



遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験およびプロセス開発に必要な技術プラットフォームの構築と事業化

齋藤, 俊介

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2023-09-25

(Date of Publication)

2024-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8749号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485933>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験およびプロセス開発
に必要となる技術プラットフォームの構築と事業化

2023年7月

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

齋藤 俊介

目次

	頁
第 1 章 序論	1
1.1 遺伝子治療に関する背景	2
1.2 遺伝子治療用製品の CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)	4
1.3 本研究の目的	5
参考文献	6
第 2 章 デジタル PCR を用いたアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターのゲノム タイター定量試験法に関する研究	7
2.1 AAV ベクターの品質試験項目と分析技術	8
2.2 デジタル PCR の特徴	14
2.3 本研究の背景と目的	16
2.4 DNase 処理パラメータの検証	17
2.4.1 実験方法	17
2.4.2 結果、考察	18
2.5 DNase 不活化パラメータの検証	19
2.5.1 実験方法	19
2.5.2 結果、考察	20
2.6 AAV ベクターの熱安定性の評価	22
2.6.1 実験方法	22
2.6.2 結果、考察	23
2.7 カプシド粒子からの DNA 抽出パラメータの検証	26
2.7.1 実験方法	26
2.7.2 結果、考察	26
2.8 本章まとめ	28
参考文献	29
第 3 章 AAV ベクターの製造に用いる統合型プラスミドの開発	33
3.1 AAV ベクターの製造プロセス	34
3.2 本研究の背景と目的	37
3.3 長鎖 DNA 合成技術を用いた統合型プラスミドの構築	38
3.4 統合型プラスミドによる AAV ベクター生産実験	43
3.4.1 実験方法	43

3.4.2 結果、考察	46
3.5 本章まとめ	50
参考文献	51
第4章 先端技術研究の社会実装に向けた戦略構築	53
4.1 イノベーションアイデア	54
4.2 技術戦略	55
4.2.1 品質試験に関する技術戦略	55
4.2.2 製造プロセスに関する技術戦略	57
4.2.3 技術戦略まとめ	58
4.3 知財戦略	60
4.3.1 品質試験に関する知財戦略	60
4.3.2 製造プロセスに関する知財戦略	61
4.3.3 知財戦略まとめ	65
4.4 事業戦略	65
4.4.1 外部環境分析	65
4.4.2 内部環境分析	76
4.4.3 事業環境まとめ	80
4.4.4 事業化に向けた戦略	82
4.4.5 事業化に向けた計画	87
4.4.6 事業戦略まとめ	90
4.5 財務戦略	91
参考文献	94
第5章 結論	95
5.1 本研究のまとめ	96
5.2 将来展望	98
研究業績	101
謝辞	102

第 1 章

序論

1.1 遺伝子治療に関する背景

遺伝子治療とは「疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と定義¹され、遺伝子を直接体内に投与する方法を *in vivo* 療法、体外で遺伝子を導入した細胞を体内に投与する方法を *ex vivo* 療法に分類される（図 1.1）。

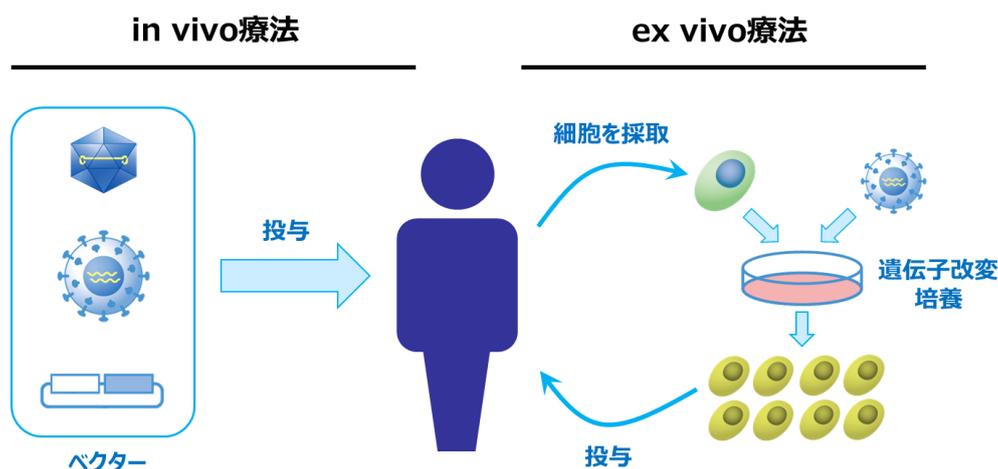


図 1.1. 遺伝子治療の定義と種類

遺伝子治療は、体内または細胞内で遺伝子を発現させるためにベクターが必要となるが、医学、遺伝子工学、分子生物学の進展もあり、近年はウイルスを遺伝子の運び屋としたウイルスベクターを用いた遺伝子治療が主流（図 1.2）となっている^{2,3}。2018 年に *Science* 誌に掲載された総説「Gene therapy comes of age」では、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターとレンチウイルス（LV）ベクターが遺伝子治療に必要不可欠なツールとして挙げられた²。

遺伝子治療は、体内で長期間にわたり治療用タンパク質が発現することから、低分子医薬や抗体医薬等の従来のモダリティ（創薬手段）では実現困難な、単回投与による根治治療の可能性を秘めたモダリティとして注目される。近年、躍進を続ける遺伝子治療ではあるが、歴史は古く、1990 年に世界で初めて米国にてウイルスベクターを用いた遺伝子治療（ADA 欠損症を対症）が行われ、その後、多くの研究開発が進められた。日本においても、1995 年に初めて遺伝子治療が実施されている。しかし、1999 年にアメリカでアデノウイルスベクター投与による死亡事故が、2002 年にフランスでレトロウイルスベクターの挿入変異による白血病発症が連続して発生したため、遺伝子治療は低迷期を迎えることになる。しかし、この低迷期の間、欧米を中心にウイルスベクターの研究を地道に続けた研究者の成果により、2012 年に先進国で初めての遺伝子治療用製品が欧州で承認（製品名：Glybera）された。AAV ベクターを用いた家族性リポ蛋白質リパーゼ欠損症の治療薬である。Glybera の承認以降、遺伝子治療の開発は活発化し、2010 年代半ばから急激に遺伝子治療の開発パイプライ

ン数が増大している（図 1.3）。

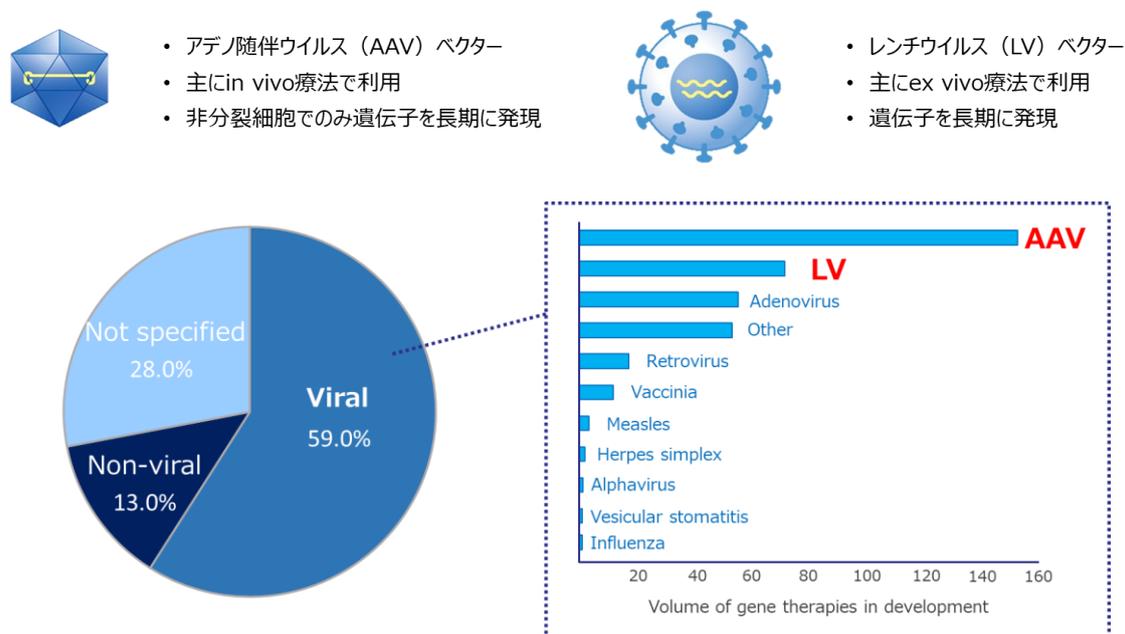


図 1.2. 遺伝子治療に利用されるウイルスベクター（文献 3 を基に著者が作成）

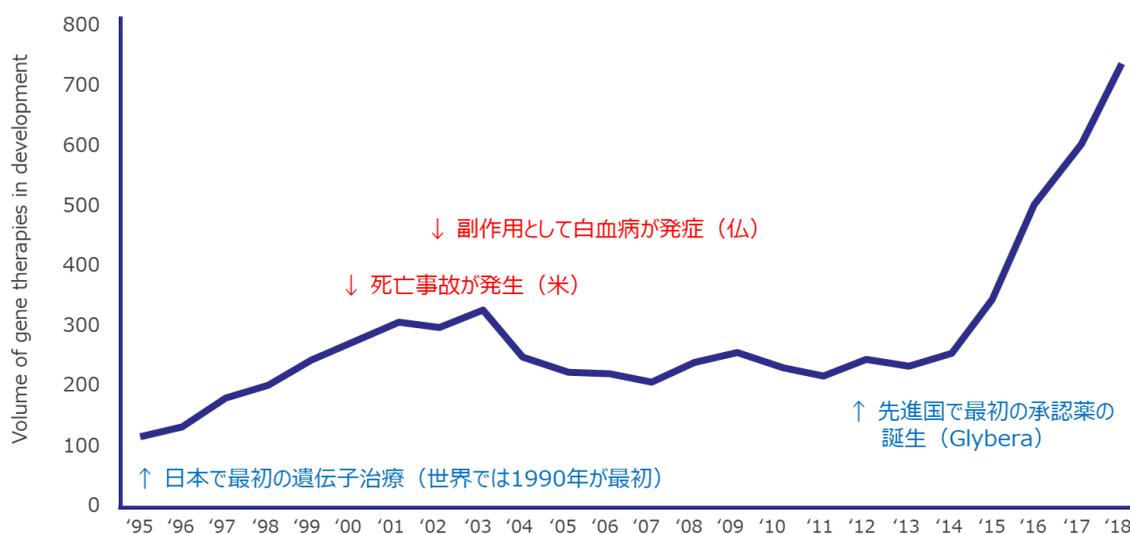


図 1.3. 1995-2018 年の遺伝子治療用製品の開発品目（文献 3 を基に著者が作成）

大手の製薬企業も遺伝子治療に参入するようになり、現在では複数の上市薬も誕生している。血友病 A の治療薬として承認された Hemgenix (BioMarin Pharmaceutical Inc.より販売)、脊髄性筋萎縮症の治療薬として承認された Zolgensma (ノバルティスファーマ株式会社より販売)、レーバー先天性黒内障の治療薬として承認された Luxturna (F. Hoffmann-La

Roche, Ltd.より販売)、B 細胞性急性リンパ芽球性白血病の *ex vivo* 治療薬として承認された Kymriah (ノバルティスファーマ株式会社より販売)、Yescarta (Gilead Sciences, Inc.より販売) 等が上市されており、現在、欧米諸国と日本において 20 個の遺伝子治療用製品が承認されている⁴。

1.2 遺伝子治療用製品の CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)

前述した通り、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は開発が活性化し、黄金期を迎えつつある。近年、CRISPR-Cas9 等のゲノム編集技術も発展しているが、体内でゲノム編集タンパク質を発現させる治療法に対してもウイルスベクターが利用されており、今後の新しいモダリティにおいても需要は高まるだろう。しかし、開発される遺伝子治療のパイプライン数が増大するに連れて、遺伝子治療の普及において二つの大きな課題が表面化してきた。

一つ目の課題は、非常に高額なウイルスベクターの製造コストである。ウイルスベクターはバイオプロダクションにより生産される。現在主流となる製造プロセスは、製造原料として複数のプラスミド DNA を動物細胞に導入後、カラム精製を利用し不純物除去が行われるが、その製造コストは非常に高い。難治性の希少疾患を適応症としていることも多く、2019 年に米国で上市された脊髄性筋萎縮症の治療薬である Zolgensma に関しては、米国で 2 億円を越える価格で販売され話題となった。

二つ目の課題は品質管理手法の問題である。ウイルスベクターは図 1.4 に示す通り、タンパク質、核酸、ナノ粒子の特性を併せもつ非常に複雑な構造をとっているが、治療薬としてウイルスベクターを開発する以上、ウイルスベクターに対してヒトに投与できる品質を保証する事が必須となる。しかし、公的に定められたウイルスベクターの品質規格や標準化された品質試験手順は存在せず、開発機関毎に規格や試験手順を設定している現状である。

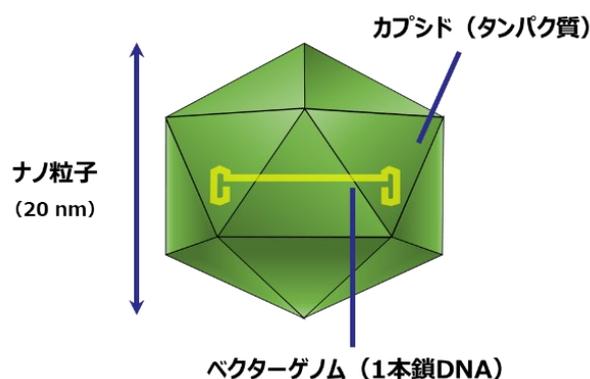


図 1.4. アデノ随伴ウイルスベクターの概略図

このような医薬品の品質・製品化に関する課題解決に取り組む研究開発領域を、製薬業界では CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) と呼び、医薬品の製品化 (社会実装) において必須の研究領域となるが、新しい遺伝子治療の開発パイプライン数が増大するにつれ

て、以前より存在したコストや品質の課題がより大きな問題となって表面化した。急速にパライプライン数が増大する遺伝子治療の開発状況の進展に対して、CMCと規制科学（レギュラトリーサイエンス）に関する発展が世界的に追いつけていない状況である。

AAVベクターを用いた遺伝子治療研究の先駆者の一人である Dr. Guangping Gao は、今後の遺伝子治療の Key challenges として下記の3つを挙げた⁵。

1. Large-scale vector manufacturing and cost
2. Vector quality control and assay standardization
3. Immunological barriers to rAAV gene delivery

1.の「大量スケールのベクター製造とコスト」は製造プロセス開発、2.の「ベクターの品質管理と試験法の標準化」は品質試験法開発に関係する内容であり、まさしく CMC の研究課題に該当する。

また、日本の遺伝子治療研究の第一人者である東京大学の岡田尚巳教授も、2019年3月26日に掲載された日経バイオメディカルの記事において、「遺伝子治療のベクターの品質については、十分な分析がされているとは言い難い状況で、臨床試験に使われているベクターの品質にもばらつきがあるのが実態だ。CMCのコントロール手法や技術開発であれば、日本も今から追いつける可能性がある。」とコメントしており、ウイルスベクターの CMC は、今後の遺伝子治療の発展・普及において重要な研究課題として考えられている。

1.3 本研究の目的

本研究では、近年、遺伝子治療に利用されるウイルスベクターとして最も注目される AAV ベクターを対象にし、製造プロセス開発と品質試験法開発の両面から先端技術研究（図 1.5）を行い、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発を進める上で必須となる CMC に関する技術プラットフォームを構築することを目的とした。

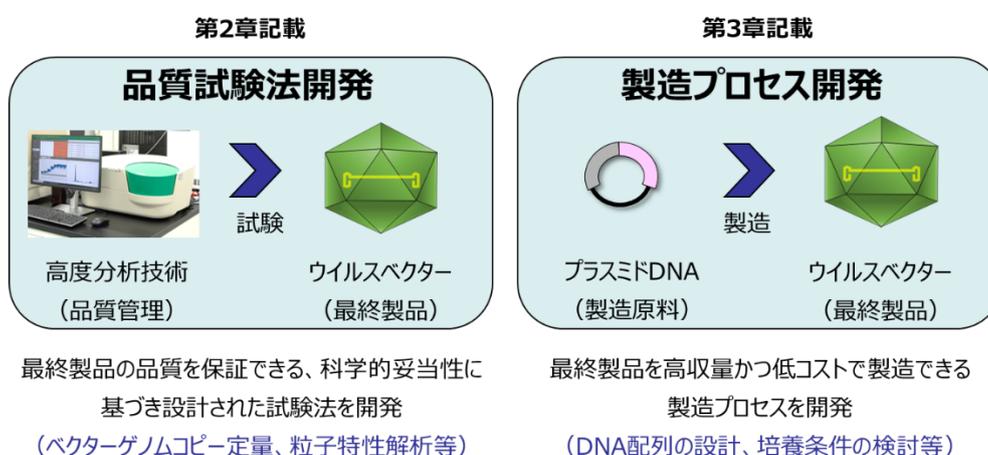


図 1.5. 遺伝子治療用ウイルスベクターの CMC に関する先端技術研究

品質試験法開発については、種々の分析技術、試験・規格情報、業界動向を調査し、ウイルスベクターに対して、高度分析技術を用いた品質試験や特性解析を行える分析体制の構築を目指した。先端技術研究としては、AAV ベクターの投与量の表記にも用いられる重要な特性値であるベクターゲノムタイター（ウイルス粒子に含まれる DNA の定量）に対して科学的妥当性に基づいた試験手順を構築するため、近年注目が高まる高度分析技術であるデジタル PCR を適用し、AAV ベクターの試験検体の前処理条件について検討を行った（第 2 章に記載）。

製造プロセス開発については、AAV ベクターの製造において大きな課題となっている製造コスト低減に繋がる独自の DNA を開発する事を目指し、先端技術研究を行った。具体的には、枯草菌を用いて DNA 断片を集積し環状 DNA を合成する OGAB[®]法を用いて、AAV ベクターの産生に必要な全ての遺伝子を 1 つのプラスミドに搭載した統合型プラスミドを構築し、AAV ベクターの生産実験を行った（第 3 章記載）。

最後に、品質試験法開発と製造プロセス開発の両面から構築した遺伝子治療用ウイルスベクターの技術プラットフォームを活かすイノベーションアイデアとして、「日本を拠点とするウイルスベクターの受託開発事業」を提案した。本イノベーションアイデアを実現するために必要となる事業計画を策定するため、技術、知財、事業、財務の観点から戦略構築を行い、本論文にまとめた（第 4 章に記載）。

参考文献

1. 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 厚生労働省 1-35.
2. Dunbar, C.E., High, K.A., Joung, J.K., Kohn, D.B., Ozawa, K., and Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science* (80-.). 359.
3. *Gene Therapy: A Paradigm Shift in Medicine* (2016). Pharma Intell.
4. ASCGT (2022). *Gene, Cell, and RNA Therapy Landscape*. Q4-2022, x-xii.
5. Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 358-378.

第2章

デジタル PCR を用いたアデノ随伴
ウイルス (AAV) ベクターのゲノム
タイター定量試験法に関する研究

2.1 AAV ベクターの品質試験項目と分析技術

ウイルスベクターを遺伝子治療に用いるためには、ヒトに投与できる品質が保証されるよう、適切な分析試験法や品質規格を設計する必要がある。しかし、ウイルスベクターは、他のモダリティと比べて複雑な構造体（核酸をタンパク質によって包有したナノ粒子）であるため、タンパク質・核酸・ナノ製剤の側面から分析を行う必要がある（図 2.1）。

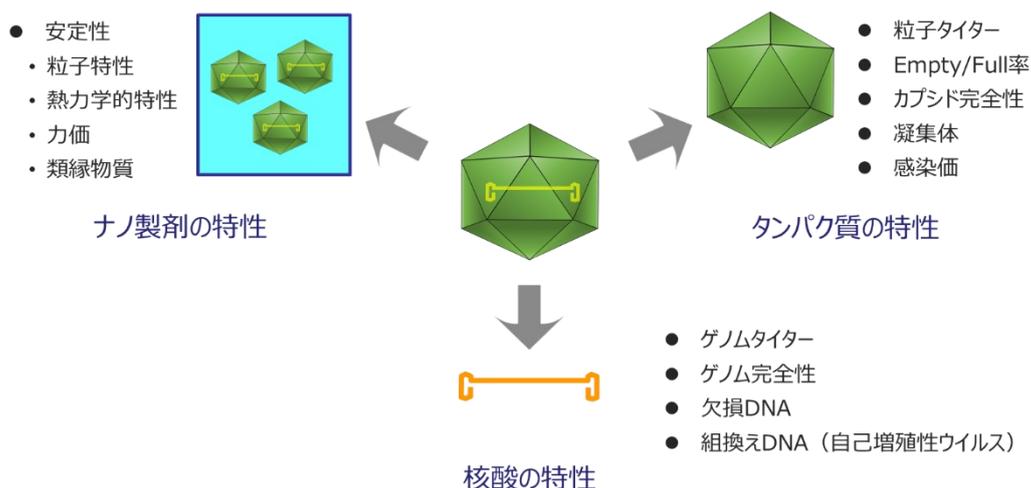


図 2.1. AAV ベクターの特性

低分子医薬品や抗体医薬品については公的機関が定めた品質試験法が公開されているが、遺伝子治療は新しいモダリティであるためウイルスベクターの品質試験項目や試験に用いる分析方法も標準化されていない状況である。近年になり、日米欧の医薬品当局（日本：PMDA、米国：FDA、欧州：EMA）から、遺伝子治療用ウイルスベクターの CMC に関するガイドライン（ドラフト含む）が通知されたが、これらガイダンスには品質に対する考え方について概要は記載されているものの、具体的な品質試験の内容、手法、規格については明記されていない。

<代表的な遺伝子治療の CMC に関するガイドライン>

- 日本：遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針（2019年7月、通知）
- 米国：CMC Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs); Guidance for Industry（2020年1月、通知）
- 欧州：Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials（2019年8月、ドラフト）

標準化された品質管理手法が定まっていない状況のため、遺伝子治療用製品を開発する企業は、独自に CMC の戦略を策定し、各社の方針に基づき適切と考えられる特性解析・品質

試験法を開発し、治験に用いるウイルスベクターの品質管理と品質保証を行う必要がある。即ち、遺伝子治療に利用するウイルスベクターを治験薬・医薬品として適切に分析できる体制を構築するためには、CMCの経験に加えて、分析技術や規制科学に関する高度な専門性が要求される。

遺伝子治療に用いるAAVベクターの品質管理に関する標準試験法が存在しないことは世界的な課題となっており、各品質特性に対して様々な分析技術（図2.2）が適用され、様々な報告がされている状況である^{1,2}。いずれの分析技術も一長一短があるため、文献報告やガイドライン、承認された遺伝子治療用製品の審査報告書を参考にし、各機関でAAVベクターの品質試験に関する戦略を構築する必要がある。

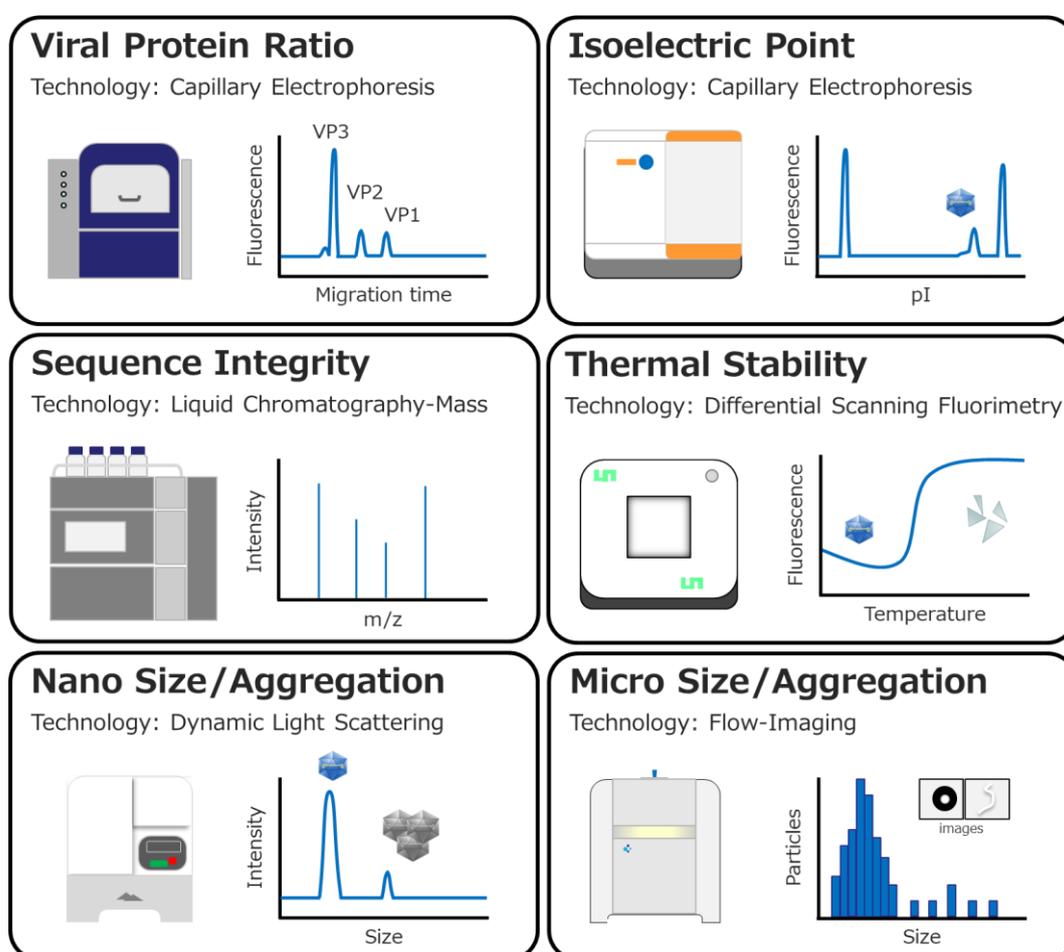


図 2.2. AAV ベクターのタンパク質に関する特性解析例

表 2.1 には、文献に記載された AAV ベクターの規格試験項目と適用される代表的な分析技術を示した³。試験項目毎に様々な分析方法が記載されており、専門性が伴わない場合、どの分析技術を品規格試験として利用することが望ましいか判断が難しい。他の文献も合わせると、さらに多くの分析技術が記載されており、分析技術に対する専門性が品質試験法

開発の実務に必要となる。また、医薬品の品質試験に関して全般的にいえる共通の課題となるが、分析技術の発展に規制が追いつかず、古くから使われている分析技術が現在も変わらず利用される事例は散見される。遺伝子治療等の新しいモダリティにおいては特に問題になりやすく、より高い水準で AAV ベクターの品質を保証するためには、近年発展する高度な分析技術を特性解析・品質管理に適用し、より適切な分析技術を用いて AAV ベクターの品質管理手法を開発する必要がある。

表 2.1. AAV ベクターの品質規格試験項目と分析技術の例³

Attribute	Assay	Method examples	Attribute	Assay	Method examples
Strength /Dose	Vector genome titer	Dot blot, qPCR, ddPCR, Fluorimetry	Purity	Empty particles	qPCR/ELISA, HPLC, TEM, AUC
	Infectious genome titer	ICA, TCID50		Residual reagents and raw materials	HPLC, ELISA, Mass, qPCR
	Total vector particles	ELISA, SDS-PAGE	Safety	Sterility	EP2.6.1, USP<71>
	Activity: expression assay	Cell based assay		Endotoxin	EP2.6.14, USP<85>
	Potency: functional activity	Cell based or in vivo		Mycoplasma	EP2.6.7
Identity	Genome DNA	Sequencing	Adventitious virus	EP2.6.16	
	VP particles	Western blot, Mass	Replication competent AAV	Cell based	
Purity	Host cell DNA	qPCR	Vector aggregates	DLS	
	Residual plasmid	qPCR			
	Host cell protein	ELISA			

ddPCR: Droplet Digital Polymerase Chain Reaction, ICA: Infectious Center Assay, TCID50: Median Tissue Culture Infectious Dose, ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, HPLC: High Performance Liquid Chromatography, TEM: Transmission Electron Microscope, AUC: Analytical Ultra-Centrifugation, EP: European Pharmacopoeia, USP: United States Pharmacopoeia, DLS: Dynamic Light Scattering

次に、ウイルスベクターの品質特性の複雑さについて、複数の角度から説明する。図 2.3 には、AAV ベクターの力価（有効性）に関係する品質特性について記載した。ベクターゲノム（VG）タイター（図 2.3 の左）は、カプシド粒子中に含まれる治療用遺伝子が搭載された DNA の定量値となる。AAV ベクターの投与量として表記されるため非常に重要な数値となるが、従来より利用される定量 PCR 法では、変異を含む DNA や不完全な DNA も定量結果に反映された値となる。一方、ベクター粒子（VP）タイター（図 2.3 の中央）は、カプシド粒子を定量する値となるため、DNA を含まない空カプシドや不完全粒子を含む定量結果となる。生物活性（図 2.3 の右）は、細胞を用いて AAV ベクターの細胞への感染力、翻訳されたタンパク質量や活性を評価する。AAV ベクターの活性について細胞を用いて分析するため、治療メカニズムにより近い評価方法と考えられるが、GMP (Good Manufacturing

Practice: 医薬品の製造管理及び品質管理の基準) 管理下で実施する場合、コストが高いという欠点がある。また、試験結果のバラつきも大きくなりやすい。それぞれの特性値には特徴があり、各分析技術に対して適・不適を述べることはできず、特に開発段階においては、複合的に分析を行い、AAV ベクターの特性を評価することが重要となる。

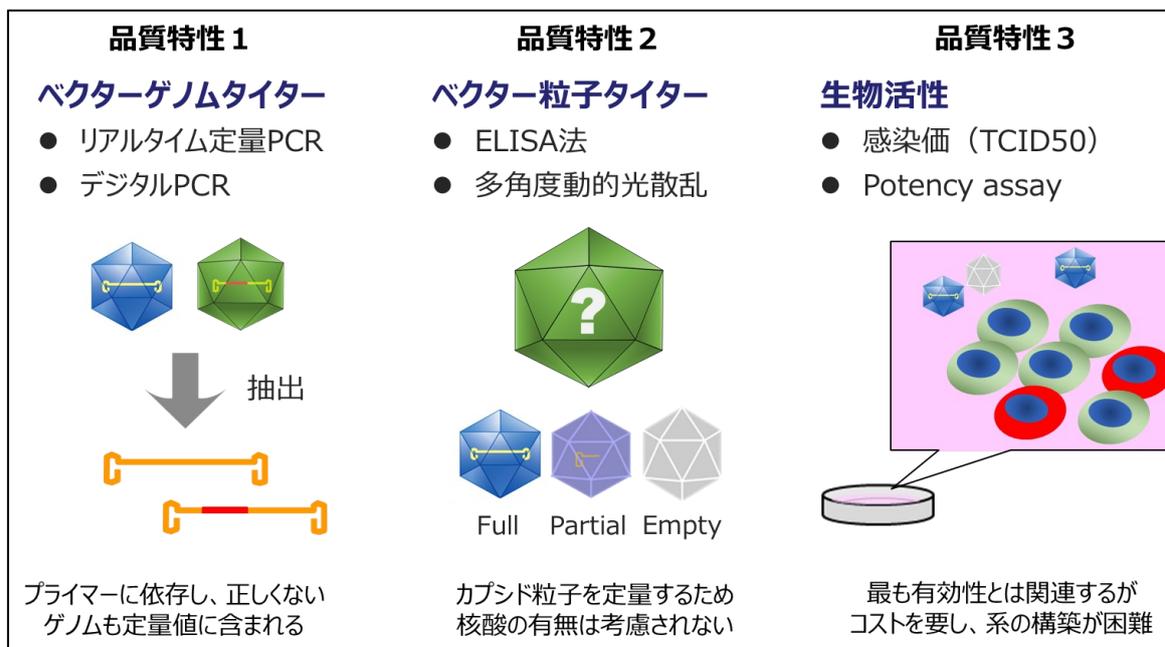


図 2.3. 力価に関する品質特性と分析技術

同様に、不純物についても複合的な解析ができる分析体制が重要となる。AAV ベクター製剤には、宿主由来不純物、プロセス由来不純物、製品由来不純物が混入する。代表的な不純物定量に利用される分析技術について図 2.4 に示した。例えば、核酸関連の不純物については、宿主・プロセス・製品それぞれから混入するが、従来、汎用される定量 PCR は標的配列 (プライマー) に依存した個別の核酸定量しかできないが、欧米では次世代シーケンサーを用いて網羅的に不純物の核酸配列を解析する手法が開発されており、定量 PCR に比べて検出性も改善されている^{4,5}。

タンパク質関連の不純物については、抗体医薬と同様の分析技術が多く利用されている。AAV のカプシド粒子は VP1、VP2、VP3 の 3 つのサブユニットが集合し形成されるが、各サブユニットはキャピラリー電気泳動で分離でき、変異体が生じた場合は不純物として定量することも可能である⁶。またカプシドタンパク質を消化して HPLC-Mass を用いてペプチドマッピング解析することで酸化、脱アミド化や翻訳後修飾を定量できる⁷。

抗体医薬において凝集体は製剤保存中にも増加し、免疫原性に影響するため、適切な管理が要求される不純物である。AAV ベクターにおいても同様で、凝集体を含む粒子特性解析としては動的光散乱法が汎用される。特に、新しい分析技術として注目される多角度動的光

散乱法（MA-DLS: Multi-Angle Dynamic Light Scattering）は、ナノスケールにおいて精度高い粒子解析が可能⁸で AAV ベクターの品質管理に利用している製薬企業もある。しかし、MA-DLS にも弱点はあり、粗大な粒子が混入している場合、粗大粒子からの散乱光強度が非常に強くなるため、AAV 粒子からの散乱光の検出が困難になる。そのため凝集体の評価を行う場合は、MA-DLS に加えて、Flow Imaging Microscopy（FIM）による定量も行うことが望ましい。FIM はフローセルを通過する粒子を顕微鏡でカウントする技術であり、マイクロスケールの粒子の個数と形状を計測できる技術である⁹。

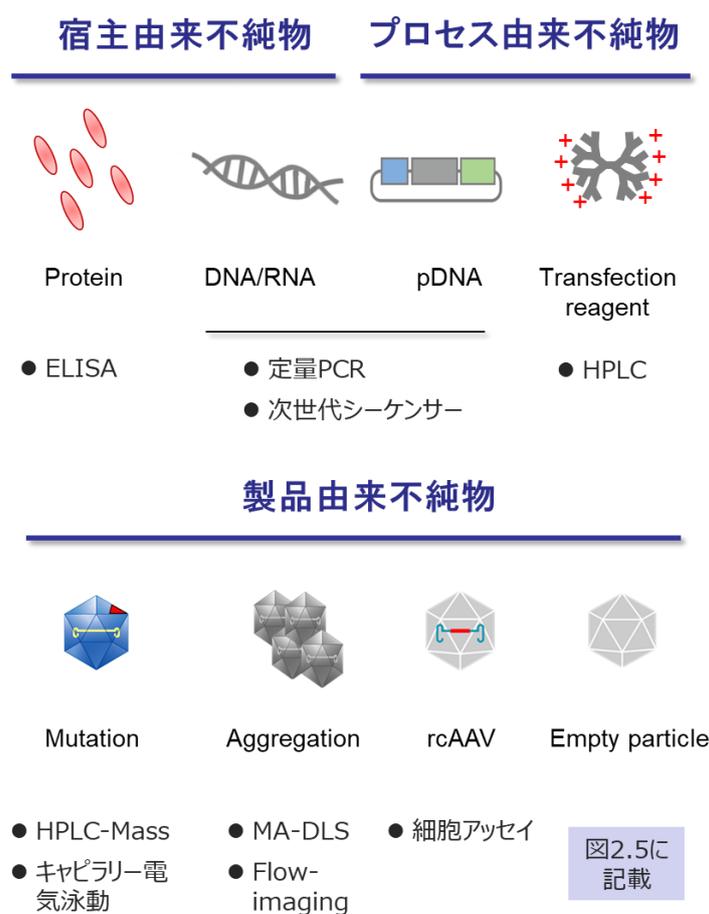


図 2.4. AAV ベクターの各種不純物の評価項目と定量方法

AAV ベクターの不純物において、特に適切な分析法の開発が求められる品質特性は空カプシドである。空カプシドは治療効果に繋がる遺伝子を包有していないため、有効性は全く無い。しかし、免疫原性に影響するため安全性に関係する不純物であり、特に静脈注射で全身に大量投与される疾患においては、毒性の懸念からより適切な管理が求められる。プラスミド DNA のトランスフェクションにより産生される AAV ベクターには、50-95%の空カプシドが含まれるという報告¹⁰もあり、プロセス開発においても適切な分析法が必要とされる。代表的な空カプシドの分析技術を図 2.5 に示す。定量 PCR による核酸の定量値と ELISA

によるカプシドの定量値の比率を空カプシド率とする方法（図 2.5 記載の試験法①）、電子顕微鏡で得られる画像から空カプシドの割合を算出する方法（図 2.5 記載の試験法②）は古くから利用される方法だが、分析原理に起因する定量値のバラつきや判定基準に関する設定の難しさが課題として挙げられる。

