキュベーターで3日間培養後、フローサイトメトリー分析に供し、各サンプルにおけるGFP陽性率を測定し、対照群に対する遺伝子導入ユニット(TU)の割合を算出した。その結果を図23及び図24に示す。

図23に示すとおり、AAVベクター生産時のNOVA2及びNIFKの同時一過性発現により、対照群及びNOVA2、NIFK単独の一過性発現時と比較してより多くの感染性を保持するAAVベクターが生産された。また、図24に示すとおり、AAVベクター生産時のNOVA2及びSERBP1の同時一過性発現により、対照群及びNOVA2、SERBP1単独の一過性発現時と比較してより多くの感染性を保持するAAVベクターが生産された。

またこれらの結果から、ウイルスペクター産生細胞において、表1および表2に記載のランクAからCより選択した複数の遺伝子の発現を調節することで、AAVベクターの遺伝子導入効率を向上できることが分かった。

[0075] 実施例8

(1) CD44低発現細胞の選択

表1および表2においてHEK293細胞とHEK293T細胞の発現量の異なるタンパク質を選択マーカーとして、より高いウイルスペクター生産能をもつ生産細胞を取得できると考え、一例としてCD44を選択マーカーとした生産細胞の選択を行うこととした。

1×10⁶ cellsになるよう調製したHEK293細胞(寄託番号ATCC CRL1573)のペレットを196 μLの0.5%BSA(シグマ社)及び2 mM EDTA含有DPBSで懸濁した後、4 μLのAPC標識-anti CD44抗体(Miltenyi Biotec社)を添加し

て十分に混合し、4℃遮光状態で10分間静置した。1 mLの10% FBS及び1% MEM 非必須アミノ酸溶液(100×)を含むDMEMを添加し、300×g、4℃で10分間遠心し、上清を除去した。細胞ペレットを10% FBS及び1% MEM 非必須アミノ酸溶液(100×)を含むDMEMで懸濁した後、AS ONE Cell Picking System(アズワン社)に供し、APCの輝度値の低いシングルセルを384プレートへ回収した。回収したクローン(クローンA)は10% FBS及び1% MEM 非必須アミノ酸溶液(100×)を含むDMEMで拡張培養し以降の試験で用いた。

[0076] (2) 回収クローンのCD44発現量測定

実施例8-(1)で得たクローンAの細胞表面におけるCD44の発現量を測定するため、クローンAおよび選択前の細胞集団であるHEK293細胞(寄託番号ATCC CRL1573)について、 5×10^5 cellsの細胞ペレットを調製した。98 μ Lの0.5% BSA及び2 mM EDTA含有DPBSで細胞ペレットを懸濁した後、2 μ LのAPC標識-anti-CD44抗体を添加して十分に混合し、4℃遮光状態で10分間静置した。1 mLの0.5% BSA及び2 mM EDTA含有DPBSを添加し、300×g、4℃で10分間遠心し、上清を除去した。得られた細胞ペレットを200 μ Lの0.5% BSA及び2 mM EDTA含有DPBSで懸濁し、フローサイトメトリー分析に供した。各サンプルにおけるAPC蛍光強度ヒストグラムを取得し、その結果を図25に示した。

図25に示した通りクローンAの細胞表面におけるCD44の発現量が選択前の細胞集団であるHEK293細胞(寄託番号ATCC CRL1573)と比較して低くなっていることが分かった。

[0077] (3) 回収クローンによるAAVベクター生産

実施例8-(1)で得たクローンAのAAVベクター生産能を評価するため、クローンAおよび選択前の細胞集団であるHEK293細胞(寄託番号ATCC CRL1573)について下記の通りAAVベクターの生産試験

を行った。

細胞培養用 6 well plate に、10% FBS 及び 1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (100×) を含む DMEM に懸濁したクローン A の AAV ベクター生産能を評価するため、クローン A および選択前の細胞集団である HEK293 細胞 (寄託番号 ATCC CRL1573) を播種した。その後、37℃ の CO₂ インキュベーターで培養を続け、およそ 70–80% コンフルエントになっていることを確認した。細胞の培養上清を除去し、血清不含の DMEM に置換し、(i) ~ (iii) のプラスミドをトランスフェクションした。