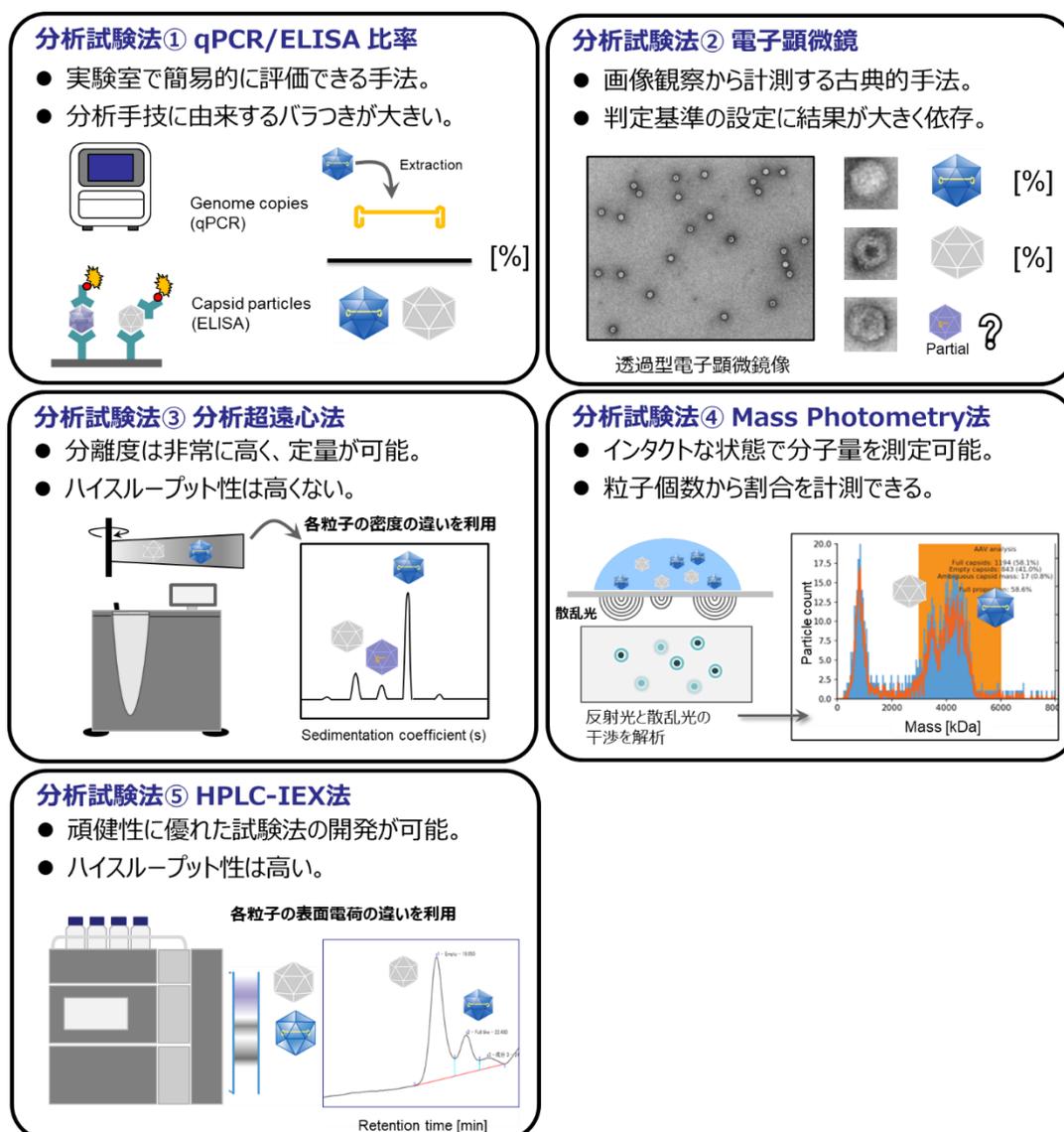


図 2.5. 空カプシド定量に利用される代表的な分析技術

新しい分析技術としては分析超遠心法が代表的な方法（図 2.5 記載の試験法③）である。各物質の密度の違いを利用して AAV ベクターと不純物を分離し、空カプシドだけでなく、凝集体や Partial 粒子と呼ばれる DNA の断片を含むカプシド粒子も定量可能である¹¹。分離度は非常に高く、高い精度の定量が可能となるが、ハイスループット性の低さが課題がある。Mass Photometry 法（図 2.5 記載の試験法④）は、Oxford 大学で開発された新しい分析技術

で、タンパク質粒子の散乱光と反射光の干渉パターンが分子量に比例することを利用した方法である¹²。AAV ベクターと空カプシドは、カプシドに包有される DNA の重さの分だけ分子量がシフトするため、空カプシドの定量が可能となる¹³。インタクトな状態の AAV ベクター粒子を計測できる非常に優れた分析技術である。HPLC を用いた定量法（図 2.5 記載の試験法⑤）は、DNA を含む AAV ベクターと空カプシドの表面電荷の違いを利用して分離し、蛍光や UV で検出する。AAV の血清型により分離条件の最適化が必要となるが、試験条件が完成すれば非常に頑健性に優れた品質試験が可能となる¹⁴。

空カプシドを例にとっても、定量に利用できる分析技術は多く存在する。どの技術も長所や短所があり、様々な品質特性に対して目的に応じた適切な分析技術を選択することが必要となるため、品質試験法開発には分析技術に関する幅広い専門性が必要となる。

2.2 デジタル PCR の特徴

AAV ベクターの品質試験において、タンパク質の分析だけでなく核酸の分析（図 2.6）が必要となり、特に、AAV ベクターに含まれる治療用 DNA のコピー数（VG タイター）を定量する試験法は非常に重要な役割をもち、VG タイターは、遺伝子治療の有効性と非常に関係するため重要な品質特性となる。力価を評価する分析方法としては、細胞を用いて感染価やポテンシーを評価する細胞アッセイも重要であるが、コストや頑健性の課題もあり、品質試験法としては VG タイターの定量試験法が広く利用され、投与量の表記にも VG タイターが用いられる。

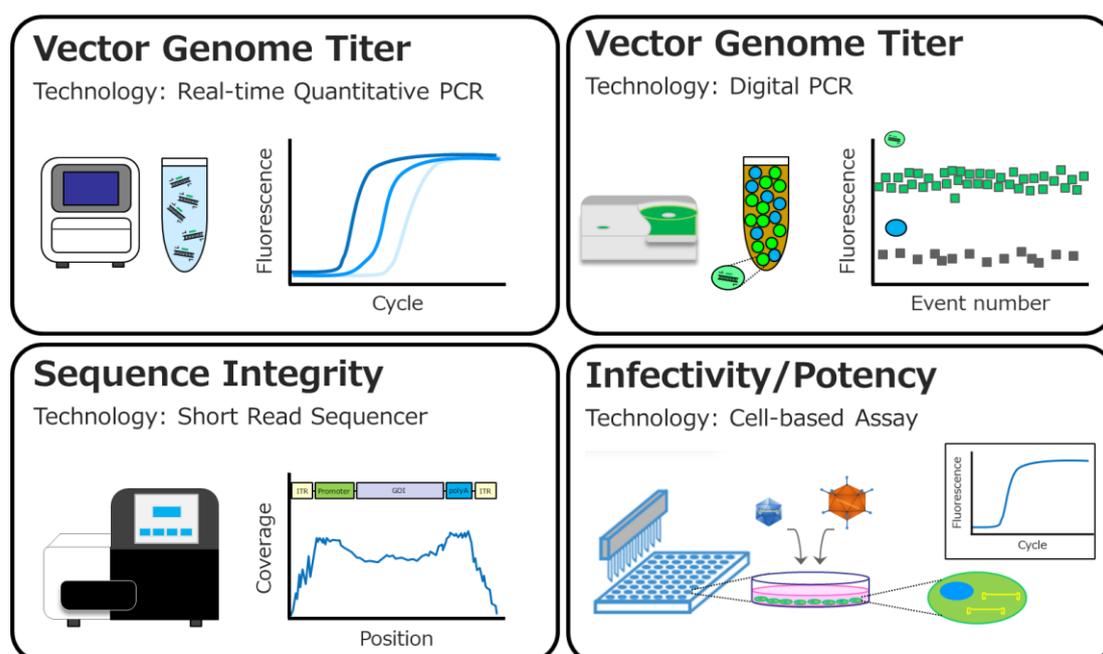


図 2.6. 核酸分析や細胞アッセイに利用される分析技術

VG タイターの定量試験法は複数存在 (表 2.1) し、過去には、AAV ベクターに含まれる DNA をドットプロットにより定量する方法や蛍光試薬により定量する方法が利用されたが、定量範囲、スループット性、精度、頑健性の問題により、リアルタイム定量 PCR (qPCR) が汎用されるようになった³。qPCR は、現在でも VG タイターの試験法として広く利用されるが、検量線が必要となる相対定量法である事に対して、近年、核酸の絶対定量が可能な分析法としてデジタル PCR が注目されており、下記の特徴を理由に VG タイターの品質試験法としても有用と考えられている。

- ① 絶対定量法であるため検量線不要 ⇒測定誤差の減少、標準品が不要
- ② 共存する阻害成分の影響が小さい ⇒工程内試験等でサンプルの前処理の簡略化
- ③ 微小なコピー数の差が検出可能 ⇒定量法として精度が高い

デジタル PCR の原理は、微小空間に核酸を 1 分子レベルで分画した後、PCR を行い核酸を増幅させ、蛍光検出により核酸を含む微小空間の数を定量する^{15,16}。核酸を含むか含まないか、即ち 0 か 1 かで判断するためデジタル PCR と呼ばれるが、実際には核酸を複数含む微小空間も確率的に存在するため、ポアソン分布に当てはめ解析し核酸の定量がなされる。微小空間に何を利用するかは分析装置を製造する企業によって異なるが、オイル中の水滴 (ドロップレット) を利用するドロップレットデジタル PCR (ddPCR、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社の製品) が、特に AAV ベクターの品質試験に利用される (図 2.7)。

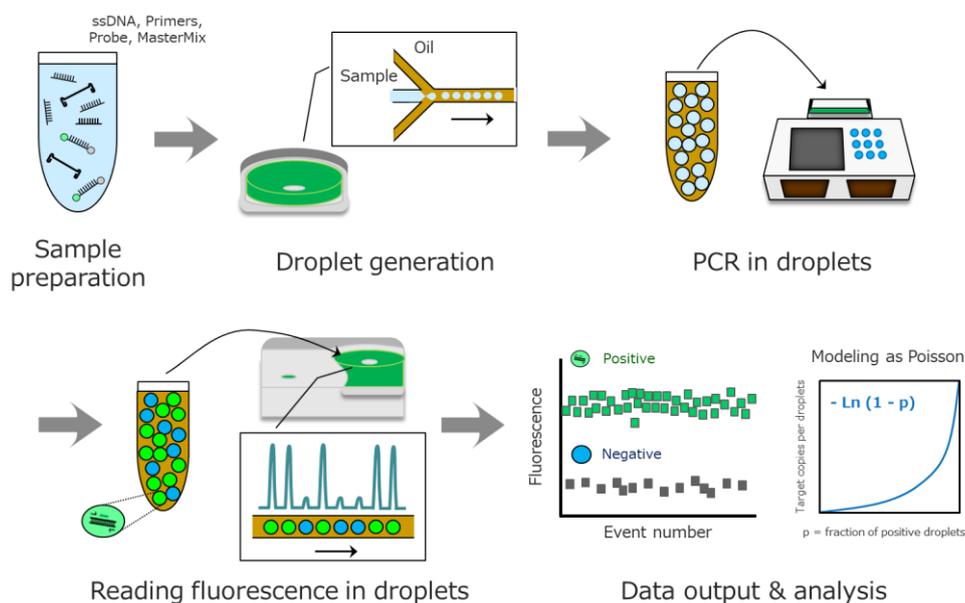


図 2.7. ddPCR の原理と手順¹⁵

品質試験法としては、qPCR の真度が 50%、精度 30%に対して、ddPCR は真度が 20%、精度 10%という報告例もあり、AAV ベクターのゲノムタイターの品質試験法として高い有用性が期待される¹⁷。

2.3 本研究の背景と目的

重要品質特性である VG タイターに対して、ddPCR は高精度な分析が可能となる技術として期待される。しかし、ddPCR が優れた技術であるとしても、品質試験として ddPCR を用いて VG タイターを適切に定量するためには、科学的妥当性に基づき適切な試験手順が設計されなければ、正しい VG タイターの定量結果を得る事はできない。特に、ddPCR を用いて VG タイターを定量するためには、AAV ベクターに対して前処理を行い、試験検体を調製する必要がある。試験検体の調製方法は VG タイターの定量結果にも影響を及ぼすため、品質試験法開発において重要な検討項目となる。近年では、国際的なガイドラインにおいても **Analytical Quality by Design** と呼ばれる科学的妥当性に基づいた品質試験法の開発が求められつつあり、試験検体の前処理工程と定量結果との関連について評価することは試験法開発において重要である¹⁸⁾。

本研究では、AAV ベクターのゲノムタイター定量に対して、品質試験法として適切な ddPCR の試験手順を設計することを目指し、試験検体の調製で実施される前処理の各パラメータが、VG タイターの定量結果に及ぼす影響について評価を行い、AAV ベクターの物理科学的特性値との関連性を見出した。さらに、従来、4 ステップ（1：DNase 処理によるカプシド外の DNA 除去、2：DNase 不活化、3：一本鎖 (ss) DNA のカプシドからの抽出、4：PCR）で実施される前処理工程に代わる方法として、より頑健性に優れた 3 ステップの前処理方法を、ddPCR を用いた VG タイター定量試験の検体前処理手順として提案した（図 2.8）。

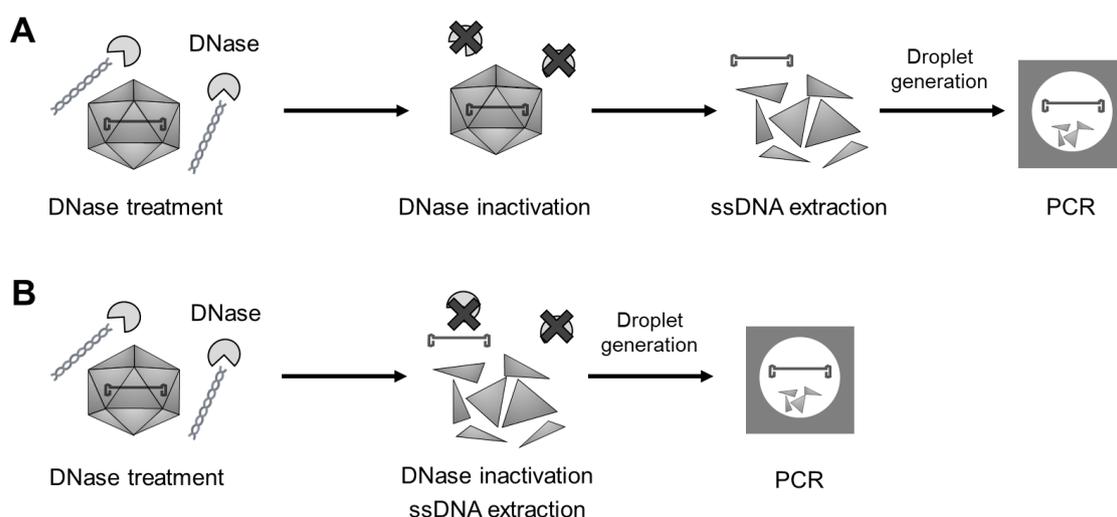


図 2.8. ddPCR を用いた AAV ベクターの VG タイター定量試験における 4 ステップ (A) および 3 ステップ (B) の検体前処理方法

2.4 DNase 処理パラメータの検証

2.4.1 実験方法

AAV ベクターの調製 (2.5.1、2.6.1、2.7.1 で共通)

全ての検討には共通の AAV ベクターを用いた。検討に用いた AAV1-CMV-ZsGreen 1 (rAAV1)、AAV2-CMV-ZsGreen 1 (rAAV2)、AAV5-CMV-ZsGreen 1 (rAAV5)、AAV6-CMV-ZsGreen 1 (rAAV6) は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合（東京）において、HEK293T 細胞に 3 種のプラスミド (pAAV-CMV-ZsGreen、血清型 1、2、5、6 の各パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミド) をトランスフェクションし、回収した AAV ベクターを AVB Sepharose™ High Performance as affinity chromatography (Cytiva) を用いて精製した。次世代バイオ医薬品製造技術研究組合で実施した qPCR によるゲノムコピー数の定量結果に基づき、ddPCR に用いる試験検体の調製を行う前に、各 rAAV ベクターの濃度を約 10^8 ゲノムコピー (GC) /mL まで希釈した。希釈液には、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) · Na₂ と、0.005% プルロニック F-68 (Thermo Fisher Scientific) 含む 10 mM トリス緩衝液 (プロメガ) を用いた。

ddPCR に用いたプライマーとプローブ (2.5.1、2.6.1、2.7.1 で共通)

AAV ベクターゲノムに含まれる CMV プロモーターを標的とした下記に示す配列のプライマーとプローブを、ユーロフィンジェノミクス（東京）で合成し、全ての ddPCR において VG タイターの定量に用いた。

- Forward: 5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'
- Reverse: 5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'
- Probe: FAM-ATTTCCAAGTCTCCACCC-BHQ1

ddPCR を用いたゲノムコピー数の定量 (2.5.1、2.6.1、2.7.1 で共通)

カプシドから抽出した rAAV ゲノムを含む検体 (1 μ L) に対して、ddPCR Supermix for Probe (No dUTP) (バイオ・ラッド)、各プライマー (最終濃度 900 nM)、プローブ (最終濃度 250 nM) および nuclease-free water (プロメガ) から成る 19 μ L の液を混合した。調製した混合液を、QX200 Droplet Generator (バイオ・ラッド) 装置を用いて、Droplet Generation Oil for Probes (バイオ・ラッド) と混合させ、ドロップレットを作製した。ドロップレットを含む液を 96 ウェルプレートに移し、アルミ箔でウェルを密閉後、C1000 Touch サーマルサイクラー (バイオ・ラッド) にセットし PCR を行った。

PCR の条件は、ddPCR Supermix for Probe (No dUTP) が推奨する条件に従い、95°C で 10 分間 (酵素活性化) 処理した後、94°C で 30 秒間と 60°C で 1 分間の熱処理サイクルを 40 サイクル行い、最後に 98°C で 10 分間 (酵素不活性化) の処理を行った。PCR を実施したドロップレットは、QX200 Droplet Reader (バイオ・ラッド) によりドロップレット毎に蛍光を定

量し、蛍光が検出されたドロップレットを計数した。得られた結果に対して、QuantaSoft ソフトウェア（バイオ・ラッド）を用いて解析（<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/literature/10031906.pdf>）した。装置から出力される DNA のコピー数は、サンプル 20 μ L あたりのコピー数となるため、前処理工程で希釈される倍率で積算し、AAV ベクター検体の VG タイターについて定量した (N=3)。

DNase 処理パラメータの検証

DNase 処理を行う熱処理温度が VG タイター定量値に及ぼす影響について評価した。rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の各検体を、等容量の 500 U/mL のリコンビナント DNase I（タカラバイオ。20 mM Tris-HCl、4 mM MgCl₂、2.5 mM dithiothreitol を含む、pH 7.5）と混合後、T100 Touch サーマルサイクラーを用いて、30、35、37、39、41、46°C でそれぞれ 30 分間加温した。熱処理後、各サンプルに 4 倍容量の 10 mM Ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA、タカラバイオ）を含む 10 mM Tris 緩衝液（pH 8.0）を添加し、95°C で 10 分間加温した。本熱処理によりカプシドから ssDNA が抽出されるため、0.05% のプルロニック F-68 を含む TE バッファー（ナカライテスク）を用いて、各サンプルを ddPCR による定量に適した濃度（約 10⁶ GC/mL）まで希釈した。希釈したサンプルに対して、前述の手順に従い、ドロップレット作製、PCR、蛍光検出、解析を行い、rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 検体の VG タイターを定量した。

同様に、DNase 濃度が VG タイター定量値に及ぼす影響について評価した。DNase 処理を行う温度を 37°C に固定し、DNase の濃度を 250、500、1000 U/mL、処理時間をそれぞれ 15、30、60 分として、上記と同じ手順で rAAV1 検体の VG タイターを定量した。

2.4.2 結果、考察

図 2.8 に示した ddPCR に用いる AAV ベクターの検体前処理において、DNase 処理が最初のステップとなる。本処理は、製造された製品および保存安定性試験中の検体に対して、カプシドの外部に存在する核酸を除去するために実施される。本処理温度については、慣例的に 37°C で実施されることがほとんどであるが、本研究では VG タイター定量値への影響を評価するため、30°C から 46°C の範囲で DNase 処理を行った（図 2.9A）。

rAAV5 において 41°C 以上でゲノムコピー数の低減が認められたものの、全体的に 30°C から 46°C の範囲において、DNase の処理温度が VG タイター定量値に及ぼす影響は小さいことが示唆された。さらに、DNase 濃度を 1000 U/mL、37°C での処理時間を 60 分まで増大しても rAAV1 の VG タイター定量値の低減は認められなかった（図 2.9B）。汎用される DNase 試薬の推奨使用温度（本実験で用いたリコンビナント DNase I で 37°C）、実施手順の単純さ、サーマルサイクラーの温度精度仕様（本実験で用いた T100 Touch サーマルサイクラーで $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ）を考慮すると、AAV ベクターの検体前処理において DNase 処理パラメータが VG タイターの定量結果に影響を及ぼすリスクは小さいと考えられた。

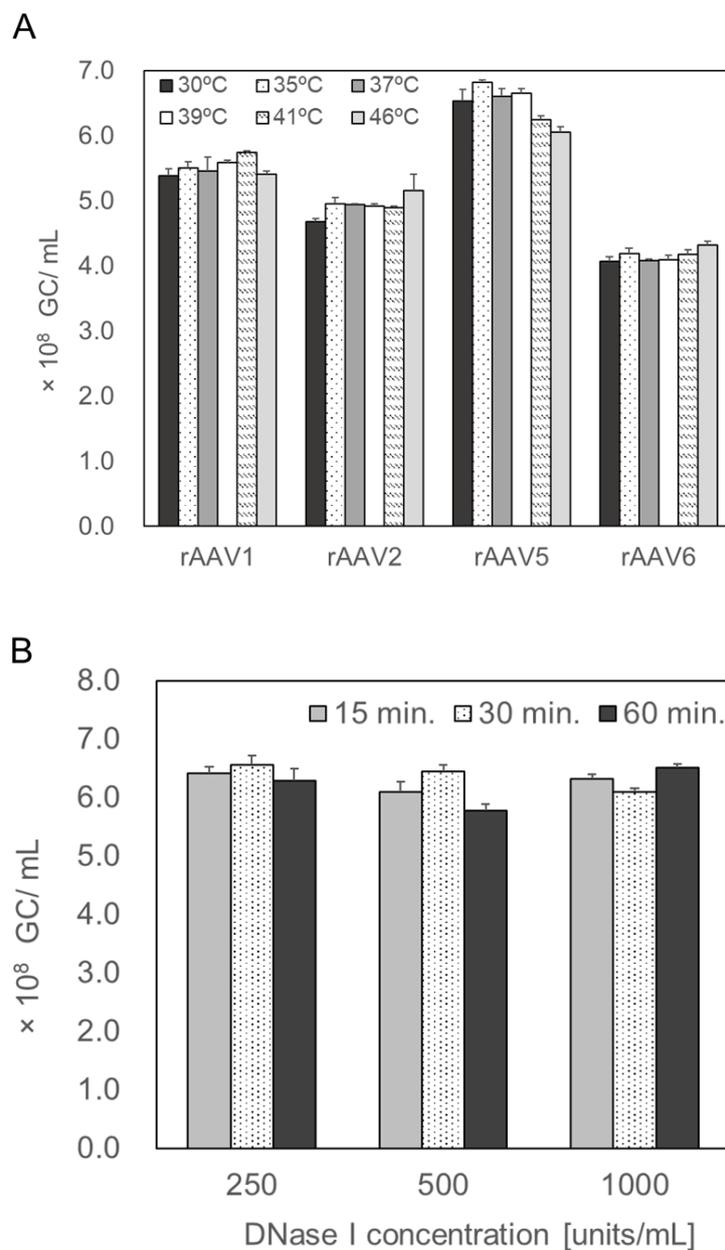


図 2.9. DNase 処理ステップにおける処理温度 (A) および DNase 濃度 (B) が ddPCR による VG タイター定量値に及ぼす影響

2.5 DNase 不活化パラメータの検証

2.5.1 実験方法

DNase 不活化パラメータの検証

DNase 不活化を行う熱処理温度が VG タイター定量値に及ぼす影響について評価した。rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の各検体を、等容量の 500 U/mL のリコンビナント DNase

I と混合後、T100 Touch サーマルサイクラーを用いて 37°C でそれぞれ 30 分間加温した。熱処理後、各サンプルに 4 倍容量の 10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) を添加し、50、55、60、65°C で 30 分間加温および 4°C で保管した。rAAV1 については、同様の操作を 10 mM EDTA を含む 10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) を代わりに添加し実施した。最後に、95°C で 10 分間加温し、カプシドから ssDNA を抽出後、0.05% のプルロニック F-68 を含む TE バッファーを用いて、各サンプルを ddPCR による定量に適した濃度 (約 10^6 GC/mL) まで希釈した。希釈したサンプルに対して、前述の手順に従い、ドロップレット作製、PCR、蛍光検出、解析を行い、rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 検体の VG タイターを定量した。

同様に、不活性化工程で利用される Proteinase K (Merck) が VG タイター定量値に及ぼす影響について評価した。前述と同様の手順で rAAV1 に対して前処理を行い、DNase 処理後に加える試薬を Tris 緩衝液ではなく 0.5 mg/mL の Proteinase K を加え、55、65°C でそれぞれ 30 分間加温した後、ssDNA を抽出し、rAAV1 検体の VG タイターを定量した (N=3)。統計解析 (Student t-test) はソフトウェア JMP17 を用いて行った。

2.5.2 結果、考察

DNase 処理後は、カプシドから抽出した ssDNA が分解されないよう DNase の不活性化工程が必要となる。表 2.2 に各機関で実施される AAV ベクターのゲノムタイター前処理の条件を示す。特に、DNase 不活性化ステップは実施機関によって条件が様々であった。

表 2.2. 代表的な AAV ベクターのゲノムタイター前処理条件

Method (Author)		Furuta	Lock	Dobnik	D'Costa
DNase 処理	DNase I	250 U/mL	400 U/mL	2~10 U	100 U/mL
	反応条件	37°C x 30分	37°C x 30分	37°C x 30分	37°C x 60分
DNase 不活化	不活化試薬	20 mM EDTA	Pr K	0.2 mg/mL Pr K 0.5M EDTA	12 ug Pr K, 5mM EDTA
	不活化条件	56°C x 10分 +Lysis buffer	55°C x 30分	55°C x 60分	55°C x 30分
ssDNA 抽出	抽出条件	95°C x 10分	95°C x 10分	95°C x 15分	95°C x 10分

Method (Author)		Wang	Werling	Suoranta	Zanker
DNase 処理	DNase I	10000 U/mL	50 U	No information	10 U
	反応条件	37°C x 30分	37°C x 60分	No information	37°C x 30分
DNase 不活化	不活化試薬	—	—	0.4U of PrK	50mM EDTA
	不活化条件	90°C x 10分	65°C x 10分	50°C x 60分	65°C x 60分
ssDNA 抽出	抽出条件	50°C x 60分 95°C x 10分 +1 mg/mL Pr K	50°C x 60分 95°C x 20分 +0.4 U Pr K	90°C x 10分	—

PrK: Proteinase K、各 Method に記載される条件の引用元: Furuta¹⁹、Lock²⁰、Dobnik²¹、D'Costa²²、Wang²³、Werling²⁴、Suoranta²⁵、Zanker²⁶

DNaseの不活化は55、65°Cで熱処理されることが多いため、50°Cから65°Cの範囲でDNase不活化処理がVGタイター定量値へ及ぼす影響について評価した(図2.10)。rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6のいずれにおいても、55°Cから65°CにかけてVGタイター定量値が漸次的に減少することが確認された。DNaseの効果を止めるEDTAを付加することで定量値の減少が抑えられたことから(図2.10A)、不活化処理中にカプシドから漏出したssDNAが不活化されていないDNaseによって分解され、VGタイター定量値が減少したと考察された。

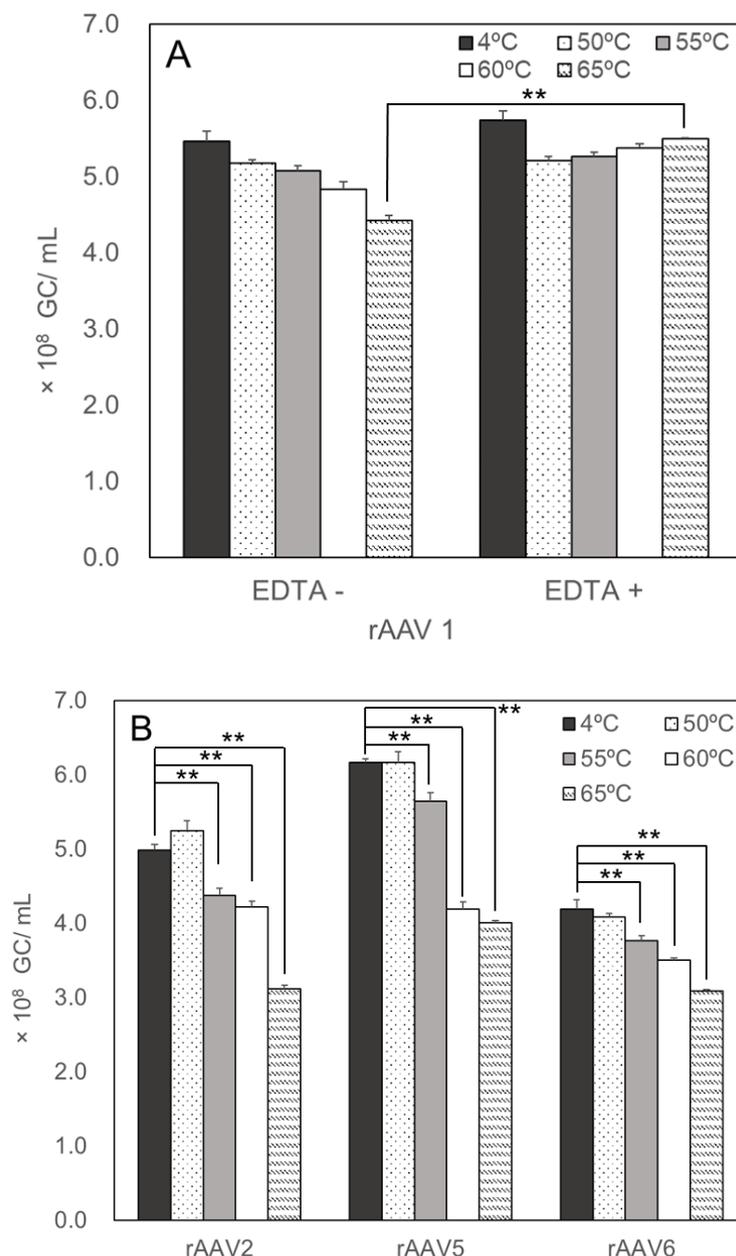


図 2.10. rAAV1 (A、EDTA の添加無 (-) と有 (+)) および rAAV2、rAAV 5、rAAV 6 (B、EDTA の添加無) の前処理における、DNase 不活化ステップの熱処理温度が VG タイター定量値に及ぼす影響 (p 値 **: < 0.01)

さらに表 2.2 にもある通り、DNase の不活化工程では試薬として Proteinase K が添加されることも多いため、Proteinase K の添加が rAAV1 の VG タイター定量値へ及ぼす影響について評価した (図 2.11)。

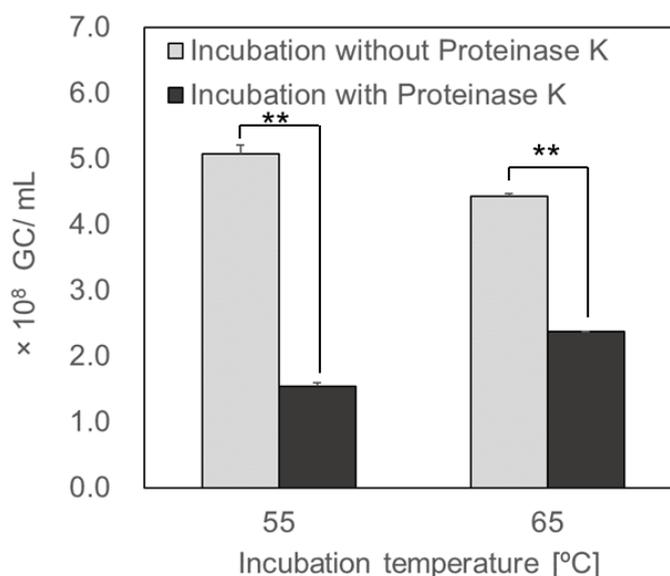


図 2.11. DNase 不活化ステップにおいて添加する Proteinase K が rAAV1 の VG タイター定量値に及ぼす影響 (p 値 **: < 0.01)

AAV ベクターの検体前処理において、Proteinase K は DNase だけでなくカプシドの消化にも利用されることから、カプシドから ssDNA がより漏出し、不活化されていない DNase によって ssDNA の分解が進み、VG タイター定量値が減少したと考察された。Dobnik²¹ や D'Costa²² の方法のように EDTA も添加することにより分解を抑制する工夫も可能ではあるが、品質試験法としては試験実施者間のバラつきを軽減するために作業手順はより単純である方が望ましい。高濃度の Proteinase K が PCR を阻害することも認められた (本論文への記載無し) ため、不活化ステップでは漏出した ssDNA の分解を防ぐ目的で EDTA のみの添加が望ましいと考えられた。

2.6 AAV ベクターの熱安定性の評価

2.6.1 実験方法

ddPCR を用いた AAV ベクターの熱安定性評価

2.5 で得られた結果を考察するため rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の熱安定性について評価した。AAV ベクター 4 μL をそれぞれ 40、45、50、55、60、65、70、75°C で 30 分間加温および 4°C で保管後、2 μL の 250 U/mL のリコンビナント DNase I を添加し、37°C で 30 分間加温することでカプシドから漏出した ssDNA を分解した。さらに、40 mM の EDTA 溶液を 4 μL 加え、55°C で 30 分間、ヌクレアーゼフリー水を 10 μL 加えさらに 95°C で 15 分間加

熱を行い、DNase 不活化と ssDNA 抽出ステップを実施し、0.05%のプルロニック F-68 を含む TE バッファーで希釈した後、ddPCR による ssDNA のコピー数を定量した。ssDNA 抽出後の ddPCR のサンプル調製は、前述の手順と同じである。4°Cで 30 分間加温した場合の定量値 ($GC_{4^{\circ}C}$) を 100%として、各温度 T で加熱した場合の定量値 (GC_T) を用いて ssDNA のカプシド内保持率 $X = (GC_T / GC_{4^{\circ}C}) \times 100$ を算出した (N=3)。

さらに、rAAV1 に対しては、45、55、65°Cそれぞれで 10、20、30、40 分間加温および 4°Cで保管した後、前述と同様の手順で、DNase 処理、DNase 不活化、ssDNA 抽出、ddPCR を行い、ゲノムコピー数の推移について評価した (N=3)。

Differential Scanning Fluorimetry (DSF) を用いた AAV ベクターの熱安定性評価

タンパク質の熱力学特性を評価する分析技術として利用される DSF を用いて各 AAV ベクターの安定性を評価した。約 10^{12} GC/mL に調製した rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 を分析用セルに注入し、Uncle platform (Unchained Laboratories) を用いて蛍光スペクトルの経時変化を測定した。測定温度範囲は 15°Cから 95°Cとし、加温速度は 1°C/min とした。

DSF を用いて 2 種類の熱安定性に関する特性値を評価した。(1) タンパク質の Melting Temperature (T_m 、変性中点温度) は、266 nm の励起レーザーを用いて、アンフォールディングに伴うタンパク質の自家蛍光 (トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン由来) の変化を計測した。300 nm から 430 nm の蛍光スペクトルの重心となる波長のシフトをモニタリングし、その変曲点となる T_m 値を測定した (N=3)。(2) カプシドから DNA が漏出する温度 (本研究では Tr: Temperature for ssDNA release と表記) は、473 nm の励起レーザーを用いて測定を行った。各検体に 500 倍希釈濃度になるよう SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific) を添加し、漏出した ssDNA と結合した SYBR Gold 由来の蛍光を検出する。500 nm から 650 nm の蛍光スペクトルの面積変化をモニタリングし、その変曲点となる Tr 値を測定した (N=3)。

2.6.2 結果、考察

40°Cから 75°Cの範囲で 30 分間加温後にカプシドに含まれる ssDNA のゲノムコピー数および ssDNA のカプシド内保持率を図 2.12 (A - D: rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 のゲノムコピー数の個別定量結果) に示した。いずれの血清型においても 55°Cから 60°Cにかけて著しい ssDNA 保持率の減少が認められた。

さらに、rAAV1 を 45°C、55°C、65°Cで加温した時に、カプシド内保持される ssDNA の経時変化について図 2.13 に示す。45°Cと 55°Cに比べて、65°Cで加温した場合に大幅なコピー数の減少が認められ、図 2.12 と同様の傾向が示された。コピー数は加温 10 分の時点で大きく減少しており、10 分以降も 55°Cと 65°Cにおいては減少が認められるが、減少幅は小さかった。つまり、55°Cを越える温度において、ssDNA は非常に速やかに漏出することが示唆された。AAV は、一定の温度を越えると、カプシドの構造を維持しながら粒子表面か

ら ssDNA を放出することが報告²⁷されており、検体前処理の工程においても、同様に放出された ssDNA が DNase によって分解されたと考察された。

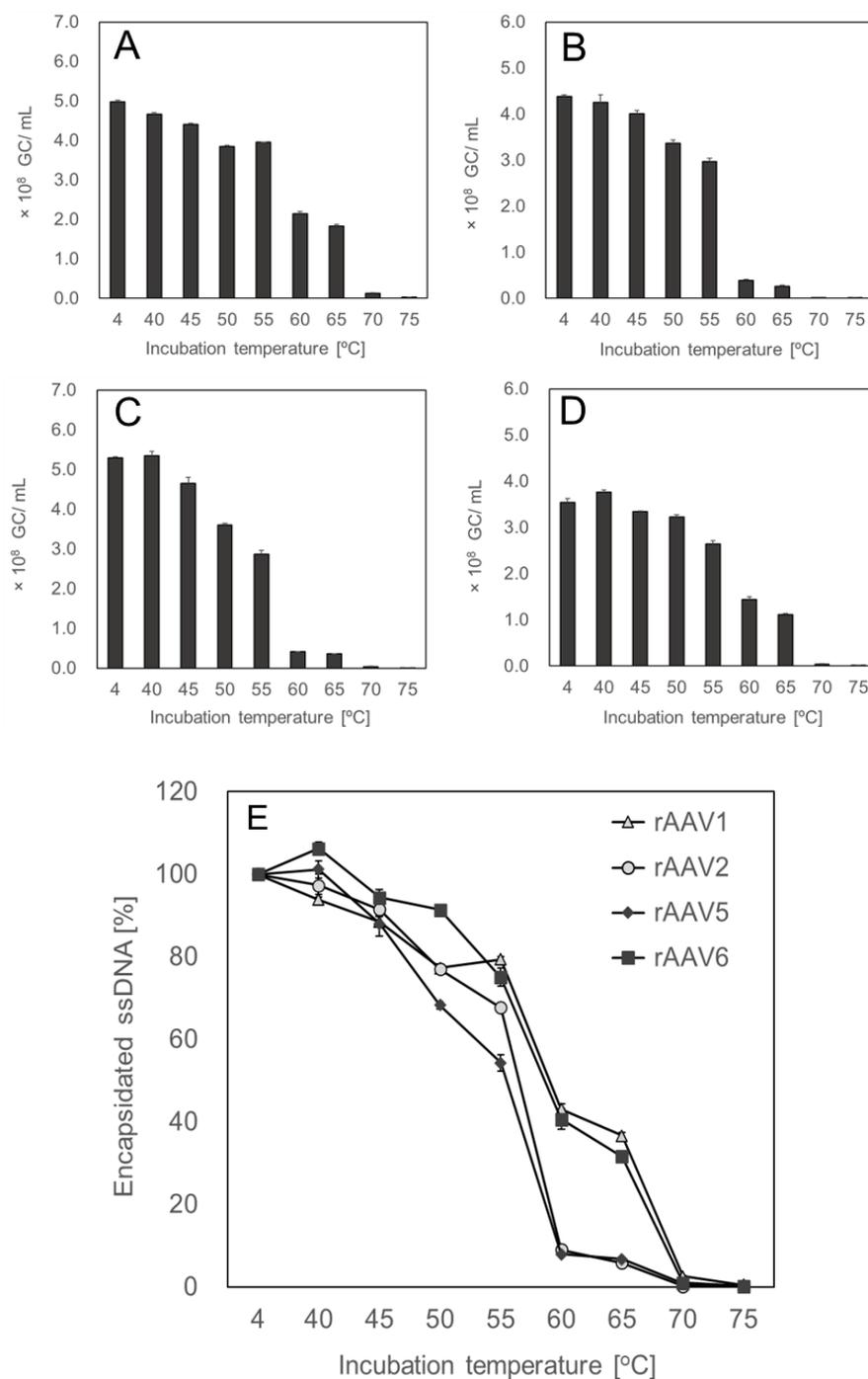


図 2.12. 加温温度による rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 のカプシド内に保持される ssDNA のゲノムコピー数の変化 (A-D) と加温温度によるカプシド内への ssDNA 保持率の推移 (E)

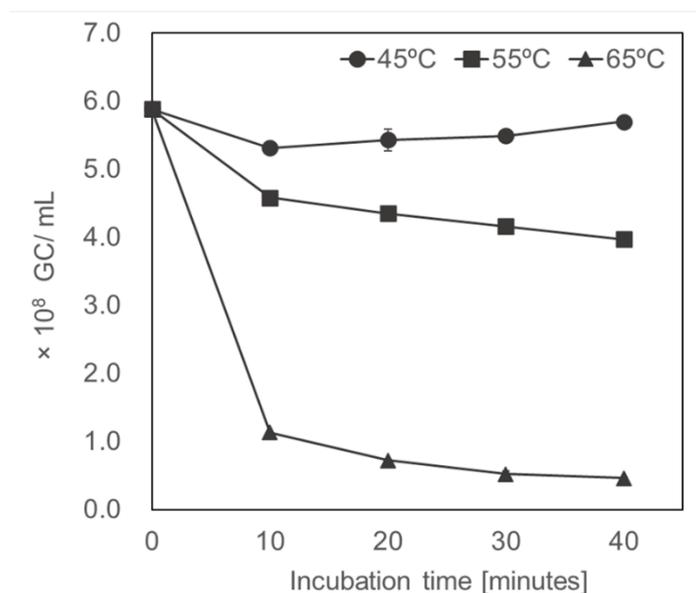


図 2.13. 加温温度および加温時間が rAAV1 への ssDNA のカプシド内保持率に及ぼす影響の評価

ddPCR で得られた結果を考察するため、rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の熱力学的特性値 T_m と T_r の測定を行った (表 2.3)。

表 2.3. rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の T_m と T_r

Serotype	T_m		T_r	
	Average [°C]	RSD %	Average [°C]	RSD %
rAAV1	86.57	0.07	55.01	0.07
rAAV2	73.38	0.12	56.02	1.73
rAAV5	91.67	0.16	55.76	0.45
rAAV6	80.90	0.61	55.05	0.40

RSD: Relative Standard Deviation

T_m はタンパク質の熱安定性の指標として汎用される特性値であり、本結果も報告される血清型 1、2、5、6 の T_m と近い値を示した²⁸。しかしながら、ssDNA は T_m よりかなり低い温度でカプシドから放出されており、本研究で用いた rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 はいずれも T_r が 55°C 付近であった。この特性値は、ddPCR で定量した ssDNA のカプシド内保持率の低減 (図 2.12) や DNase 不活化ステップで加温により VG タイター定量値が大きく減少した温度 (図 2.10) と一致しており、 T_r が ddPCR の検体前処理工程において把握すべき重要な特性値であることが示唆された。

2.7 カプシド粒子からの DNA 抽出パラメータの検証

2.7.1 実験方法

ssDNA 抽出パラメータの検証

2.5、2.6 で得られた結果から、検体前処理において AAV ベクターを 55°C から 65°C の温度環境に置くと ssDNA が漏出し DNase により分解されるリスクが高まることから、DNase の不活化と ssDNA の抽出を高温で同時に行う方法 (図 2.8B) を検討した。

rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の各検体を、等容量の 500 U/mL のリコンビナント DNase I と混合後、T100 Touch サーマルサイクラーを用いて 37°C でそれぞれ 30 分間加温した。熱処理後、各サンプルに 4 倍容量の 10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) を添加し、75、85、95°C でそれぞれ 5、10、20 分間加温した。抽出された ssDNA を、0.05% のプルロニック F-68 を含む TE バッファーを用いて ddPCR による定量に適した濃度 (約 10^6 GC/mL) まで希釈した後、希釈したサンプルに対して、前述の手順に従い、ドロップレット作製、PCR、蛍光検出、解析を行い、rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 検体の VG タイターを定量した (N=3)。最後に、rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 の各検体を、95°C でそれぞれ 10、30、45、60 分間加温した時のゲノムコピー数の変化について、同様の手順で評価した。さらに、rAAV1 に対しては、ssDNA の抽出のため、25°C から 95°C まで昇温する温度速度の影響について、0.1、0.2、0.5、1°C/second のそれぞれの温度速度で評価した。95°C に到達した後の加温時間は 10 分とし、ddPCR にて VG タイターを定量した (N=3)。統計解析 (Student t-test) はソフトウェア JMP17 を用いて行った。

2.7.2 結果、考察

DNase 処理後の rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6 検体に対して、DNase 不活化と ssDNA の抽出を同時に実施する方法について、処理温度と加温時間が VG タイター定量値に及ぼす影響を評価した (図 2.14)。2.5 で検討した DNase 不活化ステップと比べて、いずれの処理温度と血清型においても、VG タイター定量値について大きな低減は認められなかった。また、各血清型の T_m 付近の温度以上で加温することで、より高い VG タイター定量値が得られる傾向が示された。 T_m より高温で処理することで ssDNA がより抽出されたと考察されるが、その影響は軽微と考えられた。

さらに、5 分から 20 分の範囲では、加温時間を延ばしたことによる VG タイター定量値の大きな変化は、いずれの処理温度においても認められなかった。一方、95°C においては 30 分より長く加温を行うに連れて、VG タイター定量値が減少する傾向が示された (図 2.15)。DNase 不活化ステップと比べて影響は軽微ではあるが、過度な高温処理は、抽出された ssDNA の分解や ssDNA と変性したカプシドとの凝集に繋がる可能性があり、VG タイター定量値の低減に繋がったと考察された。また、昇温速度によって検体が高温に曝される時間も変動するため、95°C までの昇温時間の影響を評価したが VG タイター定量値への影響は認められなかった (図 2.16)。

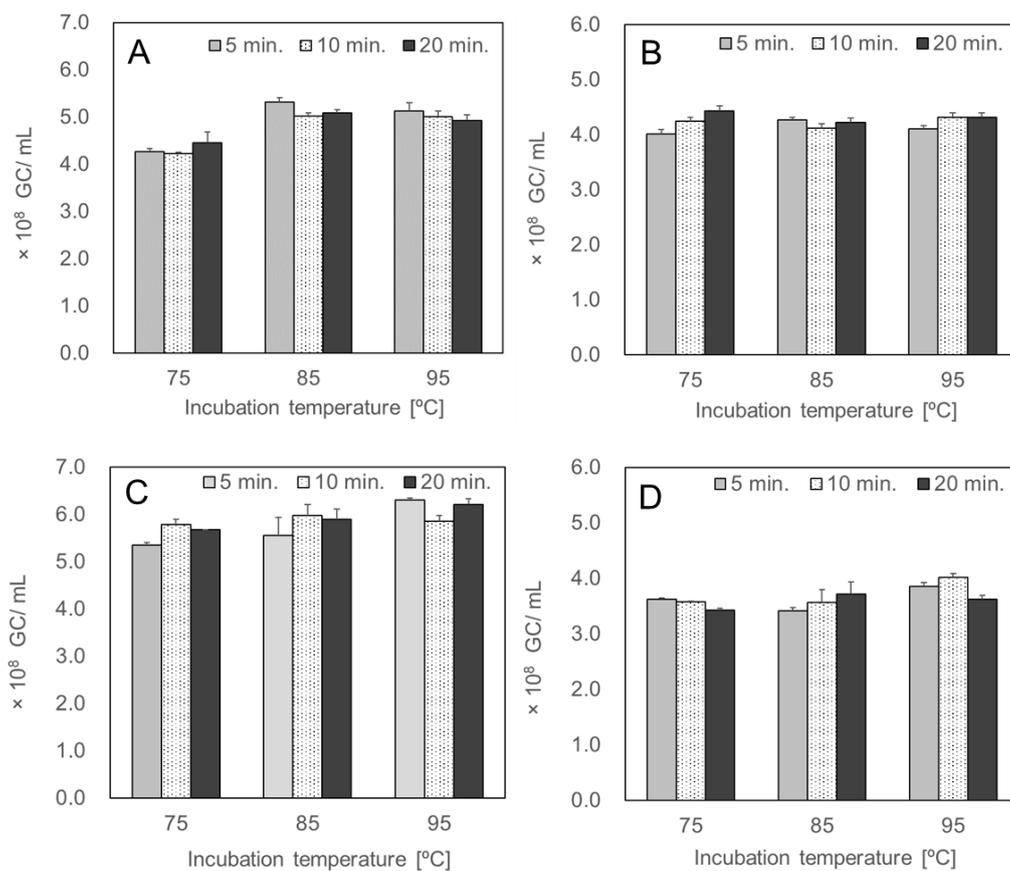


図 2.14. rAAV1 (A)、rAAV2 (B)、rAAV5 (C)、rAAV6 (D) の前処理における、ssDNA 抽出温度と加温時間が VG タイター定量値に及ぼす影響の評価

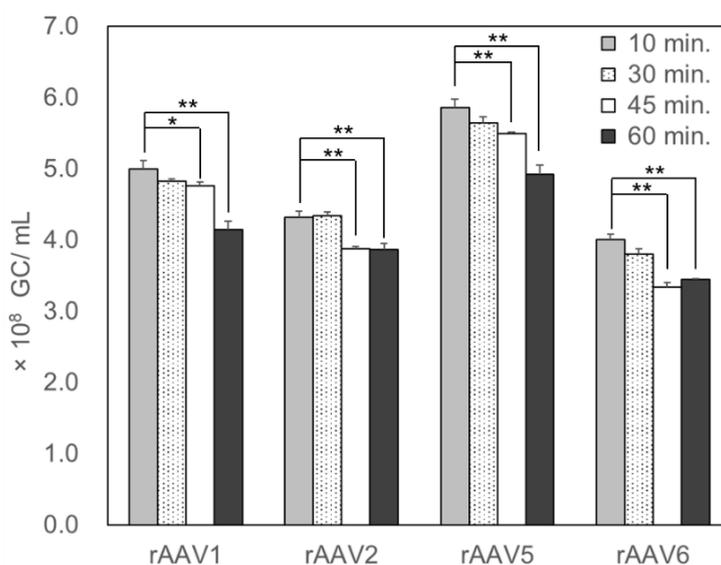


図 2.15. 95°Cの加温時間が VG タイター定量値に及ぼす影響の評価 (p 値 **: < 0.01、p 値 *: < 0.05)

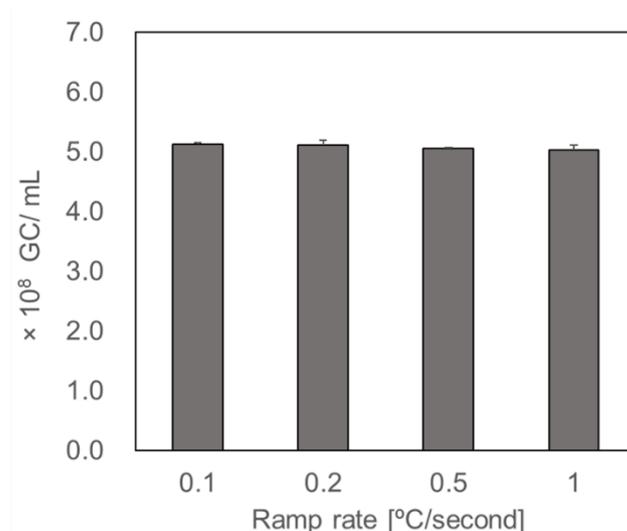


図 2. 16. 95°Cまでの昇温速度が rAAV1 の VG タイター定量値に及ぼす影響の評価

以上の結果から、DNase 不活化と ssDNA 抽出ステップは、高温まで速やかに加温することで、DNase による ssDNA の分解を避けられ、同時に両ステップを実施することが可能であると示された。処理温度や加温時間が VG タイター定量値に及ぼす影響はあるものの影響は軽微であり、95°Cで 10 分程度の短時間の処理で、ssDNA は十分に抽出されることが示された。従来の DNase 不活化と ssDNA 抽出を個別で実施する 4 ステップから成る前処理方法に比べて、本研究で考案した 3 ステップの前処理方法は手順が単純化されるため、より頑健性が高い試験方法として期待された。

2.8 本章まとめ

本章では、遺伝子治療に利用する AAV ベクターの品質特性、品質試験法、分析技術について紹介し、VG タイターの定量方法として有用性が期待される ddPCR について品質試験法を開発することを目的とした。重要品質特性である VG タイターに対して、ddPCR を品質試験法として活用するため、検体の前処理において、各ステップの処理パラメータが VG タイター定量値に及ぼす影響について評価した。結果、DNase 不活化ステップにおいて 55°C から 65°C 付近の環境に AAV ベクターが曝されることにより、漏出した ssDNA が不活化されていない DNase によって分解され、ddPCR による VG タイター定量値が低減することが示された。

さらに、DSF から得られた Tr と近い温度で、VG タイター定量値が大きく低減することが認められた。Tr は、カプシドに内包される ssDNA の長さ²⁷、製剤処方²⁹、AAV ベクターの製造方法³⁰によって変化することが報告されている。科学的妥当性およびリスクに基づく手法によって品質試験法を開発するためには、開発を進める AAV ベクター製品毎に特性値として Tr を把握することが重要であると考えられた。

本研究で実施した一連の実験の結果、「(1) 1 ユニットの DNase を検体に加え 37°Cで 30 分間処理、(2) 4 倍量の 10 mM EDTA を含む 10 mM トリス緩衝液を加え 95°Cで 10 分間処理、(3) 0.05%プルロニック F-68 で ddPCR による定量に適した濃度まで希釈したサンプルを用いてドロップレットを作製し PCR を実施」の 3 ステップからなる検体前処理方法を、より手順が単純で頑健性が高い、ddPCR を用いた AAV ベクターの VG タイターの品質試験法手順として提案した。本試験手順を VG タイターの遺伝子治療用製品の標準試験法とするためには、他機関の提唱する方法と真度、併行精度、室内再現精度、質間再現精度、頑健性を比較する必要があるが、ddPCR は qPCR と比べて高い真度、精度、頑健性を有する分析技術¹⁷であり、より手順を単純化した本試験法は精度および頑健性の向上に繋がるため、標準化を目指せる試験方法であると考えられた。

尚、本章に記載した研究内容は、AMED の課題番号 JP20ae0201002（課題名：遺伝子・細胞治療用ベクターのプラットフォーム製造技術開発）の支援を受けた。

参考文献

1. Gimpel, A.L., Katsikis, G., Sha, S., Maloney, A.J., Hong, M.S., Nguyen, T.N.T., Wolfrum, J., Springs, S.L., Sinskey, A.J., Manalis, S.R., et al. (2021). Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 20, 740–754.
2. Green, E.A., and Lee, K.H. (2021). Analytical methods to characterize recombinant adeno-associated virus vectors and the benefit of standardization and reference materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 71, 65–76.
3. Dorange, F., and Le Bec, C. (2018). Analytical approaches to characterize AAV vector production & purification: Advances and challenges. *Cell Gene Ther. Insights* 4, 119–129.
4. Lecomte, E., Tournaire, B., Cogné, B., Dupont, J.B., Lindenbaum, P., Martin-Fontaine, M., Broucque, F., Robin, C., Hebben, M., Merten, O.W., et al. (2015). Advanced characterization of DNA molecules in rAAV vector preparations by single-stranded virus next-generation sequencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 4, e260.
5. Penaud-Budloo, M., Lecomte, E., Guy-Duché, A., Saleun, S., Roulet, A., Lopez-Roques, C., Tournaire, B., Cogné, B., Léger, A., Blouin, V., et al. (2017). Accurate Identification and Quantification of DNA Species by Next-Generation Sequencing in Adeno-Associated Viral Vectors Produced in Insect Cells. *Hum. Gene Ther. Methods* 28, 148–161.
6. Oyama, H., Ishii, K., Maruno, T., Torisu, T., and Uchiyama, S. (2021). Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins with Two Types of VP3-Related Components by Capillary Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Hum. Gene Ther.* 32, 1403–1416.
7. Toole, E.N., Dufresne, C., Ray, S., Schwann, A., Cook, K., and Ivanov, A.R. (2021). Rapid

- Highly-Efficient Digestion and Peptide Mapping of Adeno-Associated Viruses. *Anal. Chem.* *93*, 10403–10410.
8. Cole, L., Fernandes, D., Hussain, M.T., Kaszuba, M., Stenson, J., and Markova, N. (2021). Characterization of recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) for gene therapy using orthogonal techniques. *Pharmaceutics* *13*.
 9. Roesch, A., Zöls, S., Stadler, D., Helbig, C., Wuchner, K., Kersten, G., Hawe, A., Jiskoot, W., and Menzen, T. (2022). Particles in Biopharmaceutical Formulations, Part 2: An Update on Analytical Techniques and Applications for Therapeutic Proteins, Viruses, Vaccines and Cells. *J. Pharm. Sci.* *111*, 933–950.
 10. Cashen, P., and Manser, B. (2021). Quality by Design (QbD) for Adeno-Associated Virus (AAV): A Framework for a QbD Assessment for AAV Products Within the Chemistry Manufacturing and Controls (CMC) Documentation. Pall Corp., 1–33.
 11. Maruno, T., Usami, K., Ishii, K., Torisu, T., and Uchiyama, S. (2021). Comprehensive Size Distribution and Composition Analysis of Adeno-Associated Virus Vector by Multiwavelength Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *J. Pharm. Sci.* *110*, 3375–3384.
 12. Li, Y., Struwe, W.B., and Kukura, P. (2020). Single molecule mass photometry of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* *48*, E97.
 13. Di Wu, Philsang Hwang, Tiansen Li, G.P. (2022). Rapid characterization of adeno-associated virus (AAV) gene therapy vectors by mass photometry. *Gene Ther.* *29*, 691–697.
 14. Khatwani, S.L., Pavlova, A., and Pirot, Z. (2021). Anion-exchange HPLC assay for separation and quantification of empty and full capsids in multiple adeno-associated virus serotypes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* *21*, 548–558.
 15. Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S., and Emslie, K.R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* *84*, 1003–1011.
 16. Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* *83*, 8604–8610.
 17. Li, Z., Wu, Z., Maekawa, T., Cheung, W. Den, Webber, K., Zhi, L., Brian, O., Howie, B., Zhang, C., Marshall, T., et al. Analytical Technology Used in the Latest Development of Gene Therapy Candidates. *5*, 537–547.
 18. ICH (2021). International Council for Harmonisation Guideline: ANALYTICAL PROCEDURE DEVELOPMENTQ14. ICH Guid. *1*, 1–29.
 19. Furuta-Hanawa, B., Yamaguchi, T., and Uchida, E. (2019). Two-Dimensional Droplet Digital PCR as a Tool for Titration and Integrity Evaluation of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum. Gene Ther. Methods* *30*, 127–136.

20. Lock, M., Alvira, M.R., Chen, S.J., and Wilson, J.M. (2014). Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Hum. Gene Ther. Methods* 25, 115–125.
21. Dobnik, D., Kogovšek, P., Jakomin, T., Košir, N., Žnidarič, M.T., Leskovec, M., Kaminsky, S.M., Mostrom, J., Lee, H., and Ravnikar, M. (2019). Accurate quantification and characterization of adeno-associated viral vectors. *Front. Microbiol.* 10.
22. D’Costa, S., Blouin, V., Broucque, F., Penaud-Budloo, M., Fçranois, A., Perez, I.C., Le Bec, C., Moullier, P., Snyder, R.O., and Ayuso, E. (2016). Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 3, 16019.
23. Wang, Y., Menon, N., Shen, S., Feschenko, M., and Bergelson, S. (2020). A qPCR Method for AAV Genome Titer with ddPCR-Level of Accuracy and Precision. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 19, 341–346.
24. Werling, N.J., Satkunanathan, S., Thorpe, R., and Zhao, Y. (2015). Systematic Comparison and Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for the Quantitation of Adeno-Associated Viral Products. *Hum. Gene Ther. Methods* 26, 82–92.
25. Suoranta, T., Laham-Karam, N., and Ylä-Herttuala, S. (2021). Optimized Protocol for Accurate Titration of Adeno-Associated Virus Vectors. *Hum. Gene Ther.* 32, 1270–1279.
26. Zanker, J., Lázaro-Petri, S., Hüser, D., Heilbronn, R., and Savy, A. (2022). Insight and Development of Advanced Recombinant Adeno-Associated Virus Analysis Tools Exploiting Single-Particle Quantification by Multidimensional Droplet Digital PCR. *Hum. Gene Ther.* 00.
27. Horowitz, E.D., Rahman, K.S., Bower, B.D., Dismuke, D.J., Falvo, M.R., Griffith, J.D., Harvey, S.C., and Asokan, A. (2013). Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Uncoating and Genome Release. *J. Virol.* 87, 2994–3002.
28. Bennett, A., Patel, S., Mietzsch, M., Jose, A., Lins-Austin, B., Yu, J.C., Bothner, B., McKenna, R., and Agbandje-McKenna, M. (2017). Thermal Stability as a Determinant of AAV Serotype Identity. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 6, 171–182.
29. Srivastava, A., Mallela, K.M.G., Deorkar, N., and Brophy, G. (2021). Manufacturing Challenges and Rational Formulation Development for AAV viral vectors. *J. Pharm. Sci.*
30. Bee, J.S., O’Berry, K., Zhang, Y. (Zoe), Phillippi, M.K., Kaushal, A., DePaz, R.A., and Marshall, T. (2021). Quantitation of Trace Levels of DNA Released from Disrupted Adeno-Associated Virus Gene Therapy Vectors. *J. Pharm. Sci.* 110, 3183–3187.

第3章

AAVベクターの製造に 用いる統合型プラスミド の開発

3.1 AAV ベクターの製造プロセス

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの製造方法は、アデノウイルスやヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスを用いる方法やバキュロウイルスを用いる方法があるが、現在主流となっている製造方法は、3種類のプラスミド DNA を HEK293 等の宿主細胞にトランスフェクションするトリプルトランスフェクション法 (以降 TTF と表記) である。プラスミド DNA に搭載される複数の遺伝子が機能し、一過性発現により細胞から産生された AAV ベクターを回収・精製し、遺伝子治療にも利用される最終製品となる。(図 3.1)。

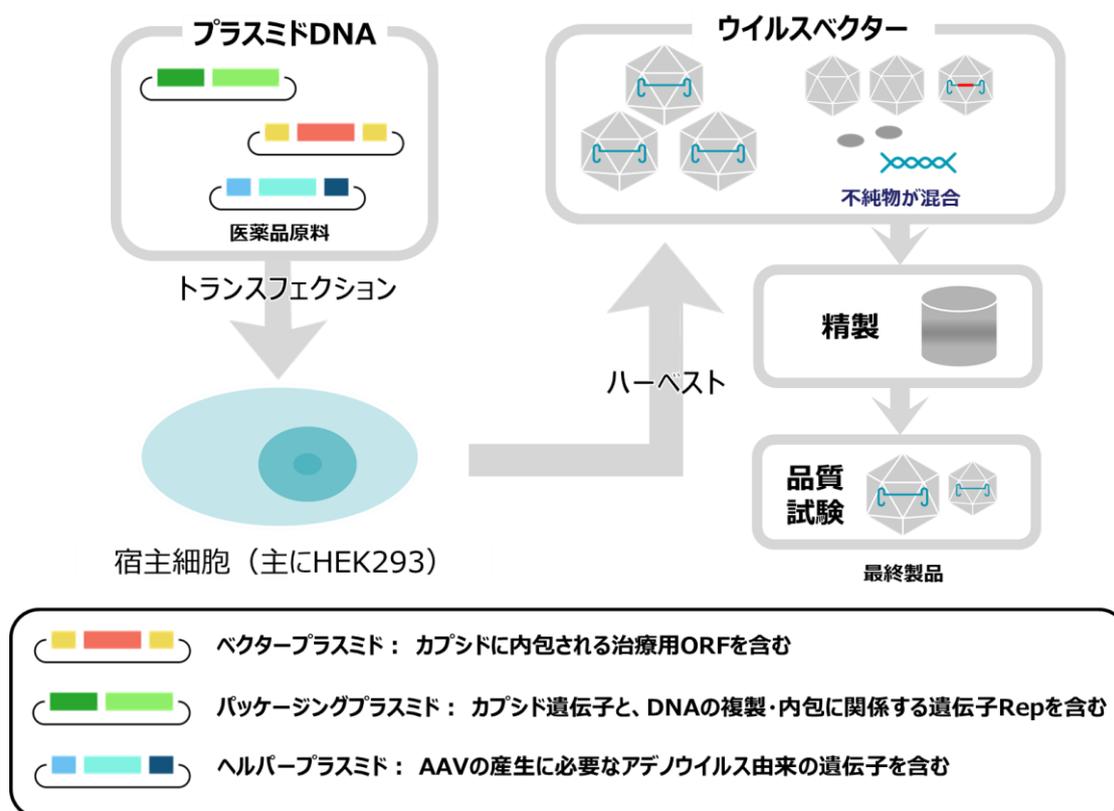


図 3.1. TTF による AAV ベクターの製造

ウイルスベクターの製造プロセスにおいて、プラスミド DNA は製造原料であり、ウイルスベクターの機能性 (有効性、安全性、製造性) を決める設計図としても働く。TTF には、ベクタープラスミド、パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミドが利用される (図 3.1)。(1) ベクタープラスミドには、治療用タンパク質の ORF (Open Reading Frame) とプロモーターが 2 つの ITR (Inverted Terminal Repeat、末端逆位反復配列) に挟まれる構造となる。(2) パッケージングプラスミドは、外殻タンパク質の Cap と AAV ゲノムの複製とカプシドへのパッケージングに関与する Rep の遺伝子を含む。尚、野生の AAV は ITR の間に Cap と Rep の遺伝子を含むが、ウイルスベクターを TTF で製造する場合は両遺伝子をパッ

ケーシングプラスミドに含むことになる。③ヘルパープラスミドには、AAV が本来複製するために必要なアデノウイルス由来のヘルパー遺伝子を含んでおり、具体的には E2A、E4、VA の遺伝子を含む。尚、宿主細胞に HEK293 を使う場合、その他のヘルパー遺伝子 E1A、E1B は HEK293 内に存在するためヘルパープラスミドには不要となる。このように複数の遺伝子が相互作用し合い、AAV ベクターは製造される^{1,2} (図 3.2)。

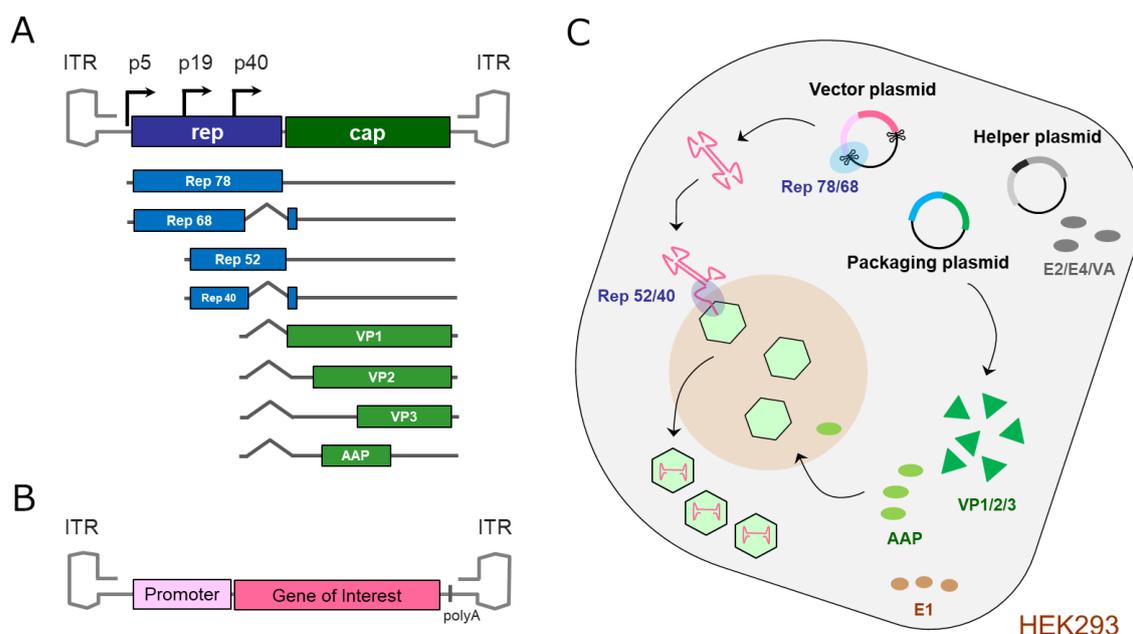


図 3.2. AAV ベクターの製造に利用される野生 AAV ゲノムに含まれる遺伝子 (A)、AAV ベクター (ベクタープラスミド) に含まれる ssDNA 配列 (B) および TTF によって AAV ベクターが HEK293 内で構築されるメカニズム (C)

AAV ベクターの製造プロセス開発は、下記の 4 ステップで進められる。

① DNA 設計・構築 : Vector engineering

前述した通り、トランスフェクションに用いるプラスミド DNA の設計 (遺伝子の組み合わせ) により AAV ベクターの有効性、安全性、製造性は決定される。創薬研究ステージにおいては、治療用タンパク質 (GOI: Gene of Interest)、GOI のプロモーター、組織特異性に関するカプシド配列が決定されるため、本ステップでは、AAV ベクターの生産性が高く、混入する不純物が少なくなるようその他の遺伝子を最適化し、AAV ベクターの製造に用いるプラスミド DNA の配列を設計する。さらに、設計されたプラスミド DNA は大腸菌等の微生物に形質転換体として保持され、セルバンクとして管理される。

② 宿主細胞の選定・開発 : Cell line development

①で設計したプラスミド DNA をトランスフェクションする製造に用いる動物細胞を選定

する。③で開発する予定の培養プロセス（接着培養や浮遊培養）に応じて、AAV ベクターの生産性に優れた宿主細胞を選定または開発し、セルバンクを構築する。宿主細胞のゲノムを改変する場合、遺伝子改変した細胞をシングルセルで分取し、拡大培養した後、セルバンクを構築する。

③ 上流プロセスの開発：Upstream process development

①②で構築したプラスミド DNA と宿主細胞を用いて培養プロセスを開発する。三角フラスコやバイオリアクターを用いて、培地成分、培養条件、トランスフェクション条件、ハーベスト条件等のプロセスパラメータを検討（図 3.3）し、AAV ベクターの産生量が高い培養プロセスを開発する。さらに、小規模で取得したプロセスデータと化学工学的手法を用いて、スケールアップ検討を行う。

④ 下流プロセスの開発：Downstream process development

③で回収した AAV ベクターには、様々な不純物（宿主由来不純物、原料・プロセス由来不純物、製品由来不純物）が含まれる（図 3.3）ため、カラム精製やフィルターろ過を行い、目的物質である完全な AAV ベクターを、高純度かつ高い収率で回収できる精製プロセスを開発する。下流プロセスも上流プロセスと同様にスケールアップが必要となる。さらに、最終的にバッファー置換された AAV ベクターの分散液が最終製剤の処方成分にもなるため、AAV ベクターの保存安定性が高い分散液処方を開発する。

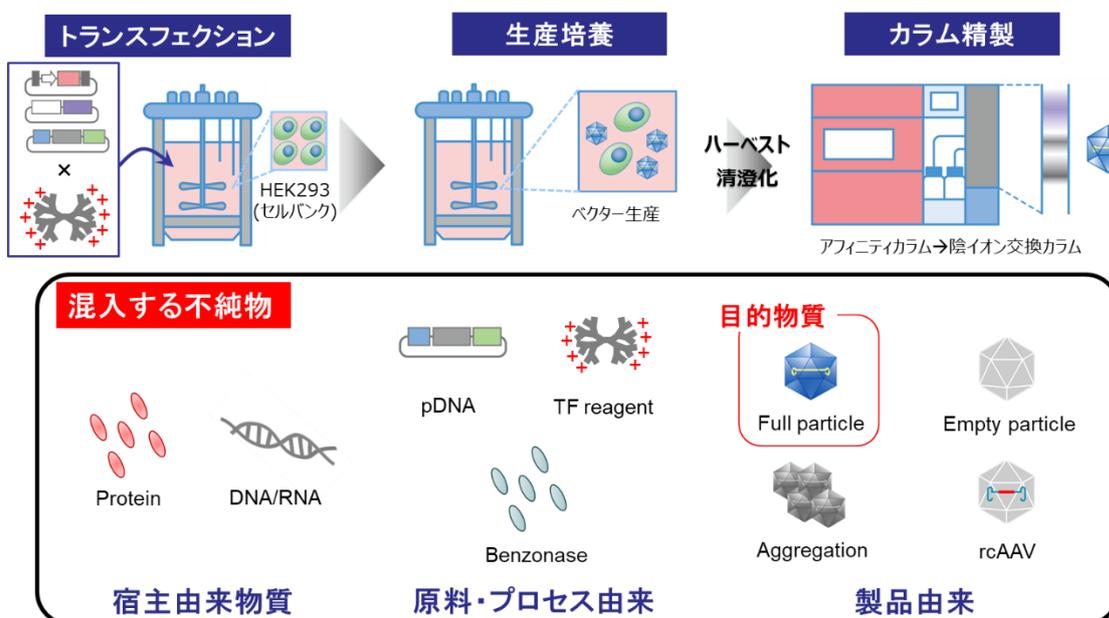


図 3.3. AAV ベクターの製造プロセス開発と混入する不純物

3.2 本研究の背景と目的

第1章に記載した通り、AAVベクターの非常に高額な製造コストは、遺伝子治療の開発パイプラインの増大に伴い、大きな問題となって表面化した。AAVベクターの製造コストを高騰化させる大きい要因として次の3つが挙げられる。

- A) AAVベクターの低い生産性（トランスフェクションするDNA、細胞、培養条件）
- B) 一過性トランスフェクション法に用いるプラスミドDNAの原料コスト
- C) 不純物（特に空カプシドの低減）の精製コスト

AとBは上流プロセスに大きく関係する課題である。一方、Cは下流プロセスに関係する課題となるが、AAVベクター製造において大きな問題となる空カプシドは、AAVベクターと同じカプシド構造を有する不純物のため精製工程で除くことが困難であり、上流プロセスでいかに発生を防ぐかが重要となる。総じて、高収量かつ空カプシドの混入を抑制できるプラスミドDNAおよび培養プロセスを開発できるかが製造コストの低減において大きな鍵となる。今後、遺伝子治療の開発パイプラインは、局所投与からより多くの製造量を必要とする全身投与へと適応疾患を拡大することが予想されており、1バッチあたりの製造量および年間製造バッチ数も増大することから製造コストの削減がより求められる状況である。