(i) pRC2-mi342 Vector

(ii) pHelper Vector

(iii) pAAV-GFP

トランスフェクション後 37℃ の CO₂ のインキュベーターで 3 日間培養した。

[0078] (4) 界面活性剤による AAV ベクターのサンプリング

実施例 8 – (3) の培養終了後培養液の 1/1000 容量 Tween 20 を加え、さらに終濃度となるように 2 mM MgCl₂ を、終濃度 50 U/mL となるように Endonuclease を添加しよく攪拌した。37℃ の CO₂ のインキュベーターで 2 時間インキュベートして細胞を溶解させた後、培養液を遠沈管に移し、1, 800×g、で 10 分遠心した。遠心分離後の上清を「AAV ベクター界面活性剤抽出サンプル (上清画分+細胞画分)」とした。

[0079] (5) AAV ベクターの遺伝子導入効率評価

細胞培養用 24 well plate に、10% FBS を含む MEM に懸濁した HeLa 細胞を播種した。その後、37℃ の CO₂ インキュベーターで培養を続け、およそ 70–80% コンフルエントになっていることを確認した。

各ウェルに実施例 8 – (4) で調製した AAV ベクター界面活性剤抽出サ

ンプル（上清画分＋細胞画分）を添加し、37℃のCO₂インキュベーターで3日間培養後、フローサイトメトリー分析に供し、各サンプルにおけるGFP陽性率を測定し、選択前の細胞集団であるHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）に対する遺伝子導入ユニット（TU）の割合を算出した。その結果を図26に示した。

図26に示すとおり、CD44低発現クローンであるクローンAは選択前の細胞集団であるHEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較してより多くの感染性を保持するAAVベクターが生産された。

またこの結果から、ウイルスベクター産生細胞において、表1および表2に記載のタンパク質を選択マーカーとすることで、選択前の細胞集団よりもAAVベクター生産能の高い生産細胞を選択することが可能であると分かった。

[0080] (6) AAVベクターのゲノム抽出

実施例8-(4)で調製したAAVベクター界面活性剤抽出サンプル（上清画分＋細胞画分）に対し、DNase Iを添加し37℃で15分間反応させ、遊離ゲノム及びプラスミドを除去した。その後DNase I反応液の1/10量の500mM EDTAを添加し、DNase Iの反応を止めた。

DNase I反応液の1/10量のProteinase K及びDNase I反応液の等量のBuffer ALを添加し、56℃で10分間静置した後、DNase I反応液の等量のエタノールを加え、DNeasy Blood&Tissue Kitを用いて、製造会社のプロトコールに従いAAVベクターゲノム抽出液のクリーンアップを行った。

[0081] (7) デジタルPCRによるゲノムタイター測定

実施例8-(6)で調製したAAVベクターゲノム抽出液を鋳型とし、ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) (BIO-RAD社)を用いてデジタルドロップレットPCRを行った。プライマーはAAVベクターゲノムのITR領域およびGFP領域を増幅するものを用い、ITR領域にはFAM標識プローブを、GFP領域にはHEX

標識プローブをそれぞれ使用した。装置は Q X 2 0 0 A u t o D G D r o p l e t D i g i t a l P C R システム (B I O - R A D 社) を用いた。

A A V ベクター界面活性剤抽出サンプル (上清画分 + 細胞画分) について I T R 領域と G F P 領域が共に陽性のドロップレット数から A A V ベクターゲノムの定量を行い、実施例 8 - (3) における単位培養底面積あたりの A A V ベクターゲノム量 (vg/cm^2) を算出し、細胞集団である H E K 2 9 3 細胞 (寄託番号 A T C C C R L 1 5 7 3) に対する割合を図 2 7 に示した。

図 2 7 に示すとおり、C D 4 4 低発現クローンであるクローン A は選択前の細胞集団である H E K 2 9 3 細胞 (寄託番号 A T C C C R L 1 5 7 3) と比較してより高い A A V ベクターゲノム力価が得られた。

またこの結果から、ウイルスベクター産生細胞において、表 1 および表 2 に記載のタンパク質を選択マーカーとすることで、選択前の細胞集団よりも A A V ベクター生産能の高い生産細胞を選択することが可能であると分かった。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明で得られたウイルスベクター産生細胞は、ウイルスベクター、特に A A V ベクターの産生能が向上されている。従って本発明のウイルスベクター産生細胞をパッケージング細胞として用いることにより、該ウイルスベクターの生産性を安全に向上することが可能となる。