本研究では、上記の(B)に特に着目し、製造コスト低減を目的とした技術開発を行った。

図3.4にPall Corporation（現Cytiva）が2019年の欧州遺伝子細胞治療学会で発表したAAVベクターの製造コスト分析の報告内容を示す³。

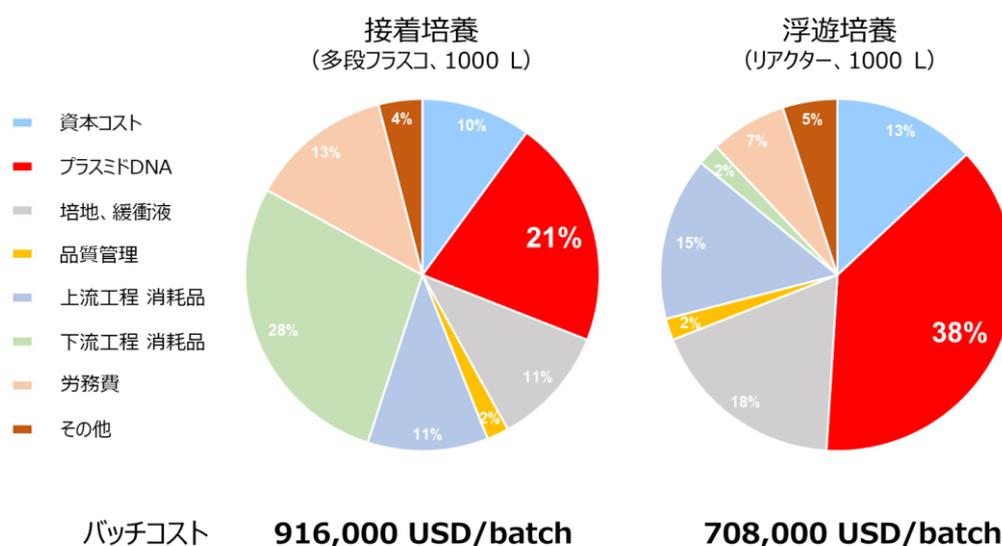


図 3.4. 接着培養用多段フラスコ（左円グラフ）と浮遊培養用リアクター（右円グラフ）を用いた AAV ベクターの製造バッチコストとコスト内訳（Pall Corporation が 2019 年の欧州遺伝子細胞治療学会で発表したデータを基に作成）

製造方法によって比率が大きいコストは異なるが、今後主流になると考えられるスケールアップ性に優れた浮遊培養においては、38%がプラスミド DNA に関するコスト（1 バッチあたり 269k USD）となる。特に、現在主流となる TTF では、原料となるプラスミド DNA を 3 種類必要とすることが製造コスト増大の要因となっており、その解決アプローチとして、トランスフェクションに用いるプラスミド DNA の種類を減らす方法が考えられる。パッケージングプラスミドとヘルパープラスミドを 1 つにした **Dual transfection** システムが 2000 年代前半に報告⁴されており、3 つのプラスミド DNA を 2 つに減らすことによりプラスミド DNA の GMP 準拠の製造コストを 3 分の 1 にまで低減できると報告もされている⁵。

本研究では、長鎖 DNA 合成技術 OGAB[®]法を用いて、AAV ベクターの産生に必要となる全ての遺伝子を 1 つのプラスミドに統合したプラスミド DNA（オールインワンプラスミドTM。以下、統合型プラスミドと表記）を合成し、**Dual transfection** システムよりもコスト低減が期待される **Single transfection** システム（STF）開発することを目的とした（図 3. 5）。最初に、合成した統合型プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションすることで AAV ベクターが産生されるかを確認した。次に、STF では、プラスミド DNA のサイズが大きくなることに伴い、トランスフェクション効率や安定性の低下が懸念されたため、STF と TTF により得られる AAV ベクターの産生量について比較検討をおこなった。

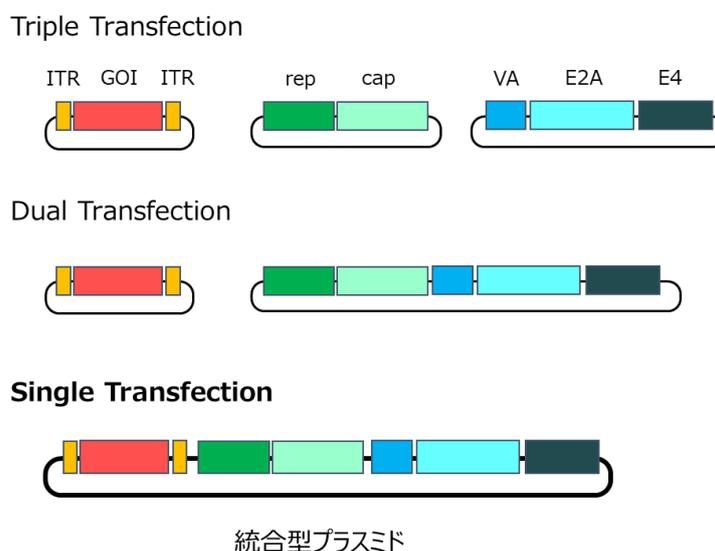


図 3. 5. **Single transfection** システムを目指した統合型プラスミドの開発

3.3 長鎖 DNA 合成技術を用いた統合型プラスミドの構築

長鎖 DNA 合成技術である OGAB[®]は Ordered Gene Assembly in *B. subtilis* の略称であり、枯草菌が直鎖状 DNA を自発的に取り込み細胞内で環状化する特性を利用した DNA 断片の集積技術である^{6,7}。特に、非常に多くの DNA 断片を集積可能なため、10 kb 以上の長鎖 DNA を合成することを得意とする技術である。さらに、材料として準備する全ての DNA 断片の

長さをほぼ等しく揃えることにより、各 DNA 断片のモル数を全て等しくする工程の作業性が大幅に改善された。正確な順番で正しい向きに最大 50 個の DNA 断片を集積することが可能⁸であり、約 100 kb のプラスミド DNA の構築にも成功している。具体的な製造工程としては、合成する DNA の配列情報に従い設計された DNA 断片を、設計図通りに化学合成し準備した後、プラスミドベクターと連結することで全ての合成した DNA 断片を集積する。この段階では、DNA は合成した DNA を繰り返し含む直鎖状の DNA となる。タンデムリピートの直鎖状 DNA を枯草菌に形質転換することで環状化し、枯草菌からプラスミド DNA を抽出することで目的とする合成 DNA が得られる (図 3.6)。

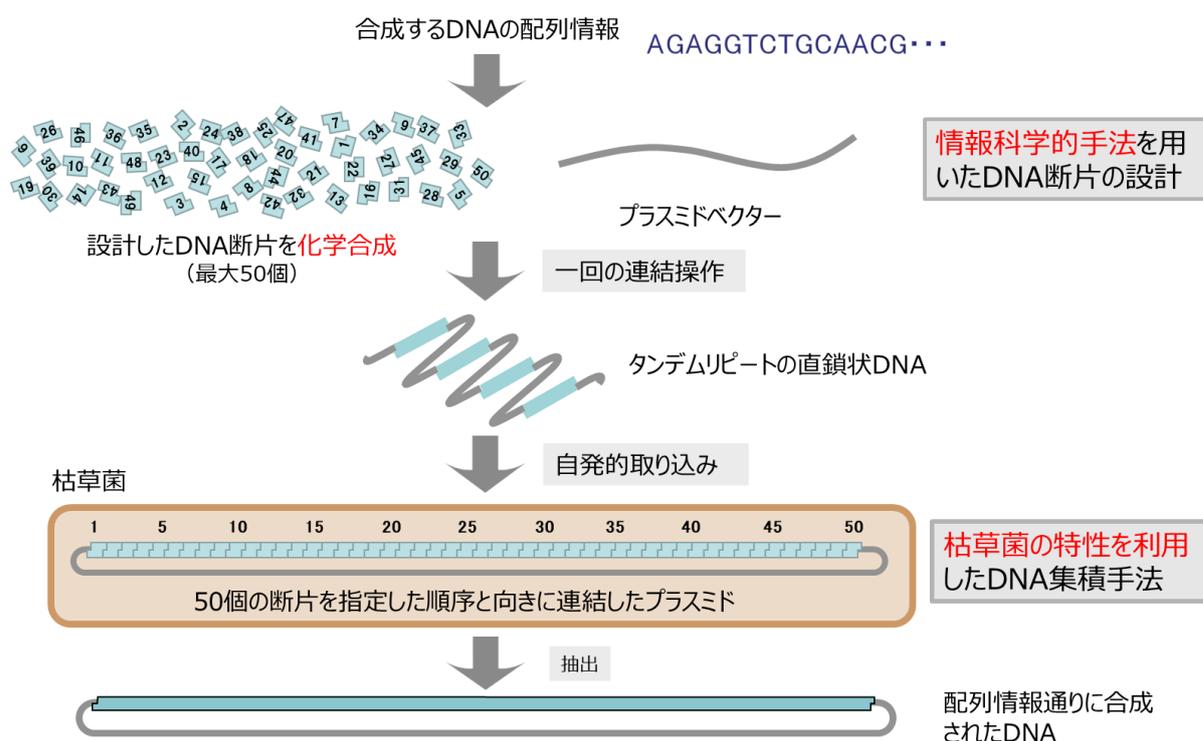


図 3.6. OGAB[®]法による DNA 合成の概略

統合型プラスミドの合成および比較対象の TTF に用いるプラスミド DNA の構築は、OGAB[®]法の特許を保有する株式会社シンプロジェンにて実施された。最初に、統合型プラスミドのコンセプトを検証するため、タカラバイオ社から販売されるキット AAVpro[®] Helper Free System に含まれる、ベクタープラスミド (pAAV-CMV)、パッケージングプラスミド (pRC-mi342)、ヘルパープラスミド (pHelper) の配列を基にし、統合型プラスミド pGETS103-AAV-Helper-RC2 の設計を行った。さらに、枯草菌と大腸菌の両宿主細胞で複製可能なシャトルベクターである pGETS103- Δ AarI に、pAAV-CMV、pRC-mi342、pHelper に含まれる AAV ベクターの産生に必要な遺伝子をそれぞれクローニングし、AAV ベクターの生産実験に用いる計 7 種類 (図 3.7) のプラスミド DNA を準備した (各プラスミド DNA の構築方法の詳細は、特許第 7104263 号に記載)。

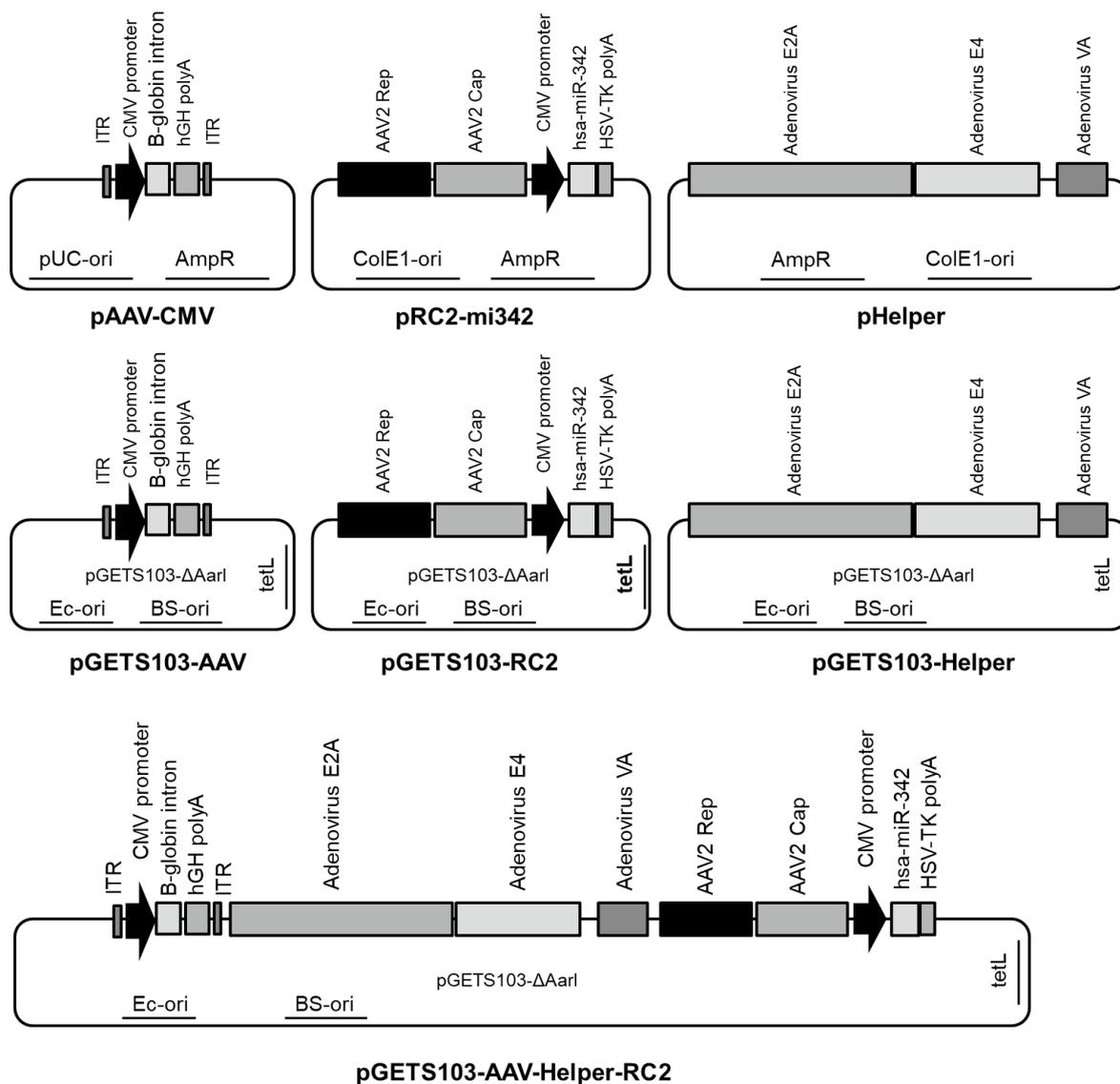


図 3.7. 統合型プラスミドによる生産実験（コンセプト検証）に用いるプラスミド DNA

統合型プラスミド pGETS103-AAV-Helper-RC2 は OGAB[®]法による構築を行った。pGETS103-AAV-Helper-RC2 の AAV ベクター産生遺伝子を含む部分について、計 22 個の DNA 断片に分割できるよう各配列を設計し、化学合成と PCR を用いて全 DNA 断片を準備した。それらの断片を pGETS103 と連結させ、OGAB[®]法で集積することで全長 31.9 kb の統合型プラスミド pGETS103-AAV-Helper-RC2 を構築（図 3. 8）することに成功した（特許第 7104263 号、特開 2022-183360 に記載の内容）。

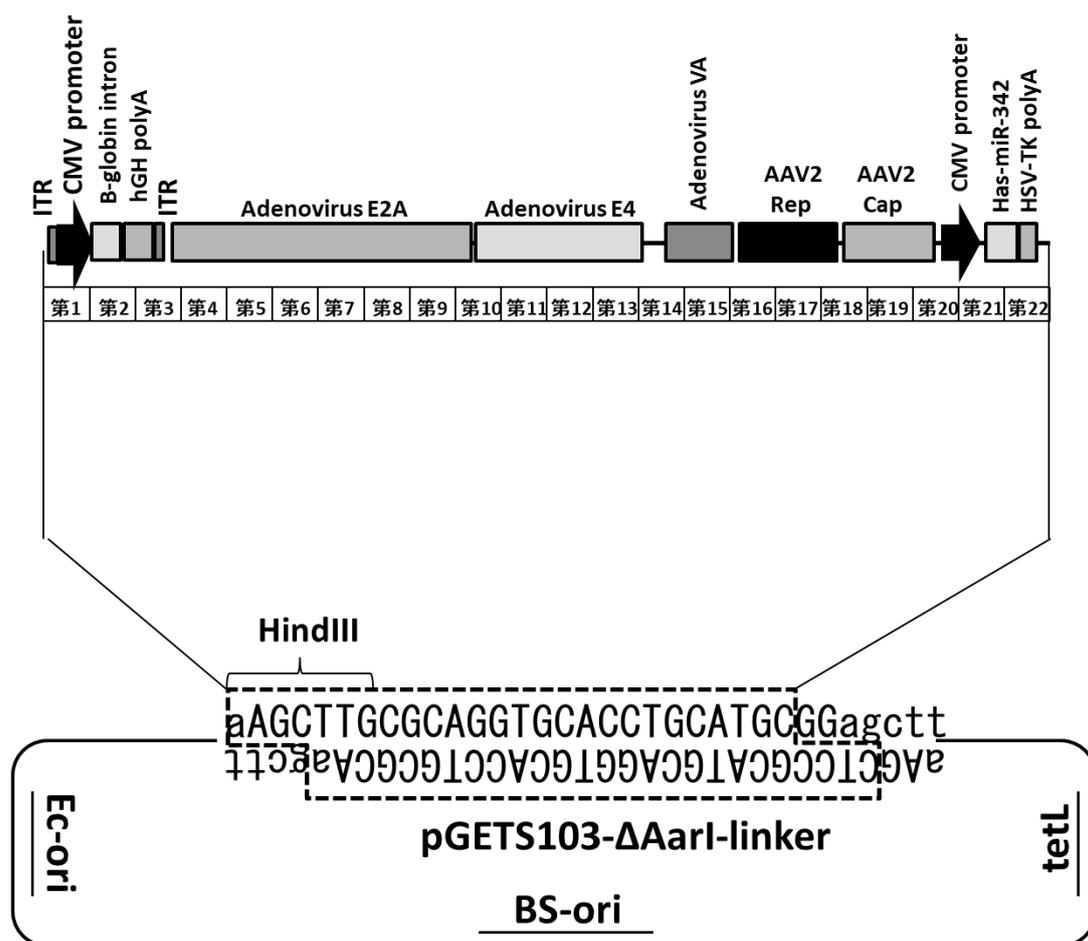


図 3.8. OGAB[®]法により合成された統合型プラスミド pGETS103-AAV-Helper-RC2 の構造

追加検証を実施するため、株式会社シンプロジェンにて、EGFPと転写後調節因子のWPPE (Woodchuk hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) を含むベクタープラスミドを構築し、計4種のプラスミドDNA (図 3.9) を構築した。統合型プラスミドである pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 は、より高コピーのプラスミド pGETS151 に AAV ベクター産生遺伝子をクローニングした構造となるが、本研究ではプラスミドベクターのバックボーン部分も含め OGAB[®]法を用いて合成を行った (図 3.10)。pAAV-CMV-EGFP-WPRE、pHelper、pRC-mi342、pGETS151 の DNA 配列を基にし、計30個の DNA 断片に分割されるよう配列を設計し、化学合成と PCR を用いて全 DNA 断片を調製した。調製した断片を OGAB[®]法を用いて集積し、統合型プラスミド pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 を合成した (国際出願番号 PCT/JP2023/017131 に記載の内容)。

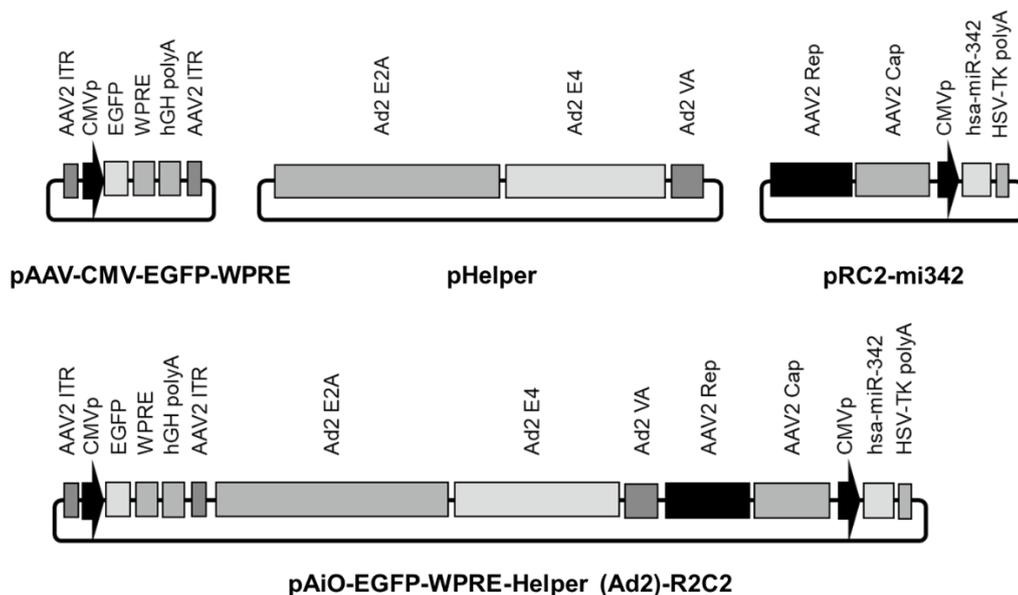


図 3.9. 統合型プラスミドによる生産実験（追加検証）に用いるプラスミド DNA

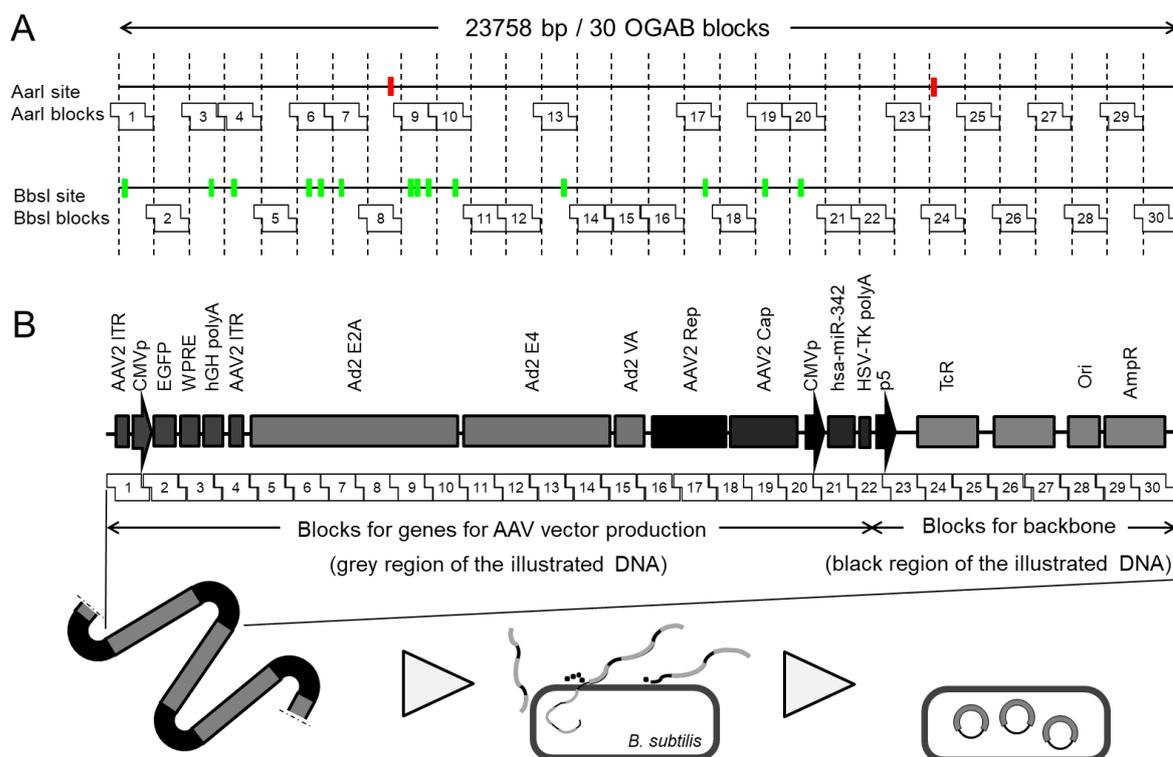


図 3.10. 統合型プラスミド pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 の構築に用いる 30 個の DNA 断片的设计 (A) および pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 の構造と OGAB®法による集積工程 (B)

3.4 統合型プラスミドによる AAV ベクター生産実験

3.4.1 実験方法

(1) 統合型プラスミドによる生産実験：コンセプト検証

【AAV ベクターの作製】

図 3.7 に示した株式会社シンプロジェンで構築、調製したプラスミド DNA について、AAV ベクターの受託作製を行う米国の SignaGen 社に送付し、これらのプラスミド DNA を用いて AAV ベクターが産生されるか検証した。pGETS103 にクローニングした DNA (#1～4) については、枯草菌および大腸菌でそれぞれ大量調製したプラスミド DNA を、分析を行った後、それぞれ AAV ベクターの生産実験に利用した。AAV ベクターの生産実験は、SignaGen 社の標準プロトコルに従い実施され、計 5 種類の条件で産生される AAV ベクターの評価を実施した (表 3.1)。

統合型プラスミドまたはベクタープラスミド:パッケージングプラスミド:パッケージングプラスミド (1:1:1、モル比) を、それぞれ 1.13E+13 GC となるよう調製した。これらのプラスミド DNA に対して、2.7 倍量 (重量比) の PolyJet 試薬を混合した後、調製した DNA 複合体を 2×10^8 cells の HEK293 細胞 (継代数 12) にトランスフェクションした。5 時間培養した後、HEK293 細胞を回収し、3 回の凍結融解を行った後、Benzonase を添加し、37°C で 1 時間ほど静置した。12,500 rpm で 30 分間遠心分離を行い、上清を回収し、28,000 rpm で 18 時間塩化セシウム密度勾配超遠心を行った後、AAV ベクターを含む分画を回収し、0.001% Pluronic F-68 を含む PBS バッファーに AAV ベクターを分散させた。

表 3.1. 統合型プラスミドを含むシンプロジェンで構築したプラスミド DNA (1)

rAAV #	利用したプラスミド	Length [bp]	プラスミドを増幅させた微生物
1	pGETS103-AAV-Helper-RC2	31,884	枯草菌
2	pGETS103-AAV	17,722	枯草菌
	pGETS103-Helper	24,812	
	pGETS103-RC2	20,982	
3	pGETS103-AAV-Helper-RC2	31,884	大腸菌
4	pGETS103-AAV	17,722	大腸菌
	pGETS103-Helper	24,812	
	pGETS103-RC2	20,982	
5	pAAV-CMV	5,031	大腸菌
	pHelper	11,635	
	pRC2-mi342	8,189	

【調製したプラスミド DNA のエンドトキシン定量】

大量調製に用いた宿主細胞の違いがプラスミド DNA の品質に及ぼす影響を評価するため、pGETS103-AAV-Helper-RC2、pGETS103-RC2 および pGETS103-AAV 溶液に含まれるエ

ンドトキシンを定量した。LAL 試験用エンドトキシン特異的バッファー（ベリタス）と 20 mM トリス塩酸緩衝液とを等量で混合しサンプル希釈液とした。プラスミド DNA 検体に含まれるエンドトキシン量が、カートリッジの測定レンジに入るようサンプル希釈液で 40 倍または 250 倍希釈し、Endosafe nexgen-PTS Instrument（チャールズリバー）を用いてエンドトキシンの定量を行った。測定は、PTS カートリッジ FDA（0.1~10 EU/mL）および PTS カートリッジ FDA（0.005~0.5 EU/mL）を用いて実施した。

【調製したプラスミド DNA の ccc 純度定量】

大量調製に用いた宿主細胞の違いがプラスミド DNA の品質に及ぼす影響を評価するため、pGETS103-AAV-Helper-RC2 および pGETS103-RC2 溶液に含まれるスーパーコイル状 DNA 比率（ccc 純度）を定量した。

DsDNA 1000 kit（SCIEX）に含まれるゲル粉末に超純水を 20 mL 加え、終夜攪拌した。ゲルが完全に溶解したことを確認後、1×TBE electrophoresis buffer（Thermofisher）によりゲルを 10 倍希釈し、0.01 vol%となるよう SYBR Gold nucleic acid gel stain（Thermofisher）を加え、調製したゲルをキャピラリーに充てんした。プラスミド DNA 検体は超純水で 10 ng/mL となるよう調製し、P/ACE MDQ Plus（SCIEX）を用いてキャピラリー電気泳動を実施した。検体は 0.2 psi、2 秒で注入し、9.0 kV で 20 分間ほど電気泳動を実施した。検出は、蛍光（励起波長：488 nm、蛍光波長：520 nm、Dynamic range：1000 RFU）を用いて行い、面積百分率法で ccc 純度を定量した。

【産生された AAV ベクターの VG タイター定量（1）】

SignaGen 社で調製された AAV ベクターに対して、VG タイターの定量を行った。250 U/mL に調製した DNase I（タカラバイオ）を各 AAV ベクターに分注した後、PCR 用サーマルサイクラー（Thermofisher）を用いて 37°C で 30 分間加温した。さらに、40 mM EDTA 溶液（pH 8.0、タカラバイオ）を加えた後、55°C で 30 分間ほど加熱した。さらに、ヌクレアーゼフリーウォーター（Promega）でサンプルを 2.5 倍希釈した後、95°C で 10 分間加熱することにより ssDNA を抽出し、Step One Plus（Thermofisher）を用いて定量 PCR を実施した。

定量 PCR の反応液は、プレート 1 ウェルあたりに、QuantiTect SYBR Green PCR Master（QIAGEN）を 10 μ L、0.01 mM Primer_forward を 1 μ L、0.01 mM Primer_reverse を 1 μ L、水を 6 μ L、テンプレート DNA を 2 μ L 含む。シールでプレートを密閉後、定量 PCR を実施した。プライマーのターゲットは CMV プロモーターとし、PCR 条件は、95°C で 15 分間加熱した後、(1) 94°C で 15 秒、(2) 60°C で 30 秒、(3) 72°C で 30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、Ct 値から各 AAV ベクターの VG タイターを算出した。

プライマーの配列

Primer_forward: 5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'

Primer_reverse: 5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'

(2) 統合型プラスミドによる生産実験：追加検証**【AAV ベクターの作製 (1)】**

コンセプト検証では、OGAB®法で構築した DNA により AAV ベクターが産生されるかを確認することが主な目的であったため、作製方法の検討は実施せず、SignaGen 社の標準プロトコールに基づき AAV ベクターの作製を行った。追加検証では、株式会社シンプロジェンの研究施設にて、AAV ベクターの作製プロトコールを構築した後、AAV ベクターの生産実験を実施した。

表 3.1 に示す 5 種類のプラスミド DNA の組み合わせについて AAV ベクターを作製した。トランスフェクションを行う前日に、HEK293T 細胞 1.5×10^7 cells を 15 cm ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 下で 22 時間培養した。FBS (Thermofisher) を 2%、ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク) を 1% 含むよう調製した DMEM 培地 (Thermofisher) 19 mL に培地交換し、さらに 2 時間培養した。コンフルエント状態の HEK293T 細胞 (3×10^7 cells) に、プラスミド DNA 2.7 pmol を含む DMEM 培地 0.5 mL と、プラスミド DNA の重量 $1 \mu\text{g}$ あたり $1 \mu\text{L}$ の PEIpro (PolyPlus) を含む DMEM 培地 0.5 mL とを混合した培地 1 mL を添加し、トランスフェクションを行った。37°C、5% CO₂ 下で 72 時間培養後、0.5M EDTA (pH 8.0) (ナカライテスク) を 1/80 容量添加し、室温で 10 分間静置した。剥離した細胞懸濁液を回収し、 $180 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、2 mM MgCl₂ (ナカライテスク)、150 mM NaCl (ナカライテスク)、50 mM Tris (ナカライテスク)、0.1% Triton X-100 (ナカライテスク) 溶液 (pH 8.5) を細胞ペレットに添加し、さらに Benzonase (Merck) を加えて 37°C で 30 分間反応させた。1.9 M Mg₂SO₄ (ナカライテスク) を 1/50 容量添加し、室温で 10 分間静置した後、 $12,000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い上清を回収し、Pluronic F-68 (Thermofisher) を終濃度 0.001% となるよう添加した。塩化セシウム (ナカライテスク) 溶液を 1.50 g/cm^3 、 1.30 g/cm^3 、 1.25 g/cm^3 の 3 濃度で密度勾配超遠心分離 ($226,000 \times g$ 、18°C) を 90 分間行い、 1.30 g/cm^3 付近の溶液から約 3.5 mL の AAV ベクターを回収した。

【AAV ベクターの作製 (2)】

表 3.2 に示す 2 種類のプラスミド DNA の組み合わせについて、AAV ベクターを作製した。#7 は、プラスミドベクターのバックボーン部分も含め OGAB®法により構築された統合型プラスミドとなる。

表 3.2. 統合型プラスミドを含むシンプロジェンで構築したプラスミド DNA (2)

rAAV #	利用したプラスミド	プラスミドを増幅させた微生物
6	pAAV-EGFP-WPRE pHelper pRC2-mi342	大腸菌
7	pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2	大腸菌

トランスフェクションを行う前日に、HEK293 細胞 1.0×10^6 cells を 6 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ 下で 22 時間培養した。FBS を 2%、ペニシリン/ストレプトマイシンを 1% 含むよう調製した DMEM 培地 19 mL に培地交換し、さらに 2 時間培養した。そこに、#6 では pAAV-EGFP-WPRE 0.48 μ g、pHelper 0.95 μ g、pRC2-mi342 0.52 μ g、#7 では pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 1.95 μ g を等量の PEIpro と混合し、さらに DMEM 培地に添加し 0.1 mL を 6 ウェルプレートに分注し、トランスフェクションを行った。37°C、5% CO₂ 下で 72 時間培養後、0.5M EDTA (pH 8.0) を 1/80 容量添加し、室温で 10 分間静置した後、剥離した細胞懸濁液を回収し、180 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。2 mM MgCl₂、150 mM NaCl、50 mM Tris、0.1% Triton X-100 溶液 (pH 8.5) を細胞ペレットに添加し、さらに Benzonase 25 Units を加えて 37°C で 30 分間反応させた。1.9 M Mg₂SO₄ を 1/50 容量添加し、室温で 10 分間静置した後、12,000 \times g で 10 分間遠心分離を行い上清を回収し、Pluronic F-68 を終濃度 0.001% となるよう添加した。

【産生された AAV ベクターの VG タイター定量 (2)】

株式会社シンプロジェンで作製された AAV ベクターに対して VG タイターの定量を行った。DNase I を各 AAV ベクターに分注した後、37°C で 30 分間ほど加温した。さらに、95°C で 10 分間ほど加温したサンプルを、ヌクレアーゼフリーの水で 1000 倍希釈した。

定量 PCR に用いるプライマーのターゲットは CMV プロモーターとし、プレート 1 ウェルあたりに、反応液として PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermofisher) を 5 μ L、0.01 mM Primer_forward を 0.5 μ L、0.01 mM Primer_reverse を 0.5 μ L、水を 2 μ L、テンプレート DNA を 2 μ L 含む。シールでプレートを密閉後、Quanta Studio 3 (Thermofisher) を用いて定量 PCR を実施した。PCR 条件は、95°C で 10 分間加熱した後、(1) 95°C で 15 秒、(2) 55°C で 5 秒、(3) 72°C で 30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、Ct 値から各 AAV ベクターの VG タイターを算出した。

プライマーの配列

Primer_forward: 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3'

Primer_reverse: 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3'

3.4.2 結果、考察

OGAB[®]法は枯草菌に形質転換するが、過去に枯草菌を用いて構築したプラスミド DNA を、AAV ベクター産生用のプラスミド DNA として利用した報告例は見つからなかった。本研究では、大腸菌と枯草菌で複製可能なプラスミドベクター (pGETS103) を用いて AAV ベクター産生用のプラスミド DNA を構築したので、汎用される大腸菌に加え、枯草菌を用いてプラスミド DNA の増幅 (大量調製) を行った。最初のコンセプト検証では、pGETS103 をプラスミドベクター、枯草菌を宿主として利用した場合に AAV ベクターが産生されるか確認

することを実験の目的とした。

大腸菌と枯草菌を宿主として大量調製した際に得られるプラスミド DNA について、それぞれ品質を評価した。具体的には、LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 試薬を用いた比色法にてエンドトキシンの混入量、キャピラリー電気泳動にて遺伝子の発現効率に影響するスーパーコイル状 DNA の比率 (ccc 純度) について分析した (表 3.3)。

表 3.3. 枯草菌および大腸菌を宿主とした場合の AAV ベクター産生用プラスミド DNA の品質の比較

利用したプラスミド	プラスミドを増幅させた微生物	エンドトキシン [EU/mL]	ccc 純度 [%]
pGETS103-AAV-Helper-RC2	枯草菌	42.4	87
pGETS103-AAV-Helper-RC2	大腸菌	> 2500	78
pGETS103-RC2	枯草菌	15.6	94
pGETS103-RC2	大腸菌	N.D.	91
pGETS103-AAV	枯草菌	10.3	N.D.
pGETS103-AAV	大腸菌	> 400	N.D.

N.D.: No data

枯草菌はグラム陽性菌であるため、医薬品製造において厳格な管理が求められるエンドトキシンを含まない。大腸菌を用いて大量調製した場合は、いずれのプラスミド DNA においても PTS カートリッジ FDA の定量上限以上のエンドトキシンが認められた。一方、枯草菌を宿主とした場合は、他の試薬や実験環境由来の混入と考えられるエンドトキシンが僅かに検出されたが、大幅にエンドトキシン量の混入が低減した。実際の製造においては、カラム精製によってエンドトキシンを除去するが、上流工程でエンドトキシンが混入しないことで下流工程における精製の負担が軽減されるため、製造コスト低減にも繋がる。

さらに、ccc 純度に関しても、大腸菌と比べて枯草菌を宿主とした方が、高い純度でプラスミド DNA が回収された。特に統合型プラスミドではより大きい差が認められた。パッケージングプラスミド (pGETS103-RC2) と比べて、統合型プラスミドはより長く GC rich な配列領域も含むが、枯草菌が複雑な DNA 配列に対してトポロジーをより安定的に保持できる可能性が示唆された。エンドトキシンと同様に、カラム精製によってスーパーコイル状 DNA の比率は高くできるが、上流工程で回収するプラスミド DNA の ccc 純度が高い方が下流工程における精製の負担が軽減される。総合的に、下流工程の製造コスト・負担の低減に繋がる点が、枯草菌を利用する大量調製システムの利点の一つとして考えられた。

次に、それぞれのプラスミド DNA をトランスフェクションした際に産生される AAV ベクターの産生量 (VG タイター) を比較した。最初のコンセプト検証においては、委託先

(SignaGen 社) の標準プロトコールに従い AAV ベクターの生産実験を行った (図 3. 11A)。結果としては、TTF に比べて STF により産生される AAV ベクターのタイターは宿主に関係なく低く、大腸菌を宿主とした方が AAV ベクターの産生量が高かった。しかしながら、統合型プラスミドをトランスフェクションすることにより AAV ベクターが産生できることは確認されたため、より洗練された条件で追加検証を実施することとした。

委託先での生産実験については条件をコントロールができず、詳細の生産条件を知ることができなかつたため、著者の所属企業である株式会社シンプロジェンで開発した AAV ベクターの作製方法を用いて、同じ組み合わせのプラスミド DNA をトランスフェクションし、それぞれの VG タイターを評価した (図 3. 11B)。枯草菌で大量調製した場合、大腸菌と比較して、STF、TTF の両方において AAV ベクターの産生量は大きく低減し、委託先での生産実験と同じ傾向が示された。一方、大腸菌で大量調製した統合型プラスミドは、同じプラスミドベクターを用いた TTF (#4) およびタカラバイオ社から市販されるプラスミド DNA による TTF (#5) よりも高いタイターが示された。

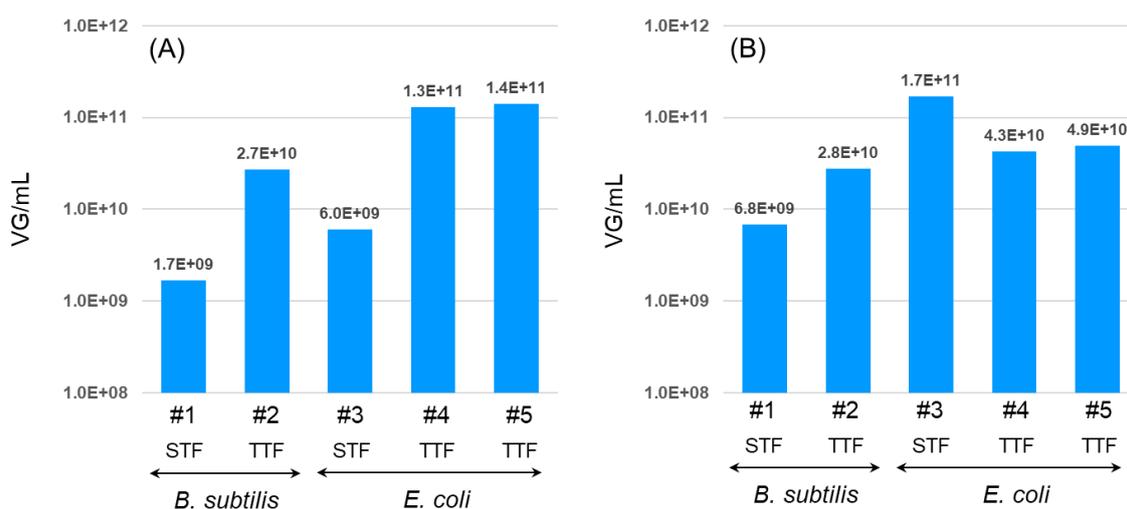


図 3. 11. SignaGen 社 (A) および株式会社シンプロジェン (B) で実施したシングルトランスフェクション (STF) とトリプルトランスフェクション (TTF) により産生された AAV ベクターのゲノムタイター

大量調製に用いる宿主が枯草菌か大腸菌かによる違いが、AAV ベクターの産生量に及ぼす影響について、他の統合型プラスミドによる AAV ベクターの生産実験でも確認したが、同様の傾向が確認された (図 3. 12)。表 3. 3 に示した通り、大量調製に利用する宿主によって DNA のトポロジーに差が生じることは示されたが、枯草菌を宿主とした場合の方が ccc 純度は高かったため、トポロジーが原因となって AAV ベクターの産生量に大きな違いが生じているとは考えにくい。本研究においては、OGAB®法 (枯草菌) で集積・合成した DNA を、大腸菌で大量調製することにより AAV ベクターの産生量が大きく増大した理由は解析

できていないが、DNA のメチル化等のエピジェネティクスの違いが産生量の違いに影響している可能性が推察された。

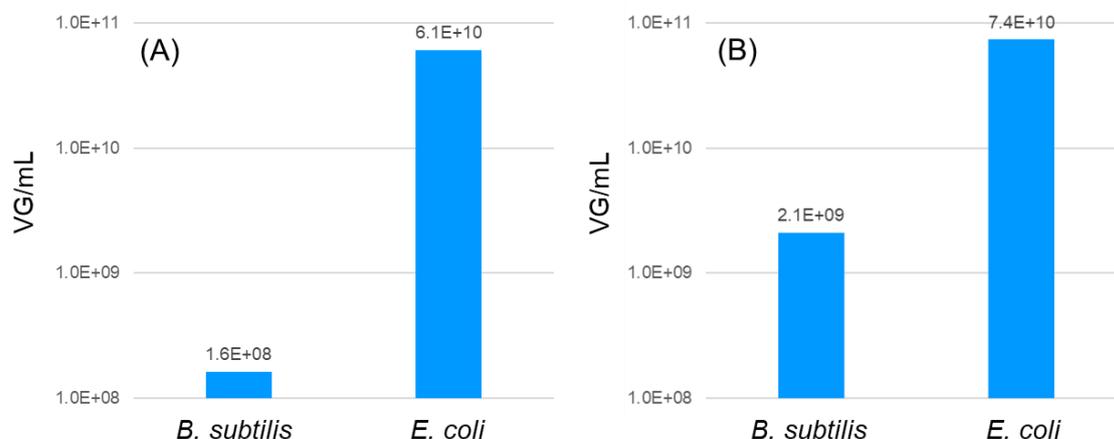


図 3.12. 統合型プラスミドの大量調製に用いた宿主が異なる統合型プラスミド pGETS103-AAV-Helper-RC2 (A) および統合型プラスミド pGETS151-AAV-Helper-RC2 (B) の STF により産生された AAV ベクターのゲノムタイター

以上の結果から、AAV ベクターの産生に用いる統合型プラスミドは、OGAB®法を用いて枯草菌で合成・構築した後、大腸菌で大量調製することで高い AAV ベクターの産生量が得られることが示された(国際出願番号 PCT/JP2023/017131 に記載の内容)。図 3.9 に示す TTF に用いるプラスミド DNA (#6) と、STF に用いる統合型プラスミド pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 (#7) の DNA 配列はバックボーンを除き完全に同一である。両プラスミド DNA をトランスフェクションし産生された AAV ベクターのタイターを図 3.13 に示す。

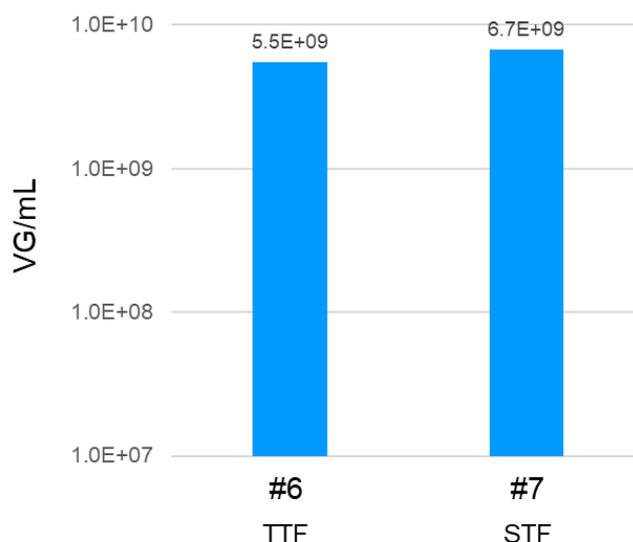


図 3.13. 全合成した統合型プラスミド pAiO-EGFP-WPRE-Helper (Ad2)-R2C2 (#7) と同じ AAV ベクター産生遺伝子を TTF (#6) した場合の AAV ベクター産生量の比較

TTF と同等の AAV ベクターの産生量を、統合型プラスミドによる STF でも得ることができた。また、本実験で得られた AAV ベクターを分析した結果、同等の粒子径（動的光散乱法により測定）、分子量（Mass Photometry 法により測定）、感染価（TCID₅₀ 法により測定）が得られたため、STF と TTF により産生される AAV ベクターの同等性は示唆された（本論文への記載無し）。

3.5 本章まとめ

本章では AAV ベクターの高額な製造コストの要因の 1 つとなっている 3 つのプラスミド DNA に着目し、AAV ベクターの産生に必要な遺伝子を 1 つのプラスミドベクターに搭載した統合型プラスミドを設計し、長鎖 DNA 合成技術である OGAB[®]法により合成した。枯草菌により構築されたプラスミド DNA をトランスフェクションし AAV ベクターが産生した報告は、調査した範囲では過去に例がなく、本研究では統合型プラスミドを STF することで TTF と同等の AAV ベクターが産生されること実証した。さらに、OGAB[®]法で構築した統合型プラスミドを大腸菌に形質転換し大量調製することで、AAV ベクターの産生量が増大することも示唆された。本成果は特許としてまとめ、計 3 件の特許出願（①特許第 7104263 号、②特開 2022-183360、③国際出願番号 PCT/JP2023/017131）をしており、内 2 件は 2022 年と 2023 年に日本で登録査定を得た。製造コストの削減効果は今後実証していく計画だが、研究着手前に懸念された統合型プラスミドのトランスフェクション効率や安定性の低下に伴う AAV ベクターの産生量の低下については、本研究で TTF と同等以上の AAV ベクターの産生量が STF で示されたことで懸念は解消された。つまり、同等量のプラスミド DNA で同等の AAV ベクターが産生されたことから、Dual transfection 以上のコスト削減効果が期待される。

遺伝子治療に用いる AAV ベクターの製造コストの低減を目指す技術は、現在、世界的に開発が行われている。製造に必要となるプラスミド DNA を減らす代表的な技術として 2 つあり、薬剤制御型アデノウイルス 2 種を用いて AAV ベクターを製造する技術⁹や AAV ベクターを産生するために必要な rep 遺伝子の発現を薬剤制御できる DNA を宿主細胞のゲノムに組み込む技術¹⁰が存在する。両技術ともに非常に挑戦的であり魅力ある技術であるが、従来の一過性発現により産生される AAV ベクターとの同等性の担保やウイルスや薬剤の混入リスクという医薬品製造に利用する上での大きな課題が存在する。統合型プラスミドは、従来から利用される TTF と同様の一過性発現による製造方法であることが大きな利点と考えられる。

参考文献

1. Robert, M.A., Chahal, P.S., Audy, A., Kamen, A., Gilbert, R., and Gaillet, B. (2017). Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms. *Biotechnol. J.* *12*.
2. Maurer, A.C., and Weitzman, M.D. (2020). Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. *Hum. Gene Ther.* *31*, 499–511.
3. Cameau, E., Pedregal, A., and Glover, C. (2019). Cost modelling comparison of adherent multi-trays with suspension and fixed-bed bioreactors for the manufacturing of gene therapy products. *Cell Gene Ther. Insights* *5*, 1663–1674.
4. Grimm, D., Kay, M.A., and Kleinschmidt, J.A. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther.* *7*, 839–850.
5. Tang, Q., Keeler, A.M., Zhang, S., Su, Q., Lyu, Z., Cheng, Y., Gao, G., and Flotte, T.R. (2020). Two-plasmid packaging system for recombinant adeno-associated virus. *Biores. Open Access* *9*, 219–228.
6. Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M. (2003). One step assembly of multiple DNA fragments with a designed order and orientation in *Bacillus subtilis* plasmid. *Nucleic Acids Res.* *31*.
7. Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M. (2007). Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by three relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment. *J. Biotechnol.* *129*, 592–603.
8. Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., and Itaya, M. (2015). Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments. *Sci. Rep.* *5*, 1–11.
9. Su, W., Patrício, M.I., Duffy, M.R., Krakowiak, J.M., Seymour, L.W., and Cawood, R. (2022). Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination. *Nat. Commun.* *13*, 1–14.
10. Mainwaring, D., Joshi, A., Coronel, J., and Niehus, C. (2021). Transfer and scale-up from 10 L BioBLU® to Allegro™ STR 50 and STR 200 Bioreactors. *Cell Gene Ther. Insights* *7*, 1347–1362.

本章に記載した内容は、3件の特許出願がされており、下記の特許公報にも詳細が記載されているため、参考文献として記載する。

公報番号：特許第7104263「枯草菌におけるウイルスベクタープラスミド生産」

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾

公報番号：特開 2022-183360 「統合型プラスミド」

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾

出願番号：PCT/JP2023/017131 「ウイルス由来構築物プラスミド」

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾、西村勇哉

※2023年7月時点では未公開

第4章

先端技術研究の社会実装 に向けた戦略構築

4.1 イノベーションアイデア

本研究では先端技術研究として、遺伝子治療に利用するウイルスベクターを製品化するために必須となる CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) に関する2つの技術領域について研究を行った。

1つ目は、遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法開発に関する研究である。具体的には、AAV ベクターの投与量の表記にも用いられるベクターゲノム (VG) タイターという重要品質特性に対して、先端的な分析技術であるドロップレットデジタル PCR を品質試験法として利用するため、分析検体である AAV ベクターの前処理工程において処理パラメータが VG タイター定量値に及ぼす影響について検証を行った (第2章)。

2つ目は、遺伝子治療用ウイルスベクターの製造プロセス開発に関する研究である。具体的には、非常に高額な遺伝子治療用 AAV ベクターの製造コストを低減することを目的として、統合型プラスミド (オールインワンプラスミド™) を開発した。現在主流の AAV ベクターの製造方法では3種のプラスミド DNA を必要とするが、統合型プラスミドは AAV ベクターの産生に必要な遺伝子を全て1つのプラスミドベクターに搭載したプラスミド DNA であり、本研究では長鎖 DNA 合成技術を用いて AAV ベクターを産生可能な統合型プラスミドを合成することに成功した (第3章)。

著者が所属する株式会社シンプロジェンは、OGAB® (Ordered Gene Assembly in *B. subtilis*) 法と呼ばれる独自の長鎖 DNA 合成技術を有する。本研究では、本 DNA 合成技術を主軸に置き、今後大きな成長が期待される遺伝子治療の市場において展開すべき事業内容について検討した。結果、先端技術研究で実施した遺伝子治療用ウイルスベクターの CMC 基盤と、独自性の高い DNA 合成技術という2つの技術プラットフォームを組み合わせたイノベーションアイデアとして、「日本を拠点とした遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業」(以下、本事業と記載) を考案した。

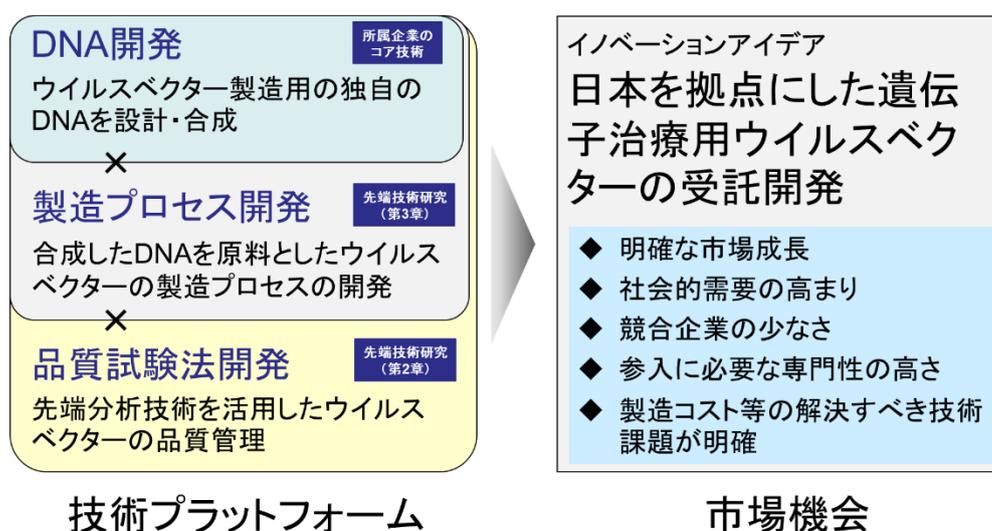


図 4.1. 先端技術研究を活用したイノベーションアイデア

具体的には、①「株式会社シンプロジェンの強みである DNA 合成技術 OGAB®法の特徴を活かし、独自性の高いウイルスベクター製造用のプラスミド DNA を設計・合成する。」②「合成した DNA を原料として用いて遺伝子治療用ウイルスベクターの製造プロセス開発（スケールアップ含む）を行う。」③「製造したウイルスベクターを治療薬として利用できるよう先端分析技術を活用した品質試験法を開発する。」という3つのプラットフォームを構築し、遺伝子治療用ウイルスベクターの設計から開発まで一貫して対応できるプラットフォーム型ビジネスの展開を目指し、本章では技術戦略、知財戦略、事業戦略、財務戦略について検討した。尚、戦略を検討する上においては、先端技術研究で取り扱う対象とした AAV ベクターに絞り込み、各調査を実施した。

4.2 技術戦略

4.2.1 品質試験に関する技術戦略

第2章に記載した通り、遺伝子治療用ウイルスベクターの品質管理・分析技術や規格について定められたガイドラインは国際的に存在しない。そのため、最新のレギュラトリーサイエンス、業界動向、新薬承認等の業界情報を常にアップデートしないと、適切な品質試験体制を構築できない。表 4.1 には、米国製薬企業（AAV ベクター開発に取り組む大手企業）が GMP 準拠で AAV ベクターに対して実施している品質管理項目を記載する（表中最右列）。

表 4.1. 本事業立上げにおいて構築すべき AAV ベクターの分析体制

関連項目	評価項目	本事業で構築した分析体制	米国製薬企業の実施する品質試験項目※
力価	ゲノムタイター	qPCR, ddPCR, UV/VIS	qPCR, ddPCR, UV/VIS
	感染価	TCID50	TCID50
	ベクター粒子数	ELISA, MA-DLS	ELISA, MA-DLS
	生物学的力価	Cell based (mRNA, Protein)	in vitro (RT-PCR), in vivo
完全性	ベクターゲノム	NGS, ddPCR	DNA sequencing
	ベクター粒子	Western blot	dot blot, LC-MS, intact MS
純度	宿主 DNA	ddPCR, qPCR, NGS	qPCR, NGS
	原料プラスミド	ddPCR, qPCR, NGS	qPCR, NGS
	ゲノム断片	NGS, (ddPCR)	NGS
	宿主タンパク質	ELISA	ELISA
	空カプシド	HPLC (IEX), Mass photometry	HPLC, TEM, AUC
	カプシド純度	SDS-PAGE, CE	SDS-PAGE, CE
	残留試薬	ELISA, Bradford, HPLC (RP)	ELISA, Bradford, HPLC
安全性	凝集体	MA-DLS, Flow-imaging, HPLC (SEC)	DLS, HPLC
	無菌性	-	Bioburden, 21CFR 610.12
	エンドトキシン	LAL assay	LAL assay
	マイコプラズマ	-	USP/EP method
	外来性ウイルス	-	Viral load
	自己増殖性ウイルス	Inhibition amplification assay	Inhibition amplification assay

※ Bioprocessing Summit Europe 2020 における製薬企業の口頭発表内容を基に作成

製薬企業が実施している品質試験の内容をベンチマークとするとともに、本事業立ち上げ時はリソースが限られるため、最初に整備すべき分析プラットフォームについて検討した。例えば、表 4.1 の赤字の試験は、菌やウイルスの混入を否定する試験で抗体医薬品等の従来のバイオ医薬品でも求められる試験項目である。特殊な施設が必要なこと、Charles River 社や BioReliance 社といった大手 CRO（Contract Research Organization：受託研究機関）が得意とする試験項目であることから、本事業で扱う試験項目からは外した。

表 4.1 の青字の試験は実施できることにより事業の強みになり得るが、分析装置が高額（数千万円から1億円強）で取り扱うために専門性が高い人材も要することから、本事業立ち上げ時の対象から外した。上記の理由で一部試験は本事業で実施しない選択（代わりに外部への再委託を想定）をしたが、AAV ベクターの品質試験法開発を十分に対応できる体制を構築できた。特に事業上重要と位置付けた試験法は、細胞を用いた試験（Cell Based Assay: CBA）である。感染価（TCID50）や自己増殖性ウイルス（rcAAV）のように遺伝子治療の品目に共通で実施を要求される試験や、開発品目の治療用タンパク質の活性や転写された mRNA や翻訳されたタンパク質を評価する試験がある（図 4.2）。CBA は開発品目毎に開発が必要となるアッセイであるが、高度な専門性を要することから一般的な CRO では実施が困難な試験項目である。そのため、非常に希少性が高く、付加価値も高い品質試験法開発が可能となる。

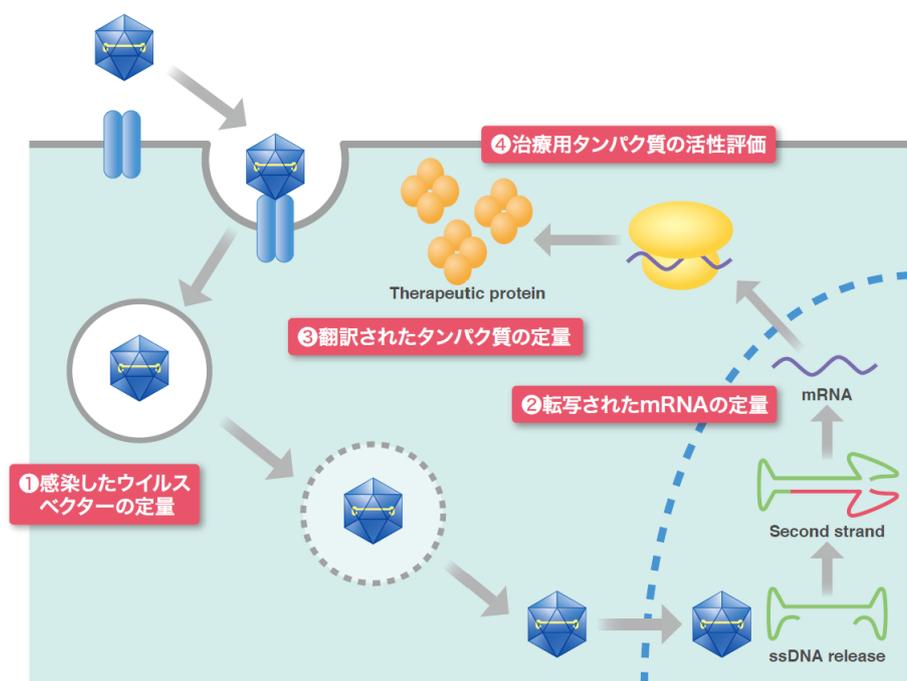


図 4.2. Cell Based Assay の模式図

開発した試験法を実際の遺伝子治療用製品の品質管理に利用するためには、GMP（Good Manufacturing Practice：医薬品の製造管理及び品質管理の基準）に適合した分析体制を構築

する必要がある。GMP に準拠した分析体制を構築するためには、設備管理、試験操作、人員教育、システムバリデーション等に関する標準操作手順書を制定し、品質保証体制を構築する必要があるが、施設の要件は GMP 製造ほど障壁が高くない。そのため、本事業においては Non-GMP の分析・試験法開発から、GMP 準拠のバリデーション・品質試験・安定性試験まで対応することとした。

4.2.2 製造プロセスに関する技術戦略

第3章に記載した通り、AAV ベクターの高額の製造コストは、開発パイプライン数の増大に伴い、遺伝子治療の普及に対する大きな阻害要因として問題が表面化した。本事業における新技術開発の方針は、「遺伝子治療用ウイルスベクターの製造コスト低減」という目的に絞り込むこととした。技術開発に成功すれば、プラットフォーム技術として多くの遺伝子治療用ウイルスベクターに適用できる。株式会社シンプロジェンが保有するコア技術 OGAB®法は、10 kb 以上の長鎖 DNA の合成を得意とすることから、その特徴が活きる技術開発に注力することとした。図 4.3 に代表例を示す（第3章に記載した統合型プラスミドが図中左）。Combi-OGAB®は、AAV ベクターの生産性が高い最適な遺伝子組み合わせを探索する方法である。Stable Producer Cell は、宿主のゲノムに AAV ベクターの産生に必要な遺伝子を組み込んだ細胞であり、製造バッチ毎に必要なとされたプラスミド DNA が不要となる。

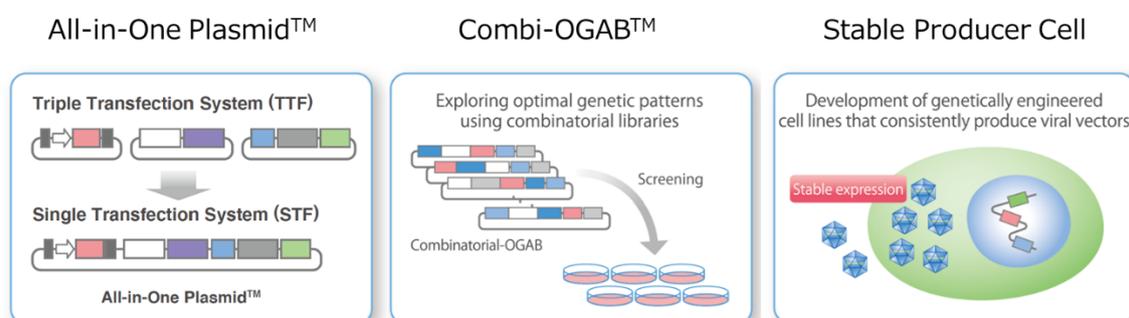


図 4.3. 長鎖 DNA 合成技術を活用した AAV ベクター製造用の技術開発

上記の技術および独自の DNA 合成技術は魅力的であるが、医薬品として社会実装するためには、医薬品の製造方法として適切な科学的妥当性に基づいたプロセス開発が必須となる。また、研究開発段階ではハイスループット性が高い設備を利用すれば十分だが、GMP 製造施設へ技術移管する場合、GMP 製造設備へ適切にスケールアップできる戦略も必要となる。本事業で対応する製造スケールについて図 4.4 に示した。製造プロセスの観点で、遺伝子治療用製品と抗体医薬品との大きな違いは製造スケールである。抗体医薬品では治験薬・商用製造に 1000 L 以上の培養装置（バイオリアクター）が利用されることがほとんどだが、遺伝子治療は被験者数が少なく局所投与であることも多いため、3 L のバイオリア

クターでも十分にウイルスベクター量を確保できる。本事業では、プロセス開発の対象を遺伝子治療用ウイルスベクターに限定するため、自社内で検討に用いるバイオリアクターは最大でも 50 L とした。また、プラスミド DNA は 10 L スケールまで対応できれば十分に原料も供給できる。スケールアップ戦略については、ラボスケールの製造装置を Scale Down Model として活用できるよう、酸素移動容量係数や単位体積あたりの攪拌動力等の化学工学的パラメータを取得する。併せて、実験計画法 (DoE; Design of Experiment) やシミュレーション技術 (CFD; Computational Fluid Dynamics) といったデジタル技術も駆使し、科学的妥当性に基づくスケールアップまで実施できる体制を構築する。

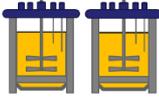
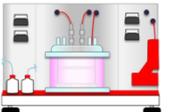
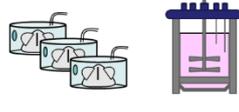
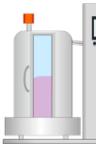
工程		技術開発	プロセス開発(ラボ)	プロセス開発(パイロット)
DNA	浮遊培養	 フラスコ	 ジャーファーマンタ 培養容積: 1, 3.75L(全容)	 ジャーファーマンタ 培養容積: 10L(全容)
	ウイルスベクター	 フラスコ	 固定床バイオリアクター 接着面積: 2.4m ²	 固定床バイオリアクター 接着面積: 10, 30m ²
	浮遊培養	 フラスコ	 シングルユースリアクター 培養容積: 0.05, 3, 10L(全容)	 シングルユースリアクター 培養容積: 50L(全容)
共通	下流工程	 超遠心、限外ろ過	 カラム精製、TFF 処理液量: ~15L	 カラム精製、TFF 処理液量: ~500L

図 4.4. 本事業のプロセス開発で利用する製造設備

4.2.1 で記載した通り、品質管理と比べて GMP に適合した製造は施設の要件が厳しく、実際に投与される薬を製造することから、GMP に適合した製造体制構築（文書整備、作業教育など）には、膨大な資本と人的資源の投入が必要となり障壁が大きい。さらに、品質試験についても同様ではあるが、GMP に違反する事態となった場合に事業継続が困難となるリスクもより大きいため、本事業では単独で GMP 準拠の製造は実施しないこととした。

4.2.3 技術戦略まとめ

品質試験法開発（品質管理）と製造プロセス開発（製造管理）それぞれについて、本事業で実施する活動と実施しない活動について、技術戦略として決定した。特に、医薬品業界に

において、GMP 準拠の活動を実施するかは企業として大きな方針決定となる。本事業において実施する①DNA 合成、②プラスミド DNA の製造、③ウイルスベクターの製造、④ウイルスベクターの品質試験の各活動に対して、GMP に適合する必要性があるかについて、表 4.2 に検討結果をまとめた。

表 4.2. 本事業の各活動に対する GMP 適合要否の検討結果

活動	Non-GMP	GMP	理由
DNA 合成	Yes	No	遺伝子治療用ウイルスベクターの製造において、本工程は GMP に適合する必要はない。
プラスミド DNA の製造	Yes	No	プラスミド DNA は医薬品原料に該当するため、GMP 適合は必須でない。
ウイルスベクターの製造	Yes	No	ウイルスベクターの GMP 製造は需要が高いが、体制構築に膨大な時間・投資が発生し、事業戦略の観点から望ましくない。
ウイルスベクターの品質試験	Yes	Yes	製造に比べ、品質試験については GMP 体制構築の障壁が低く、GMP 体制構築に投資する価値が高い。

①DNA 合成に対する GMP 適合：本事業には**不要**

DNA 合成の活動を GMP に適合させる場合、需要が生まれるモダリティは核酸医薬（アンチセンス、siRNA、miRNA 等）となる。核酸医薬は既に承認された医薬品も存在し、CDMO（受託開発製造機関：Contract Development & Manufacturing Organization）の需要はあるが、住友化学（株）、味の素（株）、ヤマサ醤油（株）、（株）日本触媒等の大手企業が参入しており競争は激しい。また、OGAB®法の長鎖 DNA 合成と核酸医薬との相性は悪く、導入済みの DNA 合成設備 (Non-GMP) は GMP 製造に利用できないため追加の設備投資が必要となる。よって、DNA 合成を GMP に適合させる価値はかなり低い。

②プラスミド DNA の製造に対する GMP 適合：本事業には**不要**

プラスミド DNA の製造を GMP に適合させる場合、需要が生まれるモダリティは DNA 医薬品（プラスミド DNA を直接体内に投与）となる。DNA 医薬品の開発を進める企業は世界的に少なく、モダリティの潮流としては DNA 医薬品から mRNA 医薬品やウイルスベクターを用いた遺伝子治療にシフトしているため、DNA 医薬品の需要は大きくない。一方、mRNA 医薬品やウイルスベクターの製造に用いる医薬品原料としてプラスミド DNA を製造する場合、GMP 適合は必須でないことから GMP に適合させるために投資する価値は低い（ただし、医薬品原料として十分な品質担保は必要）。

③ウイルスベクターの製造に対する GMP 適合：本事業には**不要**

遺伝子治療に用いるウイルスベクターの GMP 製造は、需要が非常に高い。しかし、GMP 製造の体制を構築することは、製造施設の確保、GMP システムの構築、GMP 適合設備の導入、各種標準操作手順書の整備、人的資源の確保と教育等、膨大な時間と投資を要することから、本事業において単独でウイルスベクターの GMP 製造に対応することは事業戦略的に好ましくない。

④ウイルスベクターの品質試験に対する GMP 適合：本事業で **GMP 体制を構築**

①②③については、製造に対して GMP の適合要否を検討したが、品質試験（分析）については、GMP 専用の製造用建屋を購入するといった巨額の投資は不要となるため参入障壁は低い。ウイルスベクターの GMP 分析は、過去に複数の製薬企業からも問い合わせを受けており、国内ではウイルスベクターを受託分析できる CRO も限られることから、本事業で GMP 体制を構築する需要は高いと考えられた。特に、高い専門性が伴う CBA を GMP 準拠で実施できる CRO は国内に存在しないため事業的価値も高い。

4.3 知財戦略

4.3.1 品質試験に関する知財戦略

第2章では、遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法開発に関する先端技術研究を紹介した。しかしながら、先端的な分析技術を遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法として利用することは、医薬品開発の観点においては重要であるが、既存の分析技術を品質試験に利用しているため発明的要素は少なく、相当に予測困難な効果が得られない限り特許出願は難しい。さらに、医薬品の品質試験法は世界的に標準化が求められるため、特許のような独占排他権とは相性が悪く、品質試験法開発に関する知的財産はノウハウとして扱う方が効果的と考えた。

品質試験法開発は、レギュレーションや業界動向が技術開発の方向性に大きく影響するため、技術研究を通じて収集した情報（ナレッジ）がノウハウとして蓄積し、組織全体の専門性が高まることから、コンサルティング的な事業価値が生まれる。さらに、欧米企業に多い知的財産の活用方法となるが、蓄積した試験法開発のデータに関して、科学論文、アプリケーションノート、セミナーの形態で公開することによって技術力の高さを外部に示し、営業材料として活用することができる。

受託開発の事業を進める上で、企業の専門性の高さを外部に発信することは非常に重要である。科学論文は Reviewer の査読の下に発刊されるので、科学的なインパクトも事業にとってプラスに働く。加えて、品質試験は様々な分析設備を扱うため、分析設備メーカーとの関係性は非常に重要である。先端技術研究を通じて得られた知的財産を活かして、メーカーと共催でセミナーを開催または共同でアプリケーションノートを発刊することで、効果が高い営業材料として活用することが可能となる。

4.3.2 製造プロセスに関する知財戦略

第 3 章では、遺伝子治療の製造コスト低減を目的としたウイルスベクター製造用プラスミド DNA の開発に関する先端技術研究を紹介した。製造プロセスに関する知的財産は、本事業の持続的競争優位にも繋がるため、特許として知的財産を活用することが非常に重要である。特に、新しく設計された合成 DNA は、物質特許として実施権を取得することも可能となるため、統合型プラスミドを中心とする堅牢な特許ポートフォリオを構築することが本事業の推進において重要と考えた。

最初に、統合型プラスミドの合成に用いた OGAB®法に関する特許について整理する。DNA 合成および OGAB®法に関する主な特許は、以下の 4 つとなる。

【第一世代 OGAB®法の特許（特許第 4479199 号）】

OGAB®法の基本特許で、枯草菌を用いて DNA 断片を集積する方法について請求項に含まれる。三菱ケミカル株式会社（旧三菱生命科学研究所）が出願人であったが、2017 年に株式会社シンプロジェンに譲渡された。

【第二世代 OGAB®法の特許（特許第 6440636 号、PCT/JP2014/073579）】

第二世代 OGAB®法は、集積する DNA 断片のサイズを統一し OGAB®法を行うことで、第一世代 OGAB®法の「作業者の熟練度によって合成の成功確度が大きく左右される」課題を解決した技術である。OGAB®法の商用化において非常に重要となる方法の特許である。元の出願人が慶應義塾大学で、高機能遺伝子デザイン技術組合に譲渡された後、2017 年に株式会社シンプロジェンに譲渡された。日本、米国、欧州、中国で登録済み。

【二本鎖 DNA の合成方法の特許（特願 2018-093024）】

OGAB®法で集積する DNA 断片を合成する技術について記載した方法の特許である。高 GC 含量、高 AT 含量の配列、繰り返し配列を含む複雑な DNA 断片であっても、本技術を用いて PCR を行うことで DNA 断片を合成できる。神戸大学から株式会社シンプロジェンに独占的実施権が許諾された。日本と米国に出願済みで、審査係属中。

【Combinatorial-OGAB 法の特許（特許 7101431、PCT/JP2020/013133）】

OGAB®法の応用技術に位置づけられ、長鎖のコンビナトリアル DNA ライブラリーを構築する方法の特許である。一度の反応で、効率的に多様な遺伝子パターンを含む DNA ライブラリーを構築できる。神戸大学から株式会社シンプロジェンに独占的実施権が許諾された。日本、米国で登録済み。

いずれの特許も株式会社シンプロジェンが DNA 合成事業を推進する上で重要な特許である。統合型プラスミドを含むウイルスベクター製造用プラスミド DNA は、OGAB®法を用い

て合成されることから、DNA 合成に関する特許は本事業を推進する上でも重要な特許となる。さらに、本事業では、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発・製造という領域において本事業の差別化を図るため、ウイルスベクターの製造に関する特許についても新たに出願し、より堅牢で質の高い特許ポートフォリオを構築する必要があると考えた(図 4.5)。

ウイルスベクターの製造技術(統合型プラスミド)に関する特許出願に向けて検討を進めるにあたり、2020年に外部の調査機関も活用し、先行技術調査とクリアランス調査を行った。結果、枯草菌を用いて構築したDNAを大量に調製し、ウイルスベクターの製造に応用した特許・公知文献は全く見つからなかったため、新規性に関する問題は生じ難いと考えられ、進歩性に繋がるデータ取得を中心に研究開発を進める事とした(第3章に記載の内容)。一方、特許クリアランスについては、AAVベクター自体が1980年代から開発がされており、製造の基盤となるトランスフェクション法や現在治療に利用されるカプシドの血清型に関する特許の多くが失効しているため、統合型プラスミドを用いてAAVベクターの製造を実施することが可能であると考えられた。また、枯草菌を用いて統合型プラスミドを構築することは、株式会社シンプロジェンに譲渡されたOGAB®法の特許が上位概念に該当するため、第三者の特許侵害の可能性は低いと考えられた。