本出願は、2020年12月25日付で出願された特願2020-217338を基礎としており、ここで言及することによりその内容はすべて本明細書に包含される。

請求の範囲

- [請求項1] ベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞であって、該細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、調節されていることを特徴とする、ウイルスベクター産生細胞。
- [請求項2] ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して調節されている、請求項1記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項3] ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節されている、請求項1記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項4] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加している、請求項1又は2に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項5] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1.5倍以上増加している、請求項4記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項6] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加している、請求項1又は3に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項7] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1.5倍以上増加している、請求項6記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項8] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項4～7のいずれか

1 項に記載のウイルスベクター産生細胞。

- [請求項9] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項4～7のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項10] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項4～9のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項11] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少している、請求項1又は2に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項12] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1割以上減少している、請求項11記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項13] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少している、請求項1又は3に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項14] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1割以上減少している、請求項13記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項15] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項11～14のい

れか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。

- [請求項16] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項11～14のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項17] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項11～16のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項18] ヒト細胞由来である、請求項1～17のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項19] 前記ヒト細胞が、HEK293細胞である、請求項18記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項20] 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、請求項1～19のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞。
- [請求項21] ウイルスベクター産生細胞における該ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を調節することを特徴とする、ベクター産生能力が向上しているウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項22] 該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して調節することである、請求項21記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項23] 該調節が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節することである、請求項21記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項24] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加させることである、請求項21又は22に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

- [請求項25] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1.5倍以上増加させることである、請求項24記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項26] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加させることである、請求項21又は23に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項27] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1.5倍以上増加させることである、請求項26記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項28] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項24～27のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項29] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項24～27のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項30] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、PIK3C2A、UBE2C、ASNS、NIFK、PDCD4、DDX47、GTPBP4、FTSJ3、DDX49、GNL2、NAT10、UBL5、SERBP1およびNOVA2からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項24～29のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項31] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少させることである、請求項21又は22に記載のウ

イルスベクター産生細胞の製造方法。

- [請求項32] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して1割以上減少させることである、請求項31記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項33] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少している、請求項21又は23に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項34] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、ウイルスベクター産生時に、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して1割以上減少させることである、請求項33記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項35] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項21～34のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項36] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項21～34のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項37] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、ISG15、CD44、LMNA、ACP2およびMRE11からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項21～36のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項38] ヒト細胞由来である、請求項21～37いずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項39] 前記ヒト細胞が、HEK293細胞である、請求項38記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。

- [請求項40] 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、請求項21～39のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞の製造方法。
- [請求項41] ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を調節することを特徴とする、ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項42] 該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して為される、請求項41に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項43] 該調節が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して為される、請求項41に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項44] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加させることである、請求項41又は42に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項45] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加させることである、請求項41又は43に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項46] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項44又は45に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。
- [請求項47] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の増加が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項44又は45に記載のウイルスベクター産生細胞

胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[請求項48] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現を、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少させることである、請求項41又は42に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[請求項49] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少している、請求項41又は43に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[請求項50] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該細胞への添加剤の添加によるものである、請求項48又は49に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[請求項51] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現の減少が、該ウイルスベクター産生細胞に外来のプラスミドを導入することによるものである、請求項48又は49に記載のウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクターの産生量を増強する方法。

[請求項52] 請求項1～20のいずれか1項に記載のウイルスベクター産生細胞又は請求項21～40のいずれか1項に記載の製造方法によって製造されたウイルスベクター産生細胞を含む、ウイルスベクターを製造する為のキット。

[請求項53] ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が調節されている細胞を選抜する工程を含む、ウイルスベクターの産生能力が向上したウイルスベクター産生細胞の選抜方法。

[請求項54] ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイ

ルスベクター産生細胞と比較して調節されている細胞を選抜する工程を含む、請求項53に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項55] ウイルスベクター産生細胞におけるウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して調節されている細胞を選抜する工程を含む、請求項53に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項56] 該調節が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して増加するように為されている、請求項53又は54に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項57] 該調節が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して増加するように為されている、請求項53又は55に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項58] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、前記タンパク質の発現が調節される前のウイルスベクター産生細胞と比較して減少するように為されている、請求項53又は54に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項59] 該調節が、前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質の発現が、HEK293細胞（寄託番号ATCC CRL1573）と比較して減少するように為されている、請求項53又は55に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。

[請求項60] 前記ウイルスベクター産生細胞由来のタンパク質が、CD44である、請求項58又は59に記載のウイルスベクター産生細胞の選択方法。