2020年に、ウイルスベクター製造用DNAに関する知的財産として、方法と物の二つの特許出願(統合型プラスミドを含む請求項が含まれる)を行った。世界の遺伝子治療に関する技術開発のスピードおよび本事業の計画を考慮し、統合型プラスミドを用いて動物細胞からウイルスベクターの産生が確認された時点で両特許ともに国内出願(2020年11月)を行い、PCT出願までの1年間で実施例を追加する最速の出願戦略を取った。さらに上記二つの特許が公開される前に、統合型プラスミドの権利範囲を補強する目的で、2022年5月に新しい実施例(第3章に記載の内容一部)を加えて1件の特許を出願した。

【方法の特許：枯草菌におけるウイルスベクタープラスミド生産(特許7104263、PCT/JP2021/040410)】

枯草菌を用いてウイルスベクターの製造に必要なプラスミドDNAを合成・大量調製する方法に関する特許である。統合型プラスミドを構築する方法と合成したDNAを用いてウイルスベクターを産生する方法についても請求項に含まれる。日本で登録済み。

【物の特許：統合型プラスミド(PCT/JP2021/040411)】

枯草菌用プラスミドベクターに、ウイルスベクターの産生に必要な遺伝子を一つ以上挿入したプラスミドDNAに関する特許である。統合型プラスミドが含まれる請求項となっており、統合型プラスミドを含む細胞と産生されるウイルスベクターも請求項に含まれる。日本で登録済み。

【方法と物の特許：統合型プラスミドを補強する特許（PCT/JP2023/017131）】

統合型プラスミドを用いたシングルトランスフェクション法がトリプルトランスフェクション法よりもタイターが優れる実施例を複数加え、統合型プラスミドの権利範囲を補強した特許である。

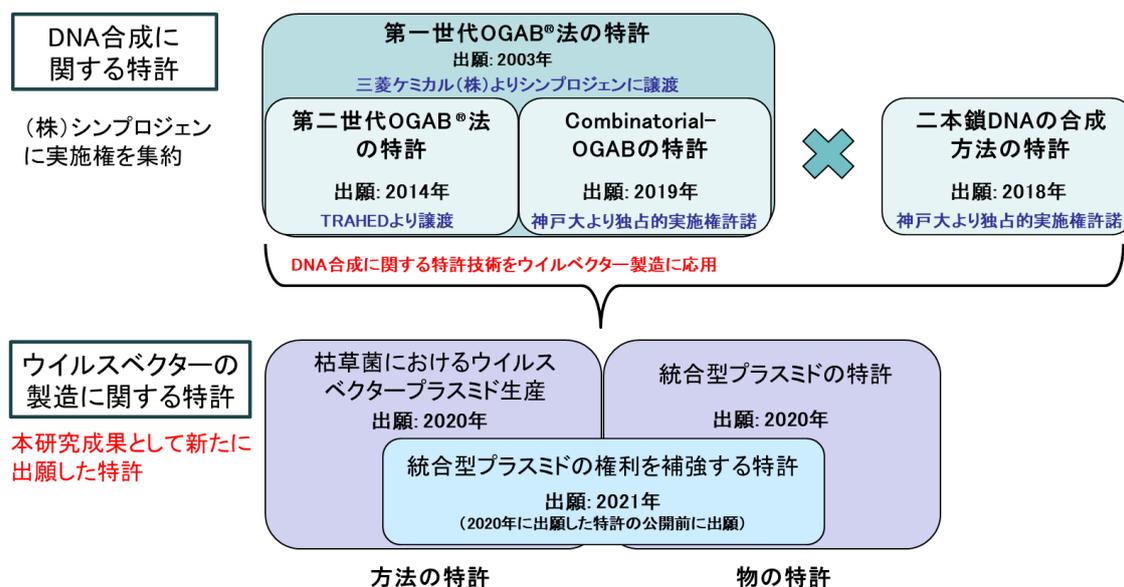


図 4.5. 株式会社シンプロジェンが実施権を保有する DNA 合成技術とウイルスベクターの製造技術に関する特許の関係

ウイルスベクターの製造に関する3つの特許（第3章記載の内容を含む）は、今後、株式会社シンプロジェンがウイルスベクター製造用のプラスミドDNAを開発する上で基本特許に位置付けられるため、出願時の請求の範囲はかなり広くなるようにして出願した。さらに、本研究範囲外の開発内容となるが、ウイルスベクターの製造に関する特許は、2022年5月以降も下記の通り継続して出願し、より堅牢なポートフォリオの構築を目指している（図 4.6）。

【Combinatorial-OGAB の応用：ウイルスベクター設計用途（PCT/JP2023/017130）】

Combinatorial-OGAB を用いて、ウイルスベクターの生産性を最大化できる最適な遺伝子の組み合わせを探索する方法に関する特許である。統合型プラスミドでライブラリーを構築することが請求項の範囲に含まれる。2022年5月に国内出願、2023年5月にPCT出願済み。

【独自の配列設計：新規のヘルパー遺伝子（特願 2023-013329）】

従来の TTF に用いる 3 種のプラスミド DNA および統合型プラスミドに、追加的に加え

ることで AAV ベクターの産生量が増大するヘルパー遺伝子に関する特許である。2023 年 1 月に国内出願済み。

【独自の配列設計：ITR/Rep 複合体（特願 2023-0223545）】

従来の TTF に用いる 3 種のプラスミド DNA および統合型プラスミドに含まれる AAV ベクターの ITR と Rep の組み合わせに関する特許である。2023 年 2 月に国内出願済み。

【独自の配列設計：ヘルパー遺伝子の発現制御（特願 2022-210794）】

ヘルパー遺伝子の発現を薬剤で制御することで Rep の発現を間接的に制御する方法と DNA コンストラクトに関する特許である。AAV ベクターの安定発現細胞株に応用する予定で開発した。2022 年 12 月に国内出願済み。

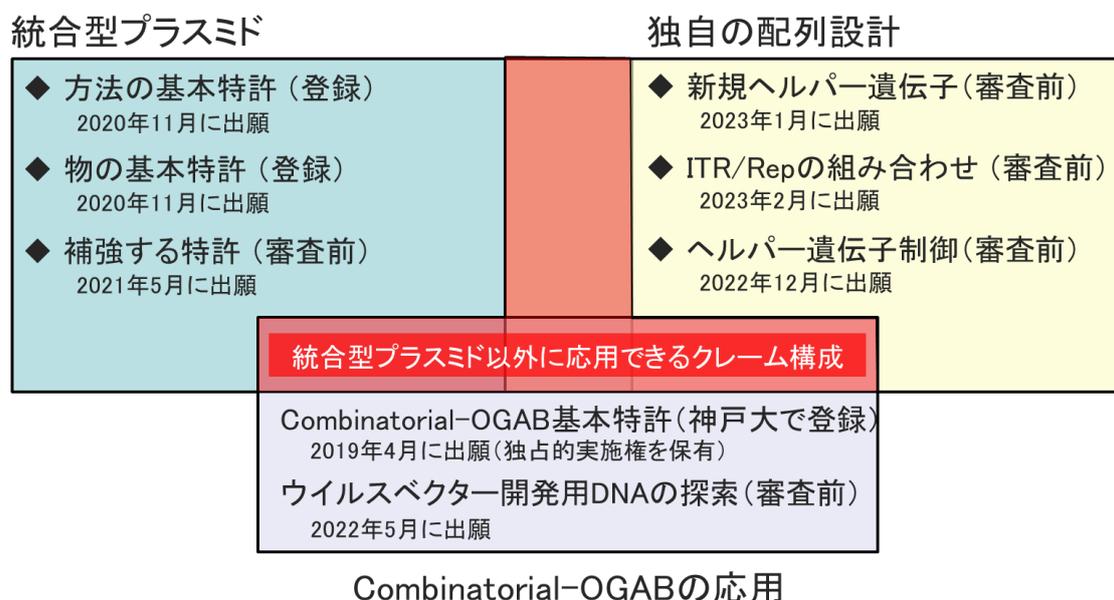


図 4.6. ウイルスベクター製造用プラスミド DNA に関する特許出願戦略

独自の配列設計や Combinatorial-OGAB の応用に関する特許については、本研究の成果である統合型プラスミドに限定する請求項とはせず、TTF 等の他の製造技術にも権利が及ぶように請求項を作成した。つまり、本事業で重要となる統合型プラスミドの権利範囲を補強するだけでなく、周辺の製造技術にも牽制可能なパテントポートフォリオを築けたと考えられる。さらに、OGAB®法（DNA 合成）に関する特許を含めて、各特許は出願から 20 年経過したものから失効していくが、本事業の活動の範囲において戦略的に継続して特許出願を行うことで模倣困難性を維持し、競争優位の状態を継続できる。

4.3.3 知財戦略まとめ

先端技術研究として実施した CMC に関する品質試験法開発と製造プロセス開発それぞれに対する知財戦略を検討し、知的財産の活用方法を表 4.3 にまとめた。

品質試験法開発に関する知的財産については、研究開発の内容から特許として活用することは難しいため、公開せずにノウハウとして本事業に活かす戦略をとった。具体的な知的財産の活用方法は、ノウハウとして公開せずに模倣困難性を高めることも考えられるが、コンサルティングや技術営業資料として活用し売上高の増大に繋げる方法も考えられた。

ウイルスベクター製造用のプラスミドDNAを含む製造プロセス開発に関わる知的財産については、特許として活用する戦略をとった。遺伝子治療に関わる本事業の領域において、独自技術の排他性を確保できるよう知的財産を活用し、競合企業との差別化に繋がる堅牢な特許ポートフォリオを構築した。さらに、特許技術を用いて製造された遺伝子治療用ウイルスベクターおよび開発された製造プロセスには特許権が及ぶため、顧客からライセンス使用料を貰うことにより売上高の増大に繋げることが可能となる。

表 4.3. 各技術プラットフォームに対する知的財産の活用方法

技術プラットフォーム	製造プロセス開発	品質試験法開発
主な知的財産の活用形態	特許	ノウハウ
事業における活用目的	排他性確保 技術ライセンス料の獲得	コンサルティング 営業資料（公開する場合）

製造プロセス開発および品質試験法開発に関する知的財産は、4.4 の事業戦略で説明する各種サービスを展開する上において非常に重要であり、本事業の収益構造の基盤となる。

4.4 事業戦略

4.4.1 外部環境分析

【遺伝子治療用ウイルスベクターCDMOの事業環境】

近年、医薬品業界では、創薬 - 開発 - 製造 - 営業と製薬企業の事業活動に必要な機能のモジュール化が進んでいる（図 4.7）。特に、新しいモダリティである遺伝子治療用製品の開発には、ウイルスベクターを製造・分析する設備や高度な専門性をもった人材を必要とするため、CDMO の需要が非常に高い。

第1章に記載した通り、2010年代半ばから、世界で遺伝子治療の開発パイプラインの数が著しい速度で増大した。その結果、急激に高まったウイルスベクターと原料のプラスミドDNAの需要に対し、CDMOの供給量が追いつかず、ウイルスベクターの開発・製造能力は世界的に不足した。2019年のレポートでは、CDMOが現在と同じペースでウイルスベクターの製造能力を毎年拡張しても2021年には供給量が追い付かなくなり、需要と供給の差は

年々拡大すると報告された¹⁾。

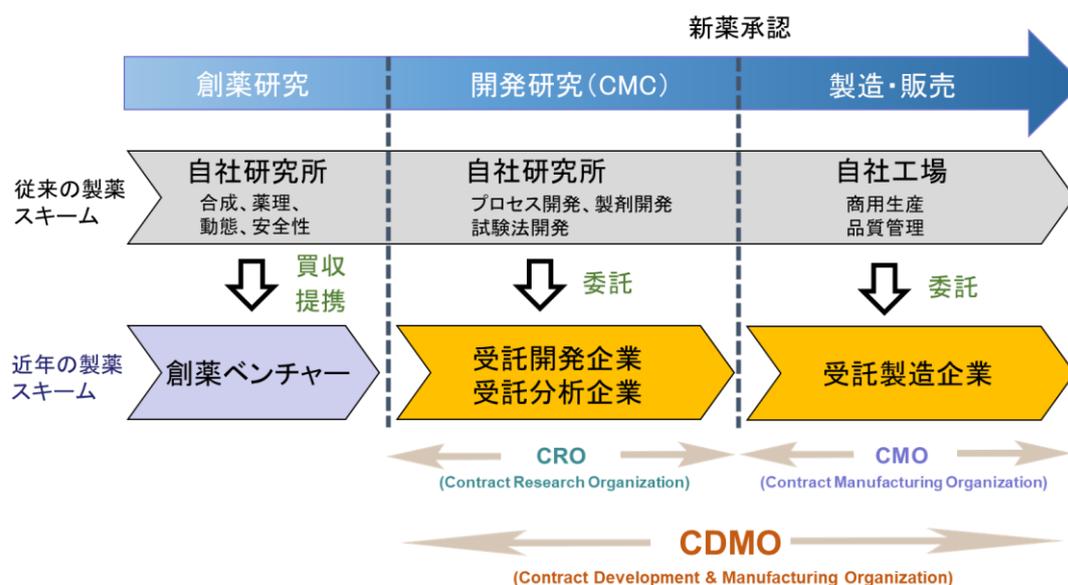


図 4.7. 製薬企業における事業活動の機能に関するモジュール化

このような状況に対応するため、欧米と中国企業を中心した CDMO は、2010 年代後半からウイルスベクターとプラスミド DNA の開発・製造能力の拡張を行った。また、従来は研究開発を中心に受託してきた CRO や他産業の大手メーカーが、外部から開発・製造能力を獲得し CDMO 事業に参入した。遺伝子治療用ウイルスベクターに対応できる代表的な CDMO・CRO を下記に記載した。また、世界の CDMO の分布図を図 4.8 に示した。

◆ Brammer Bio, LLC

2016 年に設立した米国のスタートアップ企業。バイオ医薬品の CDMO の経営経験のある Mark 氏 (Brammer Biopharmaceutical 社) と、大学で小規模だが 20 年のウイルスベクターの製造実績がある研究者 Richard 氏 (Florida Biologix 社) を、米国 VC が仲介し、両社を合併させる形で会社を設立した。2017 年 5 月に旧バイオジェンの抗体製造施設と倉庫を買収 (商用製造受託サイトとして利用)、2017 年 9 月にフロリダの製造能力を 2 倍 (初期臨床試験用受託サイトとして利用) する等し、開発・製造能力を急速に拡大した。結果、2019 年にウイルスベクター CDMO のトップ (年間売上 2.5 億ドル) まで成長し、Thermo Fisher Scientific に約 17 億ドルで買収された。

◆ Asklepios BioPharmaceutical, Inc. (AskBio)

2001 年に設立した AAV ベクターの技術プラットフォーマー。自社が独自に開発した self-complementary AAV やカプシドライブラリーを様々な治療薬に利用し、対症疾患毎に創薬ベンチャーをスピニングアウトさせた。さらに、Touchlight 社と提携し DNA 合成技術を、Synpromics

社を買収してプロモーター設計技術を獲得しており、AAV ベクターの技術プラットフォームを拡充している。Pro 10 という独自の AAV ベクターの高生産細胞株を構築しており、VC と協働で設立した VIRALGEN という CDMO に Pro 10 をライセンスしている。2020 年に Bayer に最大 40 億ドルで買収された。

◆ **Thermo Fisher Scientific Inc.**

ライフサイエンス・バイオテクノロジー分野における米国の巨大企業。2017 年に世界トップの CDMO である Patheon を買収する等して製造能力規模を拡大し、医薬品の CDMO 事業を展開している。2019 年に前述の Brammer Bio を約 17 億ドルで買収し、ウイルスベクターの CDMO 機能を獲得した。2021 年にベルギーの Novasep を買収し欧州にも製造拠点を取得し、さらに、cGMP 準拠のプラスミド DNA 製造施設を米国 Carlsbad に建設した。

◆ **Catalent, Inc.**

Thermo Fisher 傘下の Patheon と並ぶ世界トップクラスの CDMO の一つ。2019 年に遺伝子治療の領域で AAV ベクターの製造を牽引してきた Paragon を約 1.2 億ドルで買収し、ウイルスベクターの CDMO 機能を獲得した。

◆ **Lonza Group AG**

バイオ医薬の CDMO トップである Lonza は、2018 年に米国テキサス州に世界最大規模（約 2 万 3000 平方メートル）のウイルスベクター製造施設を建設した。また、外部研究機関と提携し、Anc-AAV という *in silico* のカプシド設計技術を提供する等、受託製造だけでなく新しい技術プラットフォームも獲得している。

◆ **Merck KGaA (Millipore-Sigma)**

ウイルスベクターの製造において長い歴史をもつ CDMO。1997 年に Roche と UC San Diego とのジョイントベンチャーとして設立した Molecular Medicine 社の製造サイトを獲得した。BioReliance という Testing service も展開しており、Virus Express 293 という AAV ベクター製造用のセルバンクをライセンス販売している。

◆ **Charles River Laboratories International, Inc.**

探索研究から製品開発まで製薬に必要な幅広い受託サービスを展開する世界トップの CRO である。2021 年 3 月に COGNATE を 8.8 億ドル、2021 年 5 月に Vigene を 3.5 億ドルで買収する事を発表した。COGNATE は 2020 年に Cobra biologics を買収しており、プラスミド DNA からウイルスベクターの製造まで対応可能である。Vigene は、探索研究用のウイルスベクターの作製サービスも展開しており、創薬段階から GMP まで対応可能なウイルスベクターを提供できる機能を獲得した。

◆ Aldevron, LLC

1998年に設立したプラスミドDNAに特化した米国のCDMOで、ウイルスベクターのCDMOの多くにプラスミドDNA原料を供給している。2016年からプラスミドDNAの製造能力を拡大しており、2021年にダナハーグループに86億ドルで買収された。

◆ VectorBuilder Inc.

2014年に設立した米国企業で、研究・製造拠点は中国広州市にある。先述したVigeneと同様に、探索研究用のウイルスベクターのパッケージングを行っており、研究用のツールとして低価格で幅広い製品を販売している。さらに、2020年にGMP施設を中国に新設しており、探索研究からGMP製造まで対応可能とした。

◆ WuXi AppTec

2000年に設立した中国企業であり、様々な受託サービスを展開している。WuXi Advanced Therapy社、WuXi Biology社など、サービス内容によって異なる会社が事業を進めており、スピンアウトした事業ユニットの一つが世界トップクラスのCDMOのWuxi Biologics社である。2022年に、TESSA™という独自のAAVベクター製造技術をもつOXGENE社を1.4億ドルで買収した。

◆ National Resilience, Inc.

2020年に設立した米国企業であり、設立時に8億ドルの資金を調達した抗体医薬、遺伝子治療、細胞治療等の新しいモダリティに特化したCDMOである。2020年のCOVID-19のパンデミックの際、迅速にワクチン製造ができなかった米国の状況を危惧し設立した企業である。2023年には米国国防総省から4億ドルの長期ローン融資を受けており、既存のバイオ医薬品製造施設を買収し、急速に製造能力を拡大している。

ここまでは、海外のCRO・CDMOを記載したが、近年、プラスミドDNAやウイルスベクターに対応できるCDMOが世界的に増大しており、市場の競争が激化している。日本企業の状況としては、代表的な下記4社が遺伝子治療用製品のCDMO事業に投資を続ける。

◆ 富士フイルム株式会社

2011年にMerck社から工場を買収する等し、バイオ医薬品のCDMO事業に参入した。2019年にテキサス州にウイルスベクターの製造拠点を構築するため130億円を投資、2020年に英国にウイルスベクターの製造拠点を新設、2021年にマサチューセッツ州にウイルスベクターの製造拠点構築のため40億円を投資する等、ウイルスベクターのCDMO機能を強化している。さらに、米国にバイオ医薬品の新拠点を設立するため、総額2000億円投資すると発表した。

◆ AGC 株式会社

国内にバイオ医薬（タンパク質）の受託製造施設を有するが、2016 年にミーバ社、2017 年に CMC バイオロジクス社を買収し、海外の CDMO の機能を拡張した。2020 年にイタリアの MolMed 社を買収しウイルスベクターの製造能力を獲得した。さらに、2021 年に Novartis 社が所有する米国のウイルスベクター用工場を約 100 億円で買収すると発表し、ウイルスベクターの CDMO 機能を拡張した。

◆ 株式会社カネカ

2010 年にユーロジェンテック社を約 40 億円で買収し、バイオ医薬品の CDMO 事業に参入した。プラスミド DNA の CDMO 機能を有しており、2015 年に製造能力を拡大する目的で投資を行い、2023 年にも、さらに約 20 億円投資し生産能力を拡大した。

◆ タカラバイオ株式会社

2014 年に、滋賀県に遺伝子細胞プロセッシングセンターを稼働させた。さらに、2020 年に 73 億円を投資し、新しい再生医療・遺伝子治療の製造施設を建築した。2020 年 3 月期の CDMO 事業の売上は 32 億円、2021 年 3 月期の売上は 43 億円と成長しており、2023 年には 2027 年に稼働を目指す新施設に 460 億円投資すると発表した。

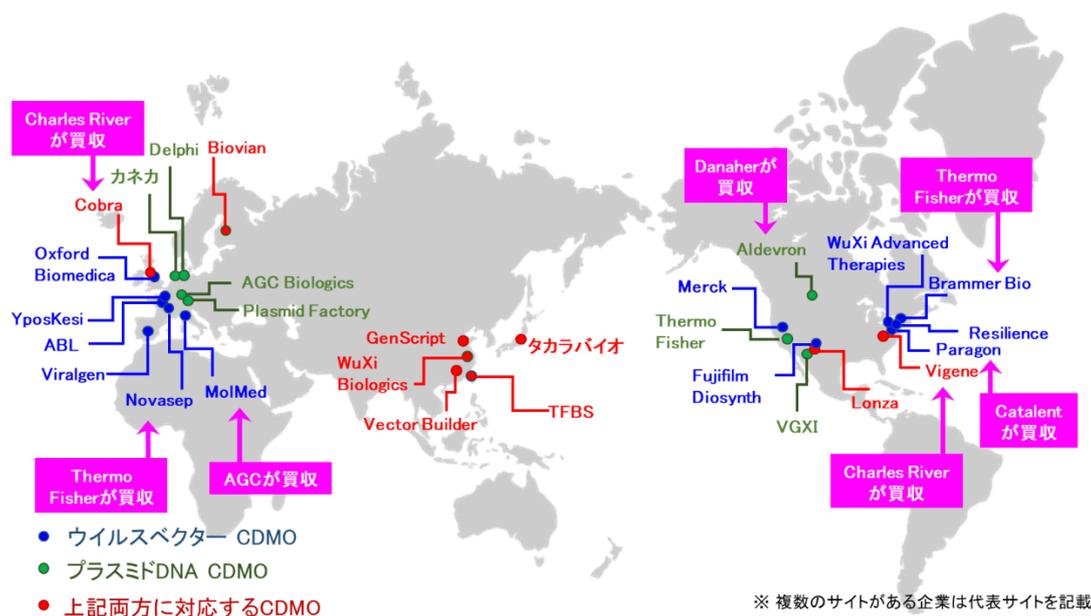


図 4.8. ウイルスベクターとプラスミド DNA に対応する代表的な CDMO（著者調べ）

図 4.8 から明らかな通り、ウイルスベクターとプラスミド DNA の CDMO は欧米に製造拠点を有している企業が多く、中国が追随する状況である。さらに、ThermoFisher 等の巨大企業が各社の買収を進め、さらなる事業規模の拡大をしている状況が分かる。日本企業も、

タカラバイオが国内に製造拠点をもち、富士フィルム、AGC、カネカのいずれもウイルスベクターは海外を主として製造している状況である。

【日本国内の事業環境】

図 4.9 に、国毎に実施された遺伝子治療の臨床試験数（2017 年）を示す²。試験数が多い国から、米国、イギリス、ドイツ、中国、フランス、スイスと続き、日本は7番目で世界の僅か 1.7%に過ぎない。このように、欧米に対して遺伝子治療の開発が圧倒的に遅れている日本だが、経済産業省のレポートには「国内の原料供給体制、製造受託体制の不十分さ」が、遅れの原因の一つとして記載されている³。また、バイオ小委員会の資料では「遺伝子・細胞治療製品については、大学やベンチャー企業が開発した技術シーズを産業化に結びつける役割を担える国内企業は極めて少ないことから、技術シーズを臨床及び製造レベルに結びつける橋渡し機能を担うプレイヤー（CDMO）の拡大が重要である」と国内における受託開発機能の重要性が述べられている⁴。

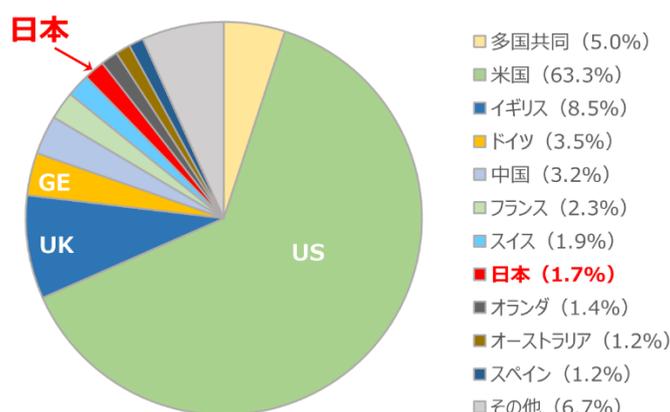


図 4.9. 2017 年に実施された国別の遺伝子治療の臨床試験数（文献 2 を基に著者が作成）

日本企業も海外の CDMO を利用しウイルスベクターの製造をすることは可能だが、国内の創薬ベンチャーへ実際にヒアリングした結果、海外に拠点を置く CDMO から提示される受託金額は、日本の資金調達規模を考慮すると非常に高額であると分かった。加えて、海外の CDMO にとって日本企業とのビジネス優先度は高くないため、製造スロットが空くまで 1 年以上待たされることも起きており、CMC 開発から臨床試験へ橋渡しできない事が、日本における遺伝子治療の開発のボトルネックとなっている（図 4.10）。さらに、海外の CDMO をコントロールするために必要となる実務的対応を考えると、特に、CMC 機能が整備されていない創薬ベンチャーでは対応が困難であり、多くのトラブルが生じると予測される。実務的負担の観点においても、遺伝子治療という新しいモダリティに対しては国内に CMC の受託開発を担う企業が存在することが重要と考える。

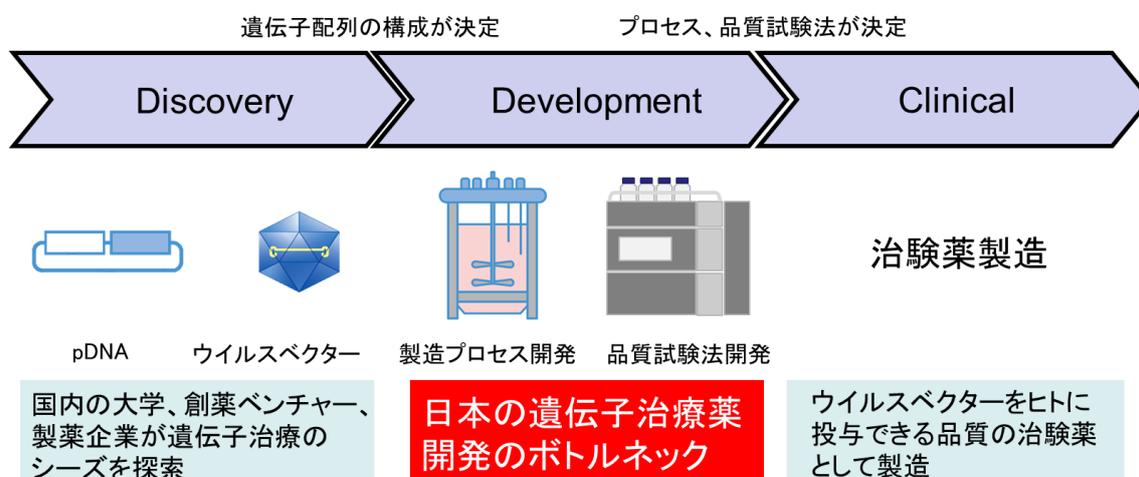


図 4.10. 遺伝子治療薬の開発スキームと日本のボトルネック

【PEST 分析】

2022 年以降のポストコロナ時代における遺伝子治療用製品の開発環境に対して、PEST 分析を実施した。医薬品開発は業界として規制の影響が大きく、遺伝子治療用製品についても同様となるため、規制の変化には常に注意を払う必要がある。2022 年以降の事業環境を考える上で、最も大きい変化はポストコロナという点だが、医薬品産業は景気の影響を受けづらいため、他産業に比べると影響は限定的と考えられた。ただし、ロシアのウクライナ侵攻の影響もあり、世界的不況の状況はバイオスタートアップの資金調達環境の悪化に繋がっているため注意が必要である。コロナ禍が遺伝子治療用製品の開発環境に及ぼした影響として最も大きい点は、ワクチンの国産体制構築に向けた潮流であろう。今後、ワクチンとしても利用されるプラスミド DNA やウイルスベクターについても国産化に向けて、産業支援や社会的要請が高まると考えられた。以下に、政治的要因 (Politics)、経済的要因 (Economy)、社会的要因 (Society)、技術的要因 (Technology) 毎に、詳細な分析結果を記載する。

Politics

- ◆ 医薬品開発は全般的に、開発国の規制内容や規制の変更による影響が大きく、事業計画や技術開発計画にも大きな影響を与える。特に、遺伝子治療は、他のモダリティと異なる薬価算定方法や承認の加速化が認められる国もあるため、薬価制度と承認制度が遺伝子治療の事業計画に及ぼす影響が非常に大きい。
- ◆ 日本では、コロナ禍においてワクチンを国内で製造できなかったことが問題となった。2022 年から 2023 年にかけて、ワクチンの国産化の体制強化に向けて、政府は公的資金を多く投入すること⁵を発表しており、今後、ワクチンにも利用されるプラスミド DNA やウイルスベクターの製造に対しても支援がなされることが考えられた。

- ◆ 日本では、遺伝子治療の開発・製造体制基盤が整備されていなく、欧米企業と比べて、大きな遅れをとっていることが問題となっている。2022年に、「遺伝子治療への投資」、「製品化に向けた研究開発」、「製造基盤強化」が新しい資本主義のグランドデザインに記載されており⁶、開発・製造体制の整備に向けて公的資金が多く投入されると考えられた。

Economics

- ◆ 米中が中心となり医薬品市場は世界的に成長しており、2025年には100兆円を超える市場規模にまで、成長する見込みである⁷。コロナの影響はあったものの、医薬品業界への影響は他の業界に比べると軽微である。一方、日本は先進国の中で唯一医薬品市場のマイナス成長が予測されており、薬剤費削減の動きが強く、低分子医薬品等の従来のモダリティは大きな市場成長は期待できない。
- ◆ 世界的に、遺伝子治療を開発する製薬企業やスタートアップは増加しており、2025年には3.8兆円、2030年には10兆円の市場規模にまで成長する見込みである。日本に限定しても、2025年には0.3兆円、2030年には0.5兆円と着実に成長を続ける見込みである⁸。
- ◆ コロナの影響で世界的に景気が大きく低迷した。コロナ禍では、投資家による投資先の選定基準も傾向が変わったため、ポストコロナ時代においてもコロナ前と投資傾向が変わる可能性がある。
- ◆ ロシアによるウクライナ侵攻により、世界的に市況が悪化した。さらに、シリコンバレー銀行やシグネチャー銀行等の著名な金融機関が経営破綻しており、資金調達環境が悪化している。

Social

- ◆ 世界各国で少子高齢化が進んでおり、特に日本では医療財政が圧迫され、財源確保が社会的課題になっている。特に遺伝子治療用製品は非常に高額であるため、保険制度に大きく影響する。
- ◆ 薬剤費削減のため、ジェネリック医薬品の使用が推進される。日本にも、革新的医薬品の価値が評価される仕組みはあるが、薬価改定が頻繁になされる等の問題も多い。日本市場の魅力自体が下がっており、海外製薬企業が開発する製品を日本で使えない『ドラッグロス』という問題が起こりつつある。
- ◆ 健康寿命など、社会全般的にヘルスケアへの関心が高まっている。特に、日本では、再生医療などの次世代医療に対する国民の関心度は高い。コロナ禍では、コロナワクチンの入手を海外に依存した状況に対しても問題視した。
- ◆ コロナの影響により国間や地域間の移動は大きく制限され、リモート会議が増えるなどとビジネススタイルも変化した。特に、従来、査察やネットワーキングなどの目的で

出張を前提にしていた業務も出張無しでも対応できるようになった。

- ◆ ロシアによるウクライナ侵攻、中国や北朝鮮による東アジアの国勢状況の不安定化により、サプライチェーンの不安定化や国家安全保障上のリスクが高まる。

Technology

- ◆ ウイルスベクターを用いた遺伝子治療用製品の開発品目数・承認品目数は年々増加しており、臨床試験データも蓄積されている。ヒトでの試験データの増大は、モダリティ全体の発展へと繋がるため、さらなる技術の発展が期待される。
- ◆ 合成生物学の要素技術であるゲノム編集、DNA 合成、バイオインフォマティクス、AI などの技術は発展を続けている。各ツール技術をバイオ医薬品開発に応用しようとする創薬ベンチャーやプラットフォーマーが、欧米を中心に出現している。
- ◆ 日本では、コロナの影響でライフサイエンス関連の消耗品が調達できない状況が続いており、同様に、バイオ医薬品製造に用いるプロセス資材も不足している。資材が入手できないためバイオ医薬品の製造遅延も生じており、コロナ禍以前よりも各種技術の国産化に向けた動きが活発になると考えられた。

【5F 分析】

ミクロの事業環境分析として 5-Force 分析を実施した。分析対象を 2022 年以降の世界の遺伝子治療用ウイルスベクターの CDMO 事業とした場合、需要はあるものの前述した通りウイルスベクターに対応する CDMO は増えており、「既存業者との競争」「新規参入の脅威」「買い手の交渉力」「売り手の交渉力」はいずれも非常に強いと考えられた。

そのため、対象とする事業環境を日本とし、日本における遺伝子治療用ウイルスベクターの CDMO 事業の外部環境に対して 5-Force 分析を実施した結果、「既存業者との競争」と「新規参入の脅威」については、他と比べると脅威が大きいと考えられた。日本市場では、今後のワクチン国産化に向けた潮流が、ウイルスベクターの CDMO 事業にとってプラスにもマイナスにも働く可能性があるため、世の中の動向をモニタリングし、事業環境に応じた適切な事業戦略を取る必要があると考えられた。以下に、詳細な分析結果を記載する。

既存業者との競争：中

- ◆ 世界的には既存 CDMO 間の競争は非常に脅威であるが、日本に限定した事業環境であれば、競合企業数は非常に限定的である。また、CDMO と称していても開発 (D) の機能が伴っていない企業もあるため、国内企業だけで考えると競争は弱い。
- ◆ 一方、国内製薬企業や創薬ベンチャーは海外 CDMO に委託する事も可能であるため、世界の競合企業も無視はできない。しかし、欧米の CDMO は非常に高額であり、日本市場に対して優先度が高くはないため、国内の遺伝子治療に対する投資規模に対して非常に高額である。ワクチン国産化に向けた世の中の流れが遺伝子治療用製品の国内

内製化にも追い風となり、日本の市場においては欧米 CDMO との競合の脅威は大きくないと考える。

- ◆ 中国 CDMO が非常に安価に受託可能な CMDO として台頭してきており、脅威である。しかし、中国の国際情勢的なリスク、配列情報などの情報漏出のリスクや医薬品品質のリスクが伴うため、競合としての脅威は弱まる。

新規参入の脅威：中

- ◆ 医薬品業界は初期投資が大きく、業界独自の経験や専門性を要することから、全般的に参入障壁は高い。特に、遺伝子治療用ウイルスベクターは、開発に高い専門性や専用の設備類が必要となるため、参入障壁がより高い。
- ◆ 一方、富士フイルムや AGC などの化学メーカーがライフサイエンスの領域に参入したように、他業種の大手企業の参入は無視できない。しかし、大手企業からすると日本の遺伝子治療の市場規模は大きくなく、市場としての魅力は小さい。
- ◆ ワクチン国産化に向けた世の中の流れが、国内の既存 CDMO がウイルスベクター生産に事業拡張することを後押しする可能性はある。しかし、日本はバイオ医薬品の CDMO がそもそも少なく、専門性が高いとは言えないため、既存 CDMO が単独一社で参入する脅威は大きくないと考えられた。

代替品の脅威：弱

- ◆ ウイルスベクター（主に、AAV ベクターと LV ベクター）による遺伝子治療は、一回の投与で疾病を完治できる可能性を秘めており、他のモダリティでは模倣困難な特徴を有する。この特徴は、ウイルスを用いない非ウイルスベクターによる遺伝子治療や mRNA 医薬では達成困難であり、ウイルスベクターはモダリティとして独自のポジショニングを築け、他のモダリティへの代替は困難である。
- ◆ CDMO 機能の代替としては製薬企業の自社製造が考えられたが、世界的にモジュール化が進む製薬企業のバリューチェーンにおいて、その機能代替が促進されるとは考えにくい。
- ◆ ゲノム編集や細胞医薬は既存の遺伝子治療の代替とはなり得るが、これらのモダリティにもウイルスベクターはツール技術として利用されるため、代替品としての脅威は小さいと考えられた。

買い手の交渉力：弱

- ◆ 製薬企業や創薬ベンチャーが開発する遺伝子治療のパイプライン数に対して、世界の CDMO の製造キャパシティは不足している。特に、日本の事業環境では CDMO の数が非常に少ないため、買い手の交渉力は弱い。
- ◆ 一度、CMC 開発から臨床試験に移行すれば、買い手は委託した CDMO を変更すること

に対して、品質が変動するリスクや変更後の品質担保に大きなコストが必要となるため、開発途中で CDMO を変更することは難しく交渉力は強くない。

- ◆ 買い手は海外の CDMO を選択することはできるが、前述の通り海外 CDMO にとって日本市場の優先度は低く、その委託費に対して日本の遺伝子治療への投資規模が小さく買い手は選択し難い。

売り手の交渉力：弱

- ◆ コロナ禍の影響で、世界的にプロセス資材は不足していたが、安定的に供給できる環境に戻りつつある。ウイルスベクターの原料やプロセス資材のサプライヤーは複数存在しており、CDMO は、開発段階で売り手を複数の選択肢から選択できるため、売り手の交渉力は強くない。
- ◆ 売り手が販売する製品の多くは医薬品用途以外に転用しづらく、売り手にとって CDMO は重要な顧客として位置づけられるため、交渉力は強くない。
- ◆ 多くのサプライヤーは海外企業であるため日本市場の優先度が低い。しかしながら、サプライヤーの多くは日本の営業法人を有しており、日本法人は日本での営業成果を求められるため、重要顧客である CDMO に対して交渉力は強くない。

以上、日本における遺伝子治療用ウイルスベクターの CDMO 事業に対する、環境分析結果を、図 4.11 にまとめた。

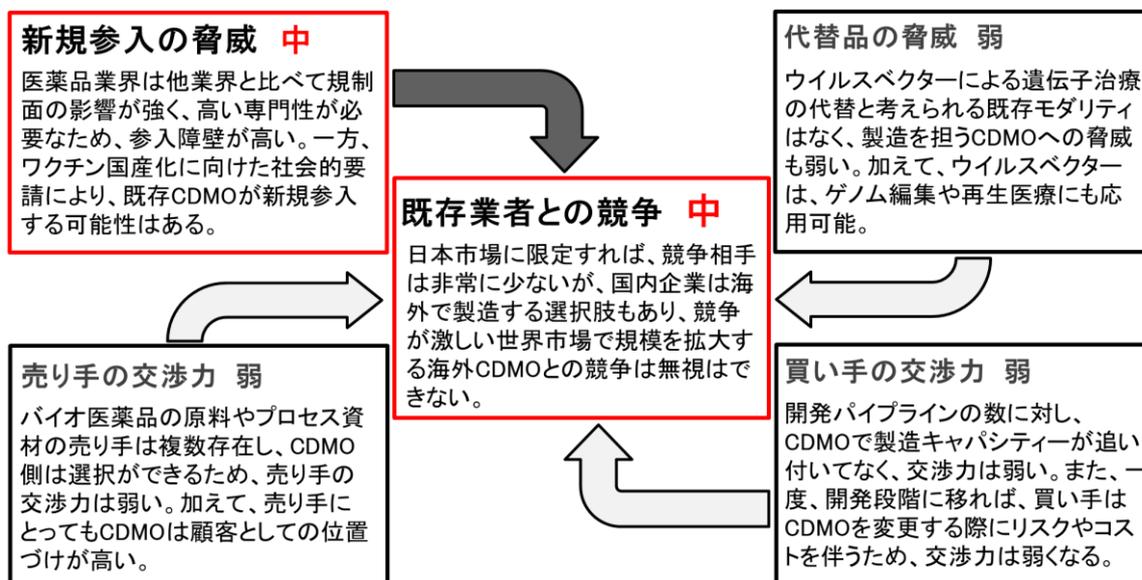


図 4.11.日本における遺伝子治療用ウイルスベクターの CDMO 事業に対する 5-Force 分析のサマリー

「新規参入の脅威」と「既存業者との競争」の力が他と比べると強いという結論となるが、それは日本の事業環境においてウイルスベクターに対応可能な CDMO が増えれば競争は激化することを意味する。現在、日本には遺伝子治療の製造や開発に対する支援を増強していく流れがあるため、今後もこれらの力が高まる可能性は高い。そのため事業戦略としては、他の CDMO との差別化をどのようにして構築するかが重要と考えられた。差別化を図ることができれば、売り手や買い手の交渉力もさらに弱まることに繋がる。

4.4.2 内部環境分析

本事業を実施する著者が所属する株式会社シンプロジェンの内部環境について、バリューチェーン分析と VRIO 分析を実施した。

【バリューチェーン分析】

株式会社シンプロジェンが本事業を行うために構築した DNA の設計から GMP 製造施設への技術移管までの一連のバリューチェーンを図 4.12 に示した。ウイルスベクターの原料はプラスミド DNA となるが、最初の活動としては、インフォマティクスと蓄積したデータを駆使し、合成する DNA を設計する【主活動①】。次に作成した DNA の設計図に基づき DNA を合成する。具体的には、DNA の構成単位である A (アデニン)、G (グアニン)、C (シトシン)、T (チミン) を 1 つずつ化学合成して連結する工程から始まり、合成した複数一本鎖 DNA に PCR を行い二本鎖 DNA 断片を複数個準備した後、OGAB®法にて DNA を環状化する【主活動②】。構築したプラスミド DNA は、プラットフォーム化された製造プロセスを用いて大量に調製される。具体的にはジャーファメンターを用いて培養し、精製カラムやフィルターを用いて精製を行う【主活動③】。大量に調製されたプラスミド DNA を原料として、ウイルスベクターの製造プロセス開発を行う。具体的には動物細胞用バイオリアクターを用いて培養条件、カラム精製装置を用いて精製条件の開発を行う。並行して、想定する治験薬製造の製造スケールに基づき、スケールアップに必要なデータを蓄積する【主活動④】。プロセス開発で得られたウイルスベクターは、品質試験法の開発にも利用される。具体的には、第2章で紹介した各品質特性に対して、適切な分析技術を適用し分析条件を検討する。さらに、設計された品質試験法は GMP 準拠の体制下でバリデーションを行う【主活動⑤】。最終的には、開発された DNA と製造プロセスを GMP 製造施設へ技術移管し、製造された治験薬および遺伝子治療用製品は、バリデーションされた品質試験法により品質管理される。

支援活動としては、人事労務、財務、経理、総務、購買などのコーポレート機能全般（経営管理）の活動【支援活動①】、主活動が生み出すバリューの事業化や顧客開拓を担う事業開発【支援活動②】、主活動の価値をより高めるために必要となる新しい技術開発【支援活動③】から構成される。

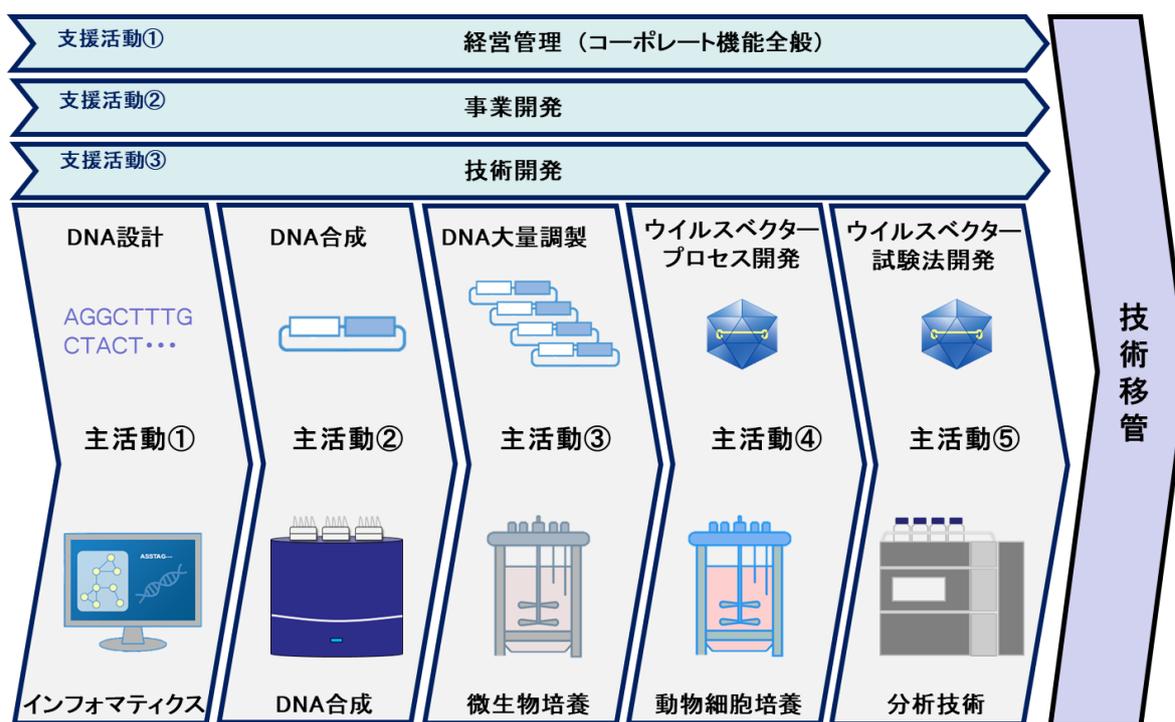


図 4.12. シンプロジェンのウイルスベクターの受託開発を構成するバリューチェーン

【VRIO 分析】

図 4.12 に記載した株式会社シンプロジェンのバリューチェーンを構成する各主活動に対して、VRIO 分析を行った (表 4.4)。

表 4.4. 日本を拠点としたウイルスベクターの受託開発活動を構成するバリューチェーンに対する VRIO 分析

主活動	V	R	I	O	競争状態
DNA 設計	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
DNA 合成	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
DNA 大量調製	Yes	Yes	No		一時的な競争優位
VV プロセス開発	Yes	Yes	No		一時的な競争優位
試験法開発	Yes	Yes	No		一時的な競争優位

*V：経済価値、R：希少性、I：模倣困難性、O：組織 VV：ウイルスベクター

外部環境分析の結果からも明らかな通り、大きく成長する遺伝子治療の市場において、ウイルスベクターの開発に必須となる全ての主活動は経済価値を有する。特に、日本では、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発を受託する企業は無いため、希少性も高い。つまり、競争優位性について分析する上で重要となるのは模倣困難性と組織基盤となる。以下、各活動に対する分析結果を記載する。

主活動① DNA 設計

ウイルスベクターは複数の遺伝子が相互作用し形成されるため、各遺伝子の組み合わせパターンは膨大に存在するが、配列情報とウイルスベクターの機能性（有効性、安全性、製造性）との関係性についてデータを蓄積することで、開発の質とスピードが向上される。データの蓄積は先行する事業者が圧倒的に優位となり、後続による模倣は難しくなる。加えて、神戸大学から独占的実施権の許諾を受ける DNA ライブラリー構築技術（Combinatorial-OGAB 法）や統合型プラスミドなどの特許技術を有することで、模倣困難性は高まる。

組織としては、統合型プラスミドの発明者である著者が組織の取締役を務めており、複数の博士号をもつ研究員がウイルスベクター製造用の DNA の設計と開発に取り組める状況である。技術開発の方針は「ウイルスベクターの製造コストと品質の改善」と明確であり、本資源を活用する組織基盤は整備されている。

以上のことから、DNA 設計の活動は持続的競争優位である。

主活動② DNA 合成

DNA 合成には、複数の独自技術（神戸大学と装置メーカーが共同開発した DNA 化学合成装置、神戸大学から独占的実施権許諾を受けている二本鎖断片を合成する PCR 技術、特許を保有する DNA 断片を集積する OGAB[®]法）を有しており、模倣困難性が非常に高い。加えて、これら技術を開発した発明者がシンプロジェンの取締役を務めており、ノウハウも豊富に存在する。また、独自の DNA 合成技術を保有するため、独自性が高い DNA の設計が可能となるため、両活動は戦略的フィットも形成している。

組織としては、前述のとおり、DNA 合成技術の発明者が組織の取締役を務めており、合成を担当する研究員達の多くは発明者の教え子や前職からの部下であり、DNA 合成を行う組織基盤は整備されている。

以上のことから、DNA 合成の活動は持続的競争優位である。

主活動③ DNA の大量調製

医薬品原料であるプラスミド DNA の大量調製と、そのプロセス開発には高い専門性を要する。株式会社シンプロジェンでは、収量が高く不純物が少ないプラットフォームプロセスを開発しているが、微生物培養と精製の製造方法の開発自体は、医薬品業界でバイオプロセス開発を経験した優秀な研究員がいれば活動できるため、模倣困難性は高くない。

以上のことから、DNA の大量調製活動は一次的な競争優位である。

主活動④ ウイルスベクターのプロセス開発

遺伝子治療用ウイルスベクターの製造プロセスを開発するためには、高い専門性を要する。株式会社シンプロジェンでは、収量が高く不純物が少ないプラットフォームプロセスを開発しているが、動物細胞培養と精製の製造方法の開発自体は、医薬品業界でバイオ医薬品

のプロセス開発（例えば抗体医薬など）を経験した優秀な研究員がいれば活動できるため、模倣困難性は高くない。

以上のことから、ウイルスベクターのプロセス開発活動は一次的な競争優位である。

主活動⑤ ウイルスベクターの試験法開発

遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法を開発するためには、高い専門性を要する。株式会社シンプロジェンでは、GMP 準拠の規格試験にも対応できる複数の分析法を開発しているが、ウイルスベクターを分析する技術自体は、抗体医薬などでも利用される市販の分析設備を購入できれば検討できるため、模倣困難性は高くない。

以上のことから、ウイルスベクターの試験法開発活動は一次的な競争優位である。

以上の分析結果より、株式会社シンプロジェンのウイルスベクターの受託開発事業を、バリューチェーン全体として持続的な競争優位の状態とするためには、DNA 大量調製以降の活動に対して模倣困難性を高め、経営資源を生かせる組織体制を構築する必要がある。全ての活動にて要素技術に関する特許を取得することでも全体的な競争優位性を高めることは可能だが、次に各活動間の戦略的フィットを考慮し、VRIO 分析を行った（表 4.5）。

表 4.5. 技術戦略および戦略的フィットを考慮したシンプロジェンのウイルスベクターの受託開発活動を構成するバリューチェーンに対する VRIO 分析

バリューチェーン	V	R	I	O	競争状態
DNA 設計	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
DNA 合成	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
DNA 大量調製	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
VV プロセス開発	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位
VV 試験法開発	Yes	Yes	Yes	Yes	持続的な競争優位

*V：経済価値、R：希少性、I：模倣困難性、O：組織 VV：ウイルスベクター

バリューチェーン全体を俯瞰すると、DNA の設計・合成の活動から遺伝子治療用ウイルスベクターの開発を一貫して対応できることは、事業を展開する上で大きな強みとなる。一般的に、自社で DNA の設計・合成の活動を実施している CDMO は無い。さらに、独自の技術開発を行う CDMO も稀であるため、独自技術を有することも競合との差別化においても重要な活動と考えられる。

DNA 大量調製とウイルスベクターのプロセス開発の模倣困難性を高くするためには、特許を取得した独自の DNA を医薬品製造に利用できるかが重要である。OGAB®法と統合型プラスミドという独自性が高い DNA 設計・製造技術と、技術開発という支援活動を社内にもつことにより、戦略的フィットが生まれ、DNA 大量調製とウイルスベクターのプロセス

開発の模倣困難性が高くなる。

組織としては、製薬企業で長年バイオプロセス開発を行ってきた研究員をリーダーとして採用し、ウイルスベクターの開発という領域に特化して製薬企業と同等の設備を投資することによって、各資源を使いこなす組織基盤を構築する。

ウイルスベクターの品質試験自体は分析設備があれば模倣可能であるが、試験法開発に用いるウイルスベクターを調達しなければ、開発は実施できない。ウイルスベクターは欧米や中国の企業から販売もされるが、購入費用とリードタイムを要し、企業によっては品質も粗悪で試験法開発に利用することが難しい。社内に製造機能を合わせ持つことで、ウイルスベクターを社内で調達でき開発期間の短縮に繋がる。CRO が行う受託分析活動とプロセス開発活動に必要とされる専門性は大きく異なるため、プロセス開発と試験法開発の両活動を合わせ持つことで模倣困難性は高くなる。

また、医薬品開発の目的でウイルスベクターの品質試験法を開発するためには、医薬業界に存在する規制や分析化学に関する高い専門性を必要とする。組織としては、製薬企業で品質試験法開発を経験してきた研究員を複数採用し、ウイルスベクターの開発という領域に特化して製薬企業と同等の設備を投資することによって、各資源を使いこなす体組織基盤を構築する。

最後に、株式会社シンプロジェンのバリューチェーンにおいて、最も模倣困難性を高い点は、全ての活動が同一施設に集約されていることである。個別の活動は模倣できたとしても、全ての活動が戦略的にフィットした状態で一施設に集約されていることで、競争優位の源泉となっていると考えられた。

4.4.3 事業環境まとめ (SWOT 分析)

株式会社シンプロジェンの SWOT 分析を行った (図 4.13)。さらにクロス SWOT 分析を行い、「日本を拠点とした遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業」の事業環境において、株式会社シンプロジェンの内部環境を活かす方向性についてまとめた。

強み × 機会

日本には遺伝子治療用ウイルスベクターを開発できるプラットフォームが整備されていないため、DNA 合成からウイルスベクターのプロセス開発・試験法開発まで同一施設で完結できるバリューチェーンを有することでプラットフォーマーになり得るポジションをとれる。競合が少ない環境において、先んじて基盤構築を進め国内市場の成長に備える。

強み × 脅威

DNA 合成からウイルスベクターのプロセス開発・試験法開発まで一施設内で完結できる

独自のバリューチェーンと統合型プラスミドなどの特許技術を活かしことで、海外 CDMO および既存の CDMO が新規参入しても差別化を図り、市場シェアを維持できるポジショニングを確立する。

弱み × 機会

売上としては小規模でも構わないので、製薬企業・創薬ベンチャーに独自技術とプラットフォームを利用してもらい、完遂してみせることで最初の実績を最速で示す。加えて、受託開発するモダリティや事業活動の選択と集中を徹底し、必要となる設備投資や人的資源を限定することで、短期間で基盤構築と事業計画を遂行する。GMP 製造施設や経験不足は、GMP 基盤をもつ企業と提携することで補填する。

弱み × 脅威

OGAB®法や統合型プラスミドの特徴や特許を活かし、既存の CDMO には獲得し難い独自性が高いウイルスベクターの製造に関するプラットフォーム技術を開発する。プラットフォーム技術は CDMO へのライセンスも可能なため、医薬品業界での実績や GMP 製造施設の有無に関係なく事業を推進できる売上基盤を構築する。

<p>Strength(強み)</p> <p>OGAB®法を有する事で、従来合成困難な配列をもったDNAを合成可能</p> <p>DNA合成からウイルスベクターのCMCまで同一施設で一貫して対応</p> <p>統合型プラスミド等の特許技術</p>	<p>Weakness(弱み)</p> <p>実績が重要視される医薬品の業界における、経験・実績不足</p> <p>ベンチャー企業である故、投資できる設備や人的資源には限界あり</p> <p>GMP製造施設を自社でもたない</p>
<p>Opportunity(機会)</p> <p>日本でウイルスベクターの受託開発を行える企業数は限定的</p> <p>遺伝子治療の創薬支援と国内製造体制構築に向けて、国も大規模な予算で支援</p>	<p>Threat(脅威)</p> <p>ウイルスベクターに対応可能な海外CDMOの増加(特に、中国拠点のCMDO)</p> <p>国内の既存CDMOがウイルスベクターにも対応し、新規参入する可能性</p>

図 4.13. 日本における遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業に関する外部環境分析と内部環境分析のまとめ (SWOT 分析)

一連の分析の結果、遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業に対して、日本の事業環境は良好な状態と考えられる。しかし、本事業環境は長期間続くとも限らないため、好機となる時期を逃さないよう、研究開発および事業活動の領域を絞りこみ、短期間で事業開発体制を構築することが重要であると考えられた。加えて、シンプロジェンが持続的な競争優位の状態を築くためには、OGAB®法の特徴を活かした独自の技術開発と DNA 合成からウイルスベクターのプロセス開発・試験法開発まで対応可能な一貫した開発体制（第2、3章に記載した先端技術研究がプラットフォーム技術として活用）が重要となる。

4.4.4 事業化に向けた戦略

本事業（遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業）の活動範囲の選択と集中

SWOT 分析から得られた知見として、事業活動の選択と集中が本事業を進める上で重要であると示唆された。最初の選択として、取り扱うモダリティは先端技術研究でも取り扱った AAV ベクターに決定した。まずは、AAV ベクターに集中して研究開発および事業開発の基盤を構築し、構築に見通しがついた時点で他のモダリティにも展開を図る（例えば、レンチウイルスベクター、mRNA など）。

続いて事業活動としては、市場が成長する遺伝子治療の領域に集中する。特に、事業の立上げ期は日本の市場開拓を中心に進める。ベンチャー企業は日本の市場規模においても利益を得ることが可能だが、大手企業にとっては市場規模が小さく参入しづらい。ベンチャー企業がいち早く医薬品業界において実績をつくるために、日本市場も重要である。

さらに具体的な事業活動の選択としては、4.2 の技術戦略にも記載した通り、GMP 製造は株式会社シンプロジェン単独では実施しないこととした。GMP 製造は単に施設や設備の投資が必要だけでなく、文書の整備や人員の教育に長い時間を要する。事業環境分析から得られた知見として、事業立上げのスピードが本事業において重要と記載したとおり、事業戦略の観点からも、GMP 製造を株式会社シンプロジェン単独で実施することは適切でない。

より事業戦略を洗練するため、ベンチマーク企業として Brammer bio 社(CDMO)と AskBio 社（技術プラットフォーマー）の活動を並べて、事業戦略を検討した（各企業のプロフィールについては 4.4.1 を参照）。

- 1) Brammer bio は、起源となる大学で蓄積したナレッジを最速で事業に活用するため、VC から大規模な資金を調達し、製薬企業の工場を人員ごと買収し、急速に製造能力を拡張した。現在は Thermo Fisher に買収されたが、新しい独自技術を開発している様子は無く、プロセス開発以降の受託開発と製造の事業活動に集中している。
- 2) 一方、AskBio は、技術開発のみに特化している。創薬シーズがあれば自社の技術を導出するとともに新会社としてスピンアウトさせ、製造については VC や事業会社と協働で CDMO を設立し自社の技術を導出している。加えて、プラットフォーム技術については企業買収や技術導入を積極的に行っている。

株式会社シンプロジェンは、独自技術の開発に強みをもつため、AskBio に近い戦略が適していると考えられた。しかしながら、日本の事業環境を考慮すると、CDMO を設立するために、バイオ医薬品工場の買収や工場新設に必要な資金をVC や事業会社から調達することの障壁は高い。また、その後の体制構築にも長い時間と工数を要するため、GMP 製造の事業活動については、既に GMP の基盤を有する CDMO と戦略的パートナーシップを締結し、戦略的パートナーに技術移管する戦略が最も適していると考えた（図 4.14）。パートナーの CDMO は単なる顧客の紹介先だけでなく、統合型プラスミドの技術導出先候補という関係性も築ける。4.4.1 に記載したが CDMO 同士の競争も激化しており、外部から独自技術を獲得している例も少なくない。例えば、WuXi は OXGENE 社、Cytiva は CEVEC 社を買収し、独自の AAV ベクターの製造技術を獲得している。本事業において GMP 製造をしないという選択は、技術開発・CMC 開発に集中することができ、プラットフォーム技術の開発とスケールアップ研究を加速化に繋がる。

本事業のバリューチェーンについて、顧客（製薬企業、創薬ベンチャー）と戦略的パートナー（CMO、CDMO）の担う活動も含めて図 4.15 に示した。

企業名	技術開発	CMC開発	GMP製造
Brammer Bio	No focus	集中 製薬企業のバイオ医薬工場を買収し急速に拡大	集中
AskBio	scAAV Capsid/Promoter Pro10™(細胞)	VCと協働でCDMOを設立し 開発した技術をライセンス	
シンプロジェン	OGAB® Combinatorial-OGAB 統合型プラスミド	製造プロセス開発 品質試験法開発	CDMOと戦略的に 提携し技術移管

図 4.14. ベンチマーク企業と本事業の戦略比較

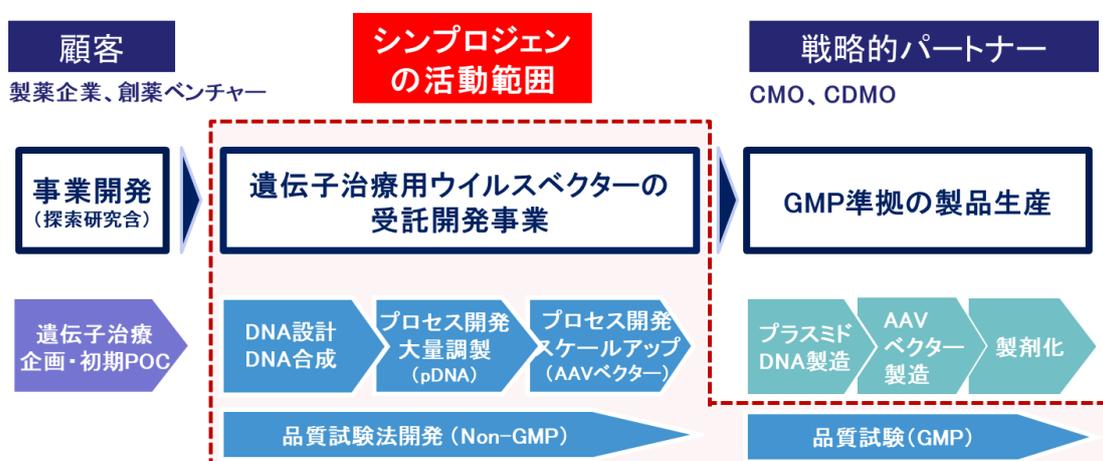


図 4.15. 関連企業を含めた本事業のバリューチェーン

全体的なバリューチェーンの流れと各活動を説明する。

- 1) 顧客は創薬に関する活動を行う。ウイルスベクターを用いて発現させる治療効果をもつタンパク質を探索するため、薬理試験、薬物動態試験、安全性試験などの活動が生じる。さらに適応を目指す疾患に対して、事業性評価、競合分析、開発プラン策定などの事業開発や臨床開発の活動が必要となる。
- 2) 株式会社シンプロジェンは顧客より開発の依頼を受ける。顧客の創薬ステージの状況にも依存するが、プロモーター、カプシド、製造性に関わる ITR や Rep 遺伝子の組み合わせを選択し、統合型プラスミドを設計・合成する。顧客によってウイルスベクターの創薬コンセプトが確認された場合、同一施設内でそのままプラスミド DNA とウイルスベクターの CMC 開発（製造プロセス開発、品質試験法開発）に進むことが可能となる。
- 3) CMC 開発を通じて製造されたウイルスベクターを用いて、顧客によって各種の非臨床試験で有効性と安全性が確認されれば、戦略的パートナー（CMO、CDMO）に製造プロセスの技術移管を進める。戦略的に提携したパートナーを利用することで、技術移管の迅速化にも繋がる。また、開発した品質試験法については同一施設内でバリデーションまで可能であるため、GMP 製造施設で製造されたウイルスベクターの規格試験を速やかに実施できる。

製薬企業の Ultragenyx 社は、自社の開発パイプラインの製造に用いる独自の AAV ベクター製造用細胞株を開発しているが、CMO を有効的に活用し、CMO に技術移管し GMP 製造を実施している（図 4.16）。

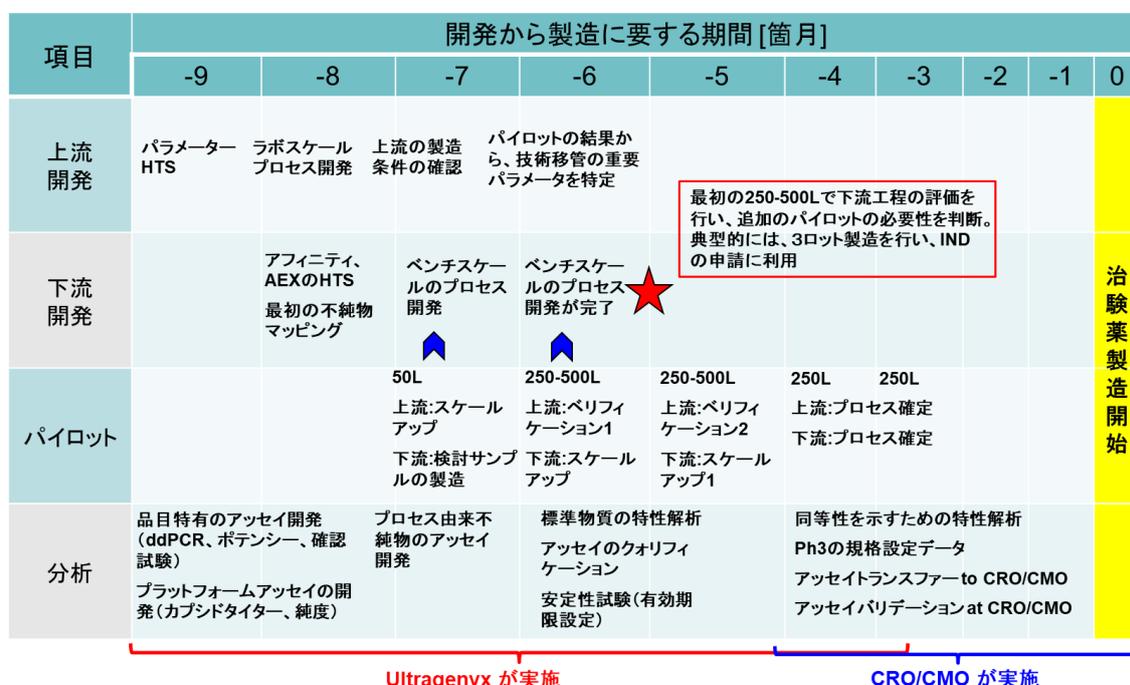


図 4.16. Ultragenyx 社の CMC 開発戦略とタイムライン（Bioprocessing Summit 2021 で同社が発表した内容を基に著者が作成）

開発着手から治験薬製造まで9ヵ月という短いリードタイムが引かれていることから、洗練されたCMC開発戦略が構築されており、技術移管先であるCMOとも戦略的な提携をしている可能性が高いと推察された。

顧客である製薬企業にとって、開発スピードは事業性にも大きく影響するため非常に重要である。第3章にて、統合型プラスミドの効果として製造コスト低減を挙げたが、統合型プラスミドはプラスミドDNAの製造バッチ数を削減できるため、pDNAの調達に必要なリードタイムの短縮にも繋がる。さらに、本事業では、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発という活動に集中することで、遺伝子配列と製造プロセスに関するデータが効率的に蓄積され、さらなる開発リードタイムの短縮も期待される。

提供するサービス

事業活動の範囲を定めたので、具体的に顧客に提供するサービスを検討した。図4.17に株式会社シンプロジェンが提供するサービスと4P分析の結果をまとめた。本事業におけるサービスの対象とする主たる顧客セグメントは、日本の製薬企業と創薬ベンチャーとなる。記載したサービスの対価に加えて、統合型プラスミドなどの特許技術を用いたFeasibility Studyの費用やライセンス料が本事業の収益構造となる。

サービス	Product	Price	Place	Promotion
プロセス開発 研究用ベクター	探索研究に使う ウイルスベクター を納品	日本、米国の競合 企業より低価格	自社施設で製造し、 顧客へ直接発送	販売代理店、 提携する事業会社 ウェビナー
プロセス開発 CMC開発	製造プロセスを開 発し、報告書を納 品	海外CDMOより低 価格	自社施設で開発し、 顧客へ直接発送	自社営業、 戦略的パートナー
分析サービス Non-GMP	分析試験法を開 発し、報告書を納 品	海外CROより低 価格	自社施設で分析し、 顧客へ直接発送	販売代理店、 提携する事業会社、 ウェビナー
分析サービス GMP	GMP適合の分析 試験を実施し、報 告書を納品	海外CROより 低価格	自社施設で試験し、 顧客へ直接発送	自社営業 戦略的パートナー

図4.17. 本事業で提供するサービスに対する4P分析

①プロセス開発（研究用ベクター）

主に製薬企業や大学で行われる探索研究用にウイルスベクターを提供するサービスとなり、薬理評価や安全性評価に利用されるウイルスベクターを作製し顧客に提供する。探索研究段階では、ウイルスベクターの性能を決めるカプシドやプロモーターの遺伝子配列が決まっていないため、評価に多くの種類のウイルスベクターが必要となり、複数回にわたり発注される。そのため、顧客に重要視される点は価格と納期であると考えられた。

予め製造した物品を販売するビジネスモデルでなく、顧客の要望に応じたカスタムメイドのウイルスベクターを提供する。海外のベンチマーク企業の価格を意識し、金額を設定した。売上単価も大きくないため自社の営業活動は最小限にし、販売代理店やウェビナー等を活用し、広く認知して貰えるよう営業活動を行う。

また、本サービスは、単体の売上規模は大きくないが、顧客を単価が大きいプロセス開発（CMC 開発）の受託獲得に繋げる役割も大きい。

②プロセス開発（CMC 開発）

探索研究を終えた製薬企業と創薬ベンチャーが主な顧客となる。開発を進めるウイルスベクターに対して、バイオリアクター、カラム精製、TFF（Tangential Flow Filtration）などを用いて治験薬製造を想定したプロセス開発を行う。また、プロセス開発に付随する製剤開発も実施する。開発したプロセスを報告書としてまとめ、戦略的パートナーが保有する GMP 製造施設への技術移管までを対応範囲とする。

海外 CDMO におけるプロセス開発の受託価格は数億円の規模になることもあり、本事業における設定価格は海外 CDMO より低価格とした。売上単価は十分に大きいため、トップも含めた自社営業を中心に顧客開拓を行う。加えて、本サービスの顧客は、戦略的パートナーの GMP 製造の売上獲得に繋がるため、パートナー企業にプロモーションを協力して貰う。

③分析サービス（Non-GMP）

探索研究を終えた製薬企業と創薬ベンチャーが主な顧客となる。各分析設備を利用し、顧客が必要とする分析内容（表 4.1 を参照）について、GMP 適応外（Non-GMP）で受託分析または品質試験法開発を受託する。

海外の CRO では、Non-GMP の試験法開発の場合は数百万円～1 千万円程度の単価設定であり、本事業では海外 CRO より安価な設定価格とした。単価も大きくないため自社の営業活動は最小限にし、販売代理店やウェビナーなどを活用し広く認知して貰えるよう営業活動を行う。

④分析サービス（GMP）

CMC 開発の後期または既に治験薬・商用製造をしている製薬企業が主な顧客となり、ウイルスベクターに関する GMP に適合した分析バリデーション、品質規格試験、安定性試験を実施する。Non-GMP 分析と比べて 10 倍以上の売上が期待できるため、トップも含めた自社営業を中心に顧客開拓を行う。加えて、本サービスの顧客は、戦略的パートナーの GMP 製造の売上獲得に繋がるため、パートナー企業にプロモーションを協力して貰う。

以上、創薬の開発ステージ毎に提供される 4 つのサービスを図 4.18 にまとめた。各サービスは個別の受託も可能だが、他のサービスとの間に売上のシナジーが生まれるようサー

ビスラインナップを策定した。例えば、プロセス開発（研究用ベクター）で作成したウイルスベクターを分析サービス（Non-GMP）に利用すれば、双方で売上が増大する。さらに、プロセス開発（研究用ベクター）を利用した顧客の創薬ステージが進めば、売上単価が大きいプロセス開発（CMC 開発）の顧客獲得に繋がる。開発が進み、特許技術が治験薬製造や商用製造に利用されれば大きなライセンス料の獲得に繋がる。

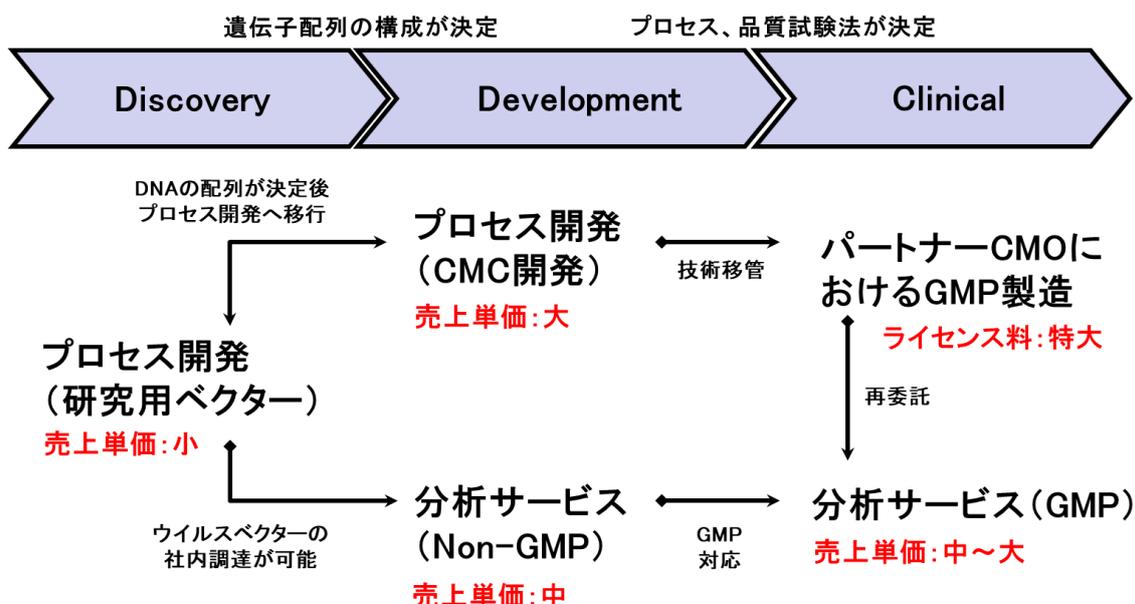


図 4.18. 本事業で提供するサービス間のシナジー

4.4.5 事業化に向けた計画

事業計画およびマイルストーン

本イノベーションアイデアは著者が2019年（博士後期課程1年生）の時に考案し、本事業計画は2020年4月（博士後期課程2年生）に株式会社シンプロジェンへ入社した際に策定した事業計画に基づき作成された。2020年以降の本事業における年次毎に設定したマイルストーンを表4.6に記載した。

表 4.6. 本事業の計画と年次毎のマイルストーン

事業年度	競争状態
2020年	ウイルスベクターの研究開発を実施できる施設・体制の構築
2021年	ウイルスベクターに関係する受託サービスで売上を計上
2022年	顧客の開発パイプラインに関する製造プロセス開発の受注
2023年	GMP分析サービスに関する受注
2024年	統合型プラスミドを利用した開発パイプラインが臨床試験入り
2025年以降	安定したCMC開発の受注と継続した技術導出の達成

2020年は、ウイルスベクターの研究開発体制（研究施設、研究設備、研究員）を構築し、会社内でウイルスベクターの実験に着手することをマイルストーンとし、2021年は、構築した実験系を利用して小額でも売上を生むことをマイルストーンとした。

2022年は、顧客の開発パイプラインに対するプロセス開発（CMC開発）の受託案件を獲得することをマイルストーンとした。並行してGMPの戦略的パートナーに目途をつけ、開発した製造プロセスをパートナーのGMP製造施設に技術移管できるよう準備を進めた。

2023年は、GMP分析サービスを受注することをマイルストーンとした。そのために、GMPに関する書類を制定し、施設内にGMP専用のエリアを構築することとした。

2024年は、統合型プラスミドを利用した顧客の開発パイプラインが臨床試験入りすることをマイルストーンとした。そのためには、2023年中に統合型プラスミドの評価を行う製薬企業やベンチャー企業と契約を完了する必要がある。

2025年以降は、CMC開発受託やGMP分析サービスを毎年一定数こなし、安定して収益を生み出せる状態へと成長させ、2027年には統合型プラスミドなどの独自技術による商用ライセンス収入が得られる事業計画となっている。

本事業に必要な設備投資計画

表4.7に設備投資計画の情報を記載した。

表 4.7. 本事業に必要な設備投資計画の概要

年度	分類	投資目的	投資設備内容
2020	分析	ラボ立上げ。作製したウイルスベクターを特性解析できる分析体制を構築	qPCR、dPCR、HPLC、MA-DLS、キャピラリー電気泳動、蛍光顕微鏡、プレートリーダー等
	プロセス開発	ラボ立上げ。フラスコスケールでウイルスベクターを作製できる体制を構築	安全キャビネット、CO ₂ インキュベーター、超遠心分離機、オートクレーブ、ジャーファメンター等
2021	分析	高度分析装置の導入により特性解析体制を拡充	熱安定性分析装置、Mass photometry分析装置、ゲルイメージャー、フローイメージング装置等
	プロセス開発	バイオリアクターの導入により、スケールアップに向けたプロセス開発体制を構築	ラボ用固定床バイオリアクター（2.4m ² ）、小型の攪拌槽型バイオリアクター（0.03L）
2022	分析	GMP分析サービスを実施できる体制構築	qPCR、dPCR、蛍光顕微鏡、プレートリーダー、CO ₂ インキュベーター、HPLC、NGS等
	プロセス開発	スケールアップに向けたプロセス開発体制の拡充	攪拌槽型バイオリアクター（～10L）、バイオセンサー、セルソーター、カラム精製装置、TFF装置等
2023	分析	特に無し	-
	プロセス開発	パイロットスケールの製造施設の立上げ	攪拌槽型バイオリアクター（～50L）、カラム精製装置、TFF装置等

本事業に必要な設備は、分析設備とプロセス開発用設備に大きく分類される。基本的には、前述した事業計画とマイルストーンに従い、年度毎に目的を定め投資設備を選定した。大規模な投資は、事業を本格的に立ち上げる 2024 年の前年（2023 年）までに完了させる計画である。

本事業に必要な人員採用計画

本事業に必要な職員の多くは研究員であり、前述した事業計画とマイルストーンに従い、年度毎にスキルマップや採用人数を決定した。研究員の配属先は、下記の 3 部署に分類され、各部署の職務分掌に従い必要なスキルを有した人材を探索した。

- DNA 開発部：統合型プラスミドなどの新しいプラットフォーム技術（独自の DNA や細胞）を開発する。技術導出に必要な Feasibility study に関する実務も担当する。遺伝子工学、分子生物学、細胞工学に長けた人材が好ましい。
- プロセス開発部：ジャーファメンター、バイオリアクター、カラム精製装置、TFF 装置を用いてウイルスベクターとプラスミド DNA のプロセス開発と受託製造業務を担当する。スケールアップ検討と GMP 製造施設への技術移管も担当する。生物工学、細胞工学、化学工学に長けた人材が好ましい。
- 医薬分析部：ウイルスベクターおよびプラスミド DNA の品質試験法開発と特性解析を担当する。GMP 分析サービスを担当することから、GMP の要件である品質管理担当者と品質保証担当者を設置する。

表 4.8 に本事業の人員採用計画を記載した。2020 年にラボが完成し、2021 年はラボの立上げと統合型プラスミドの開発が研究開発の大きなタスクであったため、DNA 開発の人員採用が主であった。研究開発が進捗し、本格的に CMC 開発のサービスを展開する状況となったため、2022 年よりプロセス開発と医薬分析の採用を本格化した。人員の採用は、事業を本格的に立ち上げる 2024 年の前年（2023 年）までに原則完了させる計画である。

表 4.8. 本事業に必要な人員採用計画の概要

分類	2020	2021	2022	2023
ユニット長	1	1	1	1
DNA 開発部	1	5	5	8
プロセス開発	0	2	6	9
医薬分析	0	3	7	8
ユニット合計	2	11	19	26

※ 数字は各部署の所属員総数を記載

4.4.6 事業戦略まとめ

外部環境分析の結果、イノベーションアイデアである「日本を拠点とした遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業」の事業環境において、競合企業の少なさや今後の国策が、本事業の推進においてはプラスの要因として働くと考えられた。一方、本事業環境は長くは継続しないため事業展開のスピードが重要であると考えられた。

限られた資源において事業の加速化を図るためには、事業活動の選択と集中が必要であり、事業戦略としては、本事業の事業範囲に下記に絞り込むこととした。

- 事業領域：遺伝子治療（まずは AAV ベクターから集中）
- 事業活動：配列設計、DNA 合成、CMC 開発、GMP 分析
- 創薬は実施しない → 顧客の製薬企業・創薬ベンチャーが企画も含めて実施
- GMP 製造は単独で実施しない → GMP 基盤をもった戦略的パートナーが実施

上記の選択と集中により、本事業の活動範囲である DNA の設計・合成からプロセス開発までのデータが効率的に蓄積され、遺伝子治療用ウイルスベクターの開発スピードは加速化される。

また、内部環境分析の結果、特許を保有する DNA の設計・合成に関する活動は持続的競争優位の状態だったが、CMC にかかる活動である DNA 大量調製、ウイルスベクターの製造プロセス開発、ウイルスベクターの品質試験法開発は模倣困難性が低く、一時的な競争優位の状態でしかないと考えられた。外部環境分析の結果、世界的にウイルスベクターに対応できる CDMO は今後増えていくと予測されたため、一時的な競争優位は好ましくないと考えられた。しかしながら、独自性の高い DNA 合成技術と DNA を有し、全てのバリューチェーンを物理的に統合された施設に集約することで、各活動に戦略的フィットが生まれ、バリューチェーン全体が持続的競争優位の状態になると分析した。

以上の戦略を基に、本事業にて展開するサービスを設計した。4つのサービスは、①プロセス開発（研究用ベクター）、②プロセス開発（CMC 開発）、③分析サービス（Non-GMP）、④分析サービス（GMP）であり、遺伝子治療用製品の開発ステージに応じて顧客に提案される。収益構造としては、これら4つのサービスに、統合型プラスミドなどの特許技術に関する Feasibility study の費用やライセンス料が加わる。

本事業は 2020 年から着手し始め、事業計画は 2028 年まで策定しているが、事業計画のマイルストーンに合わせて、段階的に設備投資と人材採用を行った。特に、本事業を本格的に展開し始める 2024 年の前年（2023 年）までに、設備投資と人員採用の多くを完了させる計画となっている。

4.5 財務戦略

財務計画背景

4.4に記載した本事業（事業を実施する株式会社シンプロジェンでは本事業を医療ビジネスと称しているため、以下医療ビジネスと表記）の事業計画は、2020年度期初の取締役会で初めて承認（2020～2024年の計画）された。以降、株式会社シンプロジェンの財務計画は、医療ビジネスと2019年度から稼働していたDNA合成ビジネスの二つ事業計画に基づき策定されている。

財務計画は定期的に見直しをしているが、医療ビジネスが稼働してから、大きくは4回の見直しを行っている。見直し時期は、2020年12月（年度末の定期見直し）、2021年9月（シリーズBファイナンスの前。2028年まで計画を策定）、2021年12月（年度末の定期見直し）、2022年12月（年度末の定期見直し）である。ただし、時期の見直しや予算額の変更はあったが、本論文に記載した医療ビジネスの事業計画の大枠については2020年度に策定した内容から大きな変更は無い。また、2022年度までは、表4.6に記載した年度毎のマイルストーンは達成している。

医療ビジネスは、2020年に遺伝子治療用ウイルスベクターの研究体制を構築するところから本格的に始まった。具体的には、体制構築のために研究施設の賃借料、研究設備の投資、研究員の採用・人件費などが必要となるため、これらのキャッシュアウトが2020年から生じ始めた。2021年と2022年は、各研究開発のタスクを達成すると同時に、サービスを受託できる体制を構築するために、表4.7、表4.8に示した通り研究体制の拡大に必要とする、多くの設備投資と研究員採用を行った。2021年と2022年ともに売上計上はできたものの、投資額や経費が大幅に上回りキャッシュアウトの方が圧倒的に大きかった。

2023年は、大きく年間売上を飛躍させるために必要な準備期間の最終年度となる。2022年までに実施してきた研究開発は順調に進捗しているため、2023年は事業をより拡大できるかが求められる年度と位置付けている。

2023年5月時点で、株式会社シンプロジェンに所属する人員は42名（常勤役員、契約・派遣社員を含む）で、内医療ビジネスユニットには25名所属する。売上高はまだ小さいが、製薬企業、創薬ベンチャー、その他大手企業と取引がある。

医療ビジネスの売上計画

医療ビジネスの売上計画に含まれる収益構造は、大きく下記の5つに分類される。売上計画の前提条件としては、サービス①～④対象とする市場は日本とした。

- ① プロセス開発（研究用ベクター）
- ② プロセス開発（CMC開発）
- ③ 分析サービス（Non-GMP）
- ④ 分析サービス（GMP）
- ⑤ 特許技術（Feasibility study、ライセンス）

プロセス開発はウイルスベクターの作製に関係するサービスだが、ベクターを作製し顧客に提供するサービスが「研究用ベクター」、治験薬製造に向けてプロセスの開発データを取得するサービスが「CMC 開発」に分類される。「分析サービス (Non-GMP)」は、研究開発用途で実施するの受託分析と品質試験法開発を指す。「分析サービス (GMP)」は、GMP に適合した品質試験の受託を指す (各サービスの詳細は 4.4.4 を参照)。

特許技術は、統合型プラスミドなどの特許技術の評価と使用料に関する売上である。ライセンス契約前に顧客が技術評価のために実施する Feasibility study (FS) の対価や、治験段階や承認後に発生する技術使用料が含まれる。

図 4.19 に、医療ビジネスの売上計画と収益構造のイメージ図を示す。

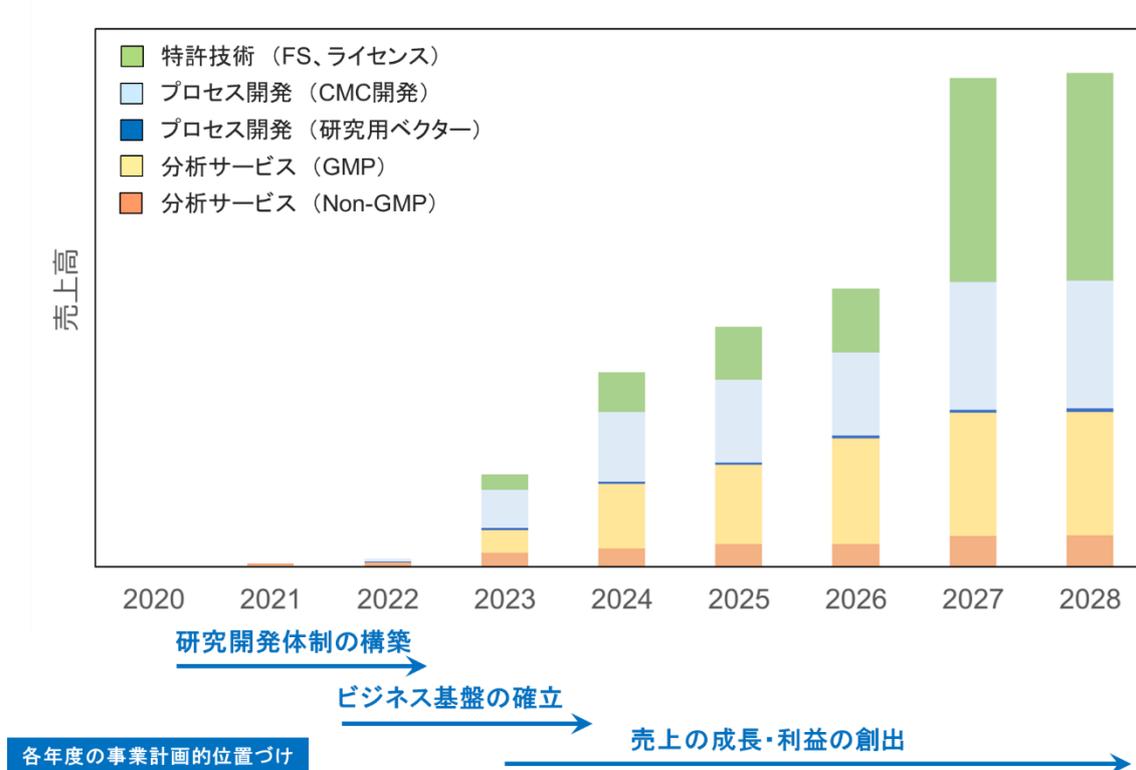


図 4.19. 医療ビジネスの売上計画と収益構造のイメージ図

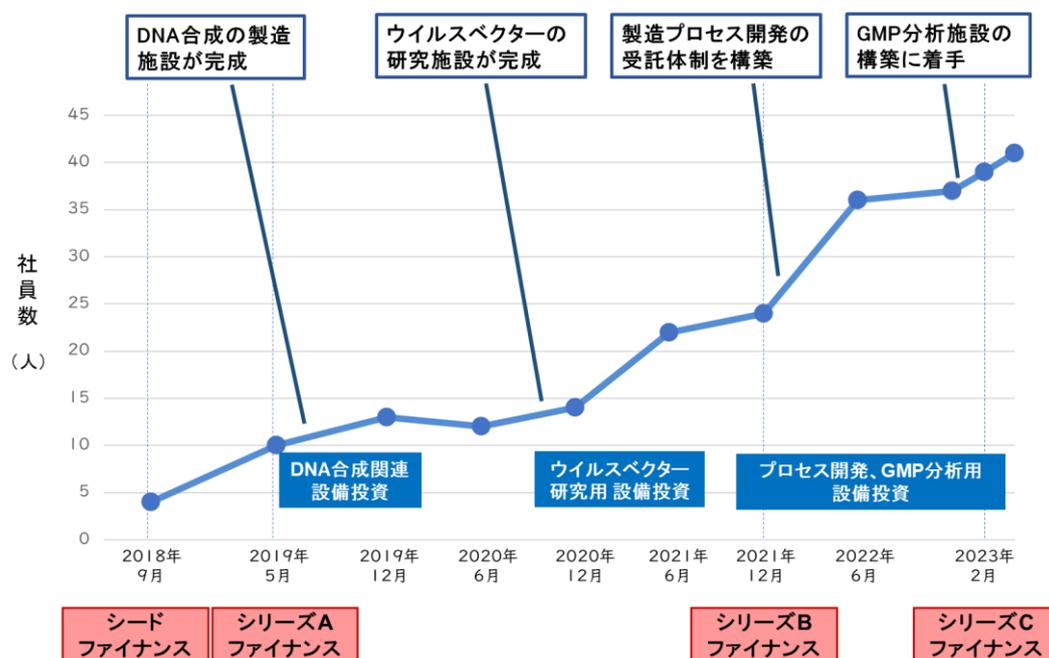
2021 年と 2022 年は、医薬品業界にサービスを提供し実績を作ることを目的とした。研究開発体制構築後に速やかに販売単価は小さい「プロセス開発 (研究用ベクター)」と「分析サービス (Non-GMP)」をサービスとして提供し、医療ビジネスとして売上を計上した。2023 年から 2026 年にかけて、CMC 開発基盤と GMP 体制がより整備されることで「プロセス開発 (CMC 開発)」と「分析サービス (GMP)」のサービスが本格的に立ち上がり売上成長を牽引する。特許技術は 2023 年から 2026 年にかけて、製薬企業・創薬ベンチャー・CDMO にライセンスしていき、2027 年以降に、特許技術を使用した遺伝子治療用製品が上市される

ことで大きなライセンス料を発生し、売上高が大きく増大する売上計画となっている。

売上計画の前提条件となる各サービスの価格は、日本でもサービスが使用できる海外の CRO や CDMO の価格設定を参考にし、特許技術に関するライセンス料は、類似した目的で開発される他社技術の使用料（例えば、統合型プラスミドであればバイオ医薬品の製造技術のライセンス料）を参考に設定した。また、顧客の開発パイプラインの臨床試験に要する期間や承認後の売上予測は、既に上市されている遺伝子細胞治療製品の情報を参考にして前提条件を定めた。

資本政策

株式会社シンプロジェンは 2017 年に設立後から 2023 年 6 月までに、第三者割当増資による資金調達を 4 回ほど実施した（図 4.20）。医療ビジネスの事業計画が影響した資金調達は、シリーズ B ファイナンスとシリーズ C ファイナンスが該当する。



※社員数には、正社員、常勤役員、契約・派遣社員、出向社員を含む

図 4.20. 資本政策と医療ビジネスの事業計画の関連

2018 年 9 月のシードファイナンスでは慶應義塾大学発のバイオベンチャーである Spiber 株式会社から 1 億円、2019 年 5 月のシリーズ A ファイナンスではベンチャーキャピタルの ジャフコ グループ株式会社から 10 億円ほど資金調達した。当時は DNA 合成ビジネスのみが事業計画として策定されていたため、DNA 合成技術 OGAB®法が大きく価値として評価されたと考える。主に DNA 合成に関する技術開発や DNA 合成受託を行う製造施設の構築

に活用された。

2020年に医療ビジネスが稼働したため、ウイルスベクターの研究開発体制を整備するため、さらなる資金調達を行った。2021年12月のシリーズBファイナンスでは、大手商社の双日株式会社をリード投資家とし6.7億円、シリーズCファイナンスでは、2022年12月には株式会社みずほ銀行をリード投資家として5.4億円、2023年2月には富士フイルム株式会社をリード投資家として9.2億円（シリーズC合計で14.6億円）ほど資金調達した。シリーズBファイナンスの時点では、統合型プラスミドを含めウイルスベクターの研究開発が大きく進捗していたため、CMC（製造プロセス開発、品質試験法開発）の受託体制を拡張すべく、研究員の採用と設備投資に調達した資金を活用した。

事業環境分析にも記載した通り、近年の国際情勢の不安定化や米国を中心としたバイオベンチャーの資金調達環境の悪化により、今後の資金繰りに見通しが不透明な部分はあるが、図4.19に示す通り、2024年以降は大きく売上が成長する事業計画であり、シリーズCファイナンスで調達した資金を活かして、より早く大きな黒字の事業へと成長させていく。

参考文献

1. Rininger, J., Fennell, A., Schoukroun-Barnes, L., Peterson, C., and Speidel, J. (2019). Capacity Analysis for Viral Vector Manufacturing : Is There Enough? *Bioprocess Int.* 17.
2. Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., and Abedi, M.R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J. Gene Med.* 20, 1–16.
3. 経済産業省 (2018). 平成29年度「我が国におけるデータ駆動型社会に係る基盤整備（「根本治療の実現」に向けた適切な支援のあり方の調査）報告書」。再生医療関連報告書.
4. バイオテクノロジーが拓く「第5次産業革命」 (2021). 産業構造審議会 商務情報分科会 バイオ小委員会.
5. ワクチン生産体制強化のためのバイオ医薬品製造拠点等整備事業 https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/vaccine_kyouka/dai2/siryoku2-5.pdf.
6. 内閣官房 新しい資本主義の グランドデザイン及び実行計画.
7. Aitken, M., Kleinrock, M., Simorellis, A., and Nass, D. (2019). The Global Use of Medicine in 2019 and Outlook to 2023.
8. Little, A.D. (2020). 国内外の開発動向分析・市場規模予測 海外政府の投資動向について.
9. ASGCT (2022). Gene, Cell, and RNA Therapy Landscape. Q4-2022.

第 5 章

結 論

5.1 本研究のまとめ

2010 年代から、医薬品業界では新しいモダリティとして、遺伝子治療が注目を集めている。体外から治療用遺伝子運び、発現したタンパク質が治療効果を生む治療方法である。従来の低分子医薬品や抗体医薬品では治療困難な疾患に対して、単回の投与で根治できる可能性を秘めた革新的な治療方法である。既に複数の上市薬が誕生しており、2030 年代には 10 兆円の市場規模まで成長すると予測される。

しかしながら、急激に増大する遺伝子治療の開発状況に対して大きな問題が生じた。多くの遺伝子治療にはウイルスベクターが利用されているが、バイオプロダクションにより製造されるウイルスベクターの供給可能性が、遺伝子治療の臨床試験に必要とされる需要に全く追いつかない状況が続いていた。そのため、2010 年代後半には、欧米と中国を中心に、多くの CDMO (Contract Development & Manufacturing Organization : 受託開発製造機関) がウイルスベクターの製造能力を増強するために、大規模な投資を続けた。ただし、この潮流は世界で起きたことであり、日本では未だにウイルスベクターの開発・製造基盤が整備されず、国内における遺伝子治療用製品の開発のボトルネックと考えられている。

遺伝子治療に用いるウイルスベクターを開発する上で重要となるのが、ヒトに投与できる品質を保証できるデータを取得することとなる。即ち、医薬品製造に利用できる製造プロセスを構築し、製造されたウイルスベクターを医薬品の品質試験として適切な方法で分析をしなければならない。このような医薬品の製品化および品質に関係する研究開発を CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) と呼ぶが、本研究では、世界的な問題として各研究機関が取り組む遺伝子治療用ウイルスベクターの CMC (品質試験法開発と製造プロセス開発) に関する研究課題に取り組んだ。

第 2 章では、遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法開発に関する研究について記載した。AAV ベクターの重要品質特性の一つとして、ベクターゲノム (VG) タイターが挙げられる。投与量としても表記される VG タイターの品質試験法に対して、先端的分析技術として注目されるドロップレットデジタル PCR (ddPCR) を適用する事を目指した。ddPCR は精度高く正確に核酸の絶対定量ができる優れた分析技術だが、医薬品の品質試験法として利用するためには、科学的妥当性に基づいた品質試験法を開発しなければならない。本研究では、ddPCR を用いて核酸定量を行う AAV ベクター検体の分析前処理の方法に着目し、前処理工程で行われる熱処理や添加試薬が、VG タイターの定量値に及ぼす影響について評価した。

AAV ベクター検体の前処理は、(1) DNase 処理、(2) DNase 不活化、(3) ssDNA の抽出、(4) PCR の 4 ステップで行われる方法が汎用されるが、各ステップでは検体に熱処理がなされる。これらの熱処理が ddPCR の定量値に及ぼす影響を評価したところ、DNase 不活化のステップで 55°C から 65°C 付近で加温することが、VG タイターの定量値に最も影響を及

ぼすことが示された。さらに、DSF (Differential Scanning Fluorimetry) を用いて、4種の AAV ベクターの熱力学的安定性を評価したところ、AAV ベクターから ssDNA が漏出する温度 (本研究では Tr として提唱) と、DNase 不活化で VG タイターの定量値が低下する処理温度が一致した。本実験で用いた AAV ベクターの Tr は、タンパク質の安定性の指標として利用される Tm (変性中点温度) よりかなり低い温度であったことから、開発を進める AAV ベクター製剤毎に Tr を把握し、Tr を VG タイターの品質試験法の前処理条件に関する設定根拠として活用することが望ましいと考えられた。さらに本研究では、Tr 付近での熱処理を避けるため、DNase 不活化と ssDNA の抽出を 95°C で同時に行う 3 ステップからなる前処理方法を、より操作が単純で頑健性の高い VG タイターの品質試験法を提案した。

第3章では、遺伝子治療用ウイルスベクターの製造技術として、ウイルスベクターの産生に必要な全ての遺伝子を1つのプラスミドに搭載した、統合型プラスミド (オールインワンプラスミド™) の開発について記載した。遺伝子治療で広く利用される AAV ベクターの製造コストは非常に高額であり、世界的な問題となっている。これまで、3種のプラスミド DNA を用いたトリプルトランスフェクション (TTF) が、AAV ベクターの製造方法として最も利用されているが、この3種のプラスミドを必要とする点が製造コスト増の大きな原因となっていた。統合型プラスミドは、AAV ベクターの製造に必要な遺伝子を1つのプラスミドに統合することでシングルトランスフェクション (STF) を可能とする。

統合型プラスミドは、枯草菌の特性を利用した長鎖 DNA 合成技術 OGAB®法を用いて株式会社シンプロジェンにて合成された。特許や論文を調査したところ、枯草菌により構築したプラスミド DNA で AAV ベクターを生産した報告は過去になかったが、HEK293 細胞に統合型プラスミドをトランスフェクションすることで、AAV ベクターが産生されることが示された。最初の検証実験は外部委託先 (SignaGen 社) にて行ったが、STF によって得られた AAV ベクターの産生量が TTF に比べて低かった。その後、株式会社シンプロジェンで AAV ベクターの製造プロセスを開発し、追加の検証実験を行った結果、大腸菌で大量調製した統合型プラスミドを用いた STF では、TTF と比較して同等以上の AAV ベクターが産生されることが示された。本結果は、異なる統合型プラスミドでも共通して得られたため、本研究の成果は特許としてまとめ出願した。

第4章では、品質試験法開発と製造プロセス開発という二つの側面から得られた先端技術研究の成果を社会実装するため、考案したイノベーションアイデア「日本を拠点とした遺伝子治療用ウイルスベクターの受託開発事業」の事業化に向けて、技術戦略、知財戦略、事業戦略、財務戦略を検討した。本事業の外部環境・内部環境を分析した結果、大きく2つの重要な事項が考えられた (図 5.1)。

1つ目は事業範囲の選択と集中である。本事業を遂行する上ではスピードは非常に重要となるが、事業領域を「遺伝子治療 (特に、最初は AAV ベクターに集中)」、活動の範囲を「DNA

の設計・合成と CMC」に絞り込むことで、遺伝子治療用ウイルスベクターの生産に関するデータを効率的に蓄積でき、開発のスピードも加速できると考えられた。本点は、技術戦略と事業戦略に反映させた。

2つ目は独自の DNA 合成技術を有することである。遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験法開発と製造プロセス開発は、非常に価値があり希少だが、活動単独では模倣困難性が高くない。しかし、バイオプロダクションにおいて、独自の DNA 合成技術と独自の DNA をもつことは大きな強みであり、DNA 合成と CMC の活動が戦略的フィットを形成することで、本事業のバリューチェーン全体で持続的な競争優位の状態をつくることができると考えられた。本点は、知財戦略と事業戦略に反映させた。

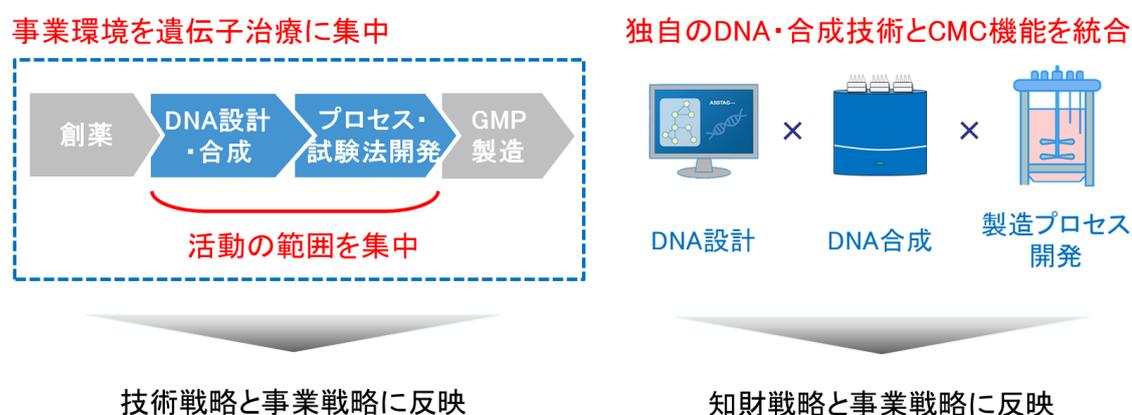


図 5.1. 本事業の遂行において重要となる戦略

上記の戦略を考慮した事業計画に基づき、売上計画、投資計画、採用計画を作成し、財務戦略を策定した。事業計画のマイルストーンに合わせて必要と考えられた設備投資と人員採用を行えるよう資本政策を検討し、事業計画が達成できるよう財務計画を作成した。

5.2 将来展望

本事業の構想は、2018年に国内製薬企業の技術研究部門に所属していた時に、世界では遺伝子治療の開発品目が急激に増大する状況に対して、日本が大きく遅れを取っている事態に危機意識をもったことから始まった。新しいモダリティとして大きな期待を寄せられる遺伝子治療だが、ウイルスベクターの品質特性は製造プロセスに大きな影響を受け、標準的な品質試験法は国際的にも定められていなく、さらには製造コストが膨大と、CMCの技術力が試される領域だと感じた。「遺伝子治療の CMC に関する科学的専門性が高い人材になること」、「構想した事業内容を社会実装できる人材になること」を目指すため、2つの目標を胸に秘め、2019年4月、製薬企業に勤務しながら神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科に入学し、内田和久研究室にて AAV ベクターの CMC に関する研究を始めた。

2019 年 7 月に開催された科学技術イノベーション研究科のシンポジウムで、株式会社シンプロジェンが有する DNA 合成技術を知り、統合型プラスミドを考案し、本イノベーションアイデアについて本格的に構想を始めた。製薬企業を退職後、2020 年 4 月に株式会社シンプロジェンへ入社し、本イノベーションアイデアの実現を目指す事業担当者として、従業員が一人の状況から本事業を進めるための体制構築を始めた。

3 年が経過し、2023 年 5 月時点で本事業ユニットは 25 名の人員を抱えるまでに成長し、製薬企業や大学などから集まった優秀な研究員により研究開発が進められる。AAV ベクターに関する様々な品質試験、固定床リアクターや攪拌槽リアクターを用いた AAV ベクターの生産培養プロセスが開発され、統合型プラスミドを含む複数の特許出願もなされた。GMP 製造に関する戦略的パートナーとも契約が締結され、今後は具体的なビジネスを獲得し売上を拡大していくステージとなる。

AAV ベクターには高額な製造コスト、不純物による安全性への懸念、免疫抗体による有効性の低減、オフターゲットなどの多くの課題が存在する。いずれの課題についても、解決の道筋となるのは、AAV ベクターの製造に用いるプラスミド DNA 配列の設計である。統合型プラスミドは単に 3 種のプラスミドを 1 つにする技術ではなく、各遺伝子パーツを組み替えることによって、まるでブロック玩具のように機能性の高いプラスミド DNA を設計・構築できるプラットフォームである (図 5.2)。

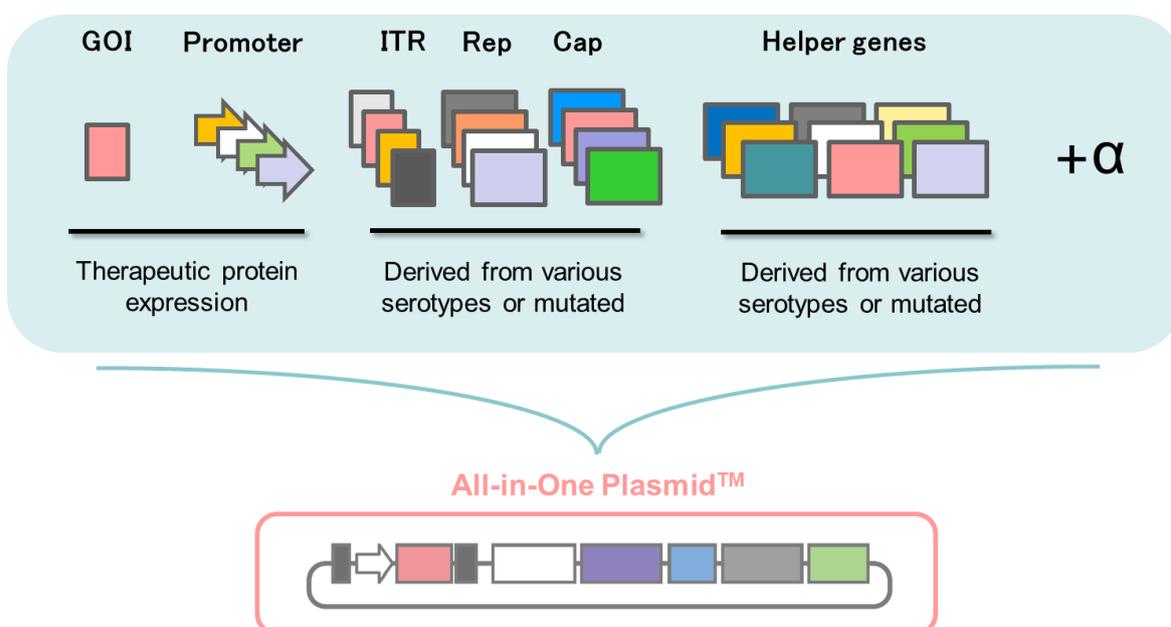


図 5.2. オールインワンプラスミド™プラットフォーム

近年米国ではバイオフィアウンドリという業種が注目される。バイオフィアウンドリは、バイオプロダクションの技術と AI、オミックス解析、ロボティクス (HTS: High Throughput Screening) などのデジタル技術を融合させて、膨大なデータを蓄積し、目的とする有用物質を生産できる細胞や遺伝子を高速で開発することを目指す研究開発を基盤とした企業である。例えば、最も有名なバイオフィアウンドリである米国の Ginkgo Bioworks は巨額の資金を調達しており、医薬品 (AAV ベクターにも取り組む) だけでなく、化粧品原料や化学製品などの様々なバイオプロダクションに取り組む。

本事業で今後目指したいことは、遺伝子治療に特化したバイオフィアウンドリとしての活動である。図 5.2 に示す様々なブロックの組み合わせがウイルスベクターの特性に及ぼす影響について、データを集中的に蓄積する。(1) 様々な遺伝子の調達、(2) 独自の DNA 配列の設計、(3) DNA 配列の評価、これらの活動を統合された一拠点でできることは、DNA 合成からウイルスベクターの技術開発まで一貫して対応できるバリューチェーンの構築へと繋がり、競争優位性が生まれる。さらに、医薬品の製品化においては必須となる CMC (製造プロセス開発、品質試験法開発) に関するバリューチェーンも有することで、ある程度のデータが蓄積された状態から迅速に治験薬製造に向けた開発に着手できる。さらに、開発のスピードは、データが蓄積されるに連れて高速化される。

日本の遺伝子治療の市場は、海外市場と比較すると小さく、成長速度も依然として遅い。しかしながら、本事業はいかに早く着手しデータを蓄積していくことにより、将来の事業価値と競争優位性へと繋がる。今後、遺伝子治療を支援する国策が働き、遺伝子治療の市場が大きく成長した時に、日本で唯一のポジショニングが築けるよう、ウイルスベクターの品質試験法開発、製造プロセス開発、独自製造技術の基盤を発展させ続け、本事業の成長に邁進したい所存である。

研究業績

【本研究に関する発表論文】

Shunsuke SAITO, Akihiko KONDO and Kazuhisa UCHIDA, Investigating critical thermal parameters for pre-analytical preparation of adeno-associated virus vector genome titration by droplet digital polymerase chain reaction, *Translational and Regulatory Sciences*, 5(2): **-**, 2023; doi: 10.33611/trs.2023-001 (in press)

※本研究は、AMED の課題番号 JP20ae0201002（課題名：遺伝子・細胞治療用ベクターのプラットフォーム製造技術開発）の支援を受けた。

【本研究に関する学会発表】

○齋藤俊介、内田和久「ドロップレットデジタル PCR 法を用いたアデノ随伴ウイルスベクターのゲノムタイター定量試験における検体前処理条件が定量値に及ぼす影響の評価と前処理手順の最適化」、第 29 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2023 年 9 月 11-13 日（予定）

○西村勇哉、柘植謙爾、齋藤俊介「組換え型アデノ随伴ウイルスベクターの産生における統合型プラスミドの開発」、第 29 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2023 年 9 月 11-13 日（予定）

【本研究に関する特許出願】

公報番号：特許第 7104263 「枯草菌におけるウイルスベクタープラスミド生産」

国際出願番号：PCT/JP2021/040410

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾

公報番号：特開 2022-183360 「統合型プラスミド」

国際出願：PCT/JP2021/040411

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾

出願番号：特願 2022-076060 「ウイルス由来構築物プラスミド」

国際出願：PCT/JP2023/017131

発明者：齋藤俊介、柘植謙爾、西村勇哉

謝辞

本研究を遂行するにあたり、入学前から論文執筆が完了するまで間、バイオ医薬品の基礎から遺伝子治療用ウイルスベクターの製造および品質管理まで、大変お忙しい中も様々な面からご指導を賜りました神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科の内田和久特命教授に心から感謝すると共に、厚く御礼申し上げます。

本先端研究の成果を社会実装へと繋げるため、事業戦略論や財務の基礎から実ビジネスへの展開に至るまで、私が一流のアントレプレナーとして成長できるよう、幅広く数多くのご指導を賜りました神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科の山本一彦教授に深く感謝すると共に、厚く御礼申し上げます。

本論文の副査をお引き受け頂き、博士論文の完成に必要な多くのご助言とご指導を賜りました神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科の蓮沼誠久教授、石川周准教授に、深く御礼申し上げます。

本先端研究成果の社会実装に必要な技術戦略、知財戦略、事業戦略、財務戦略をイノベーション・ストラテジー研究成果書にまとめるに際して、ご助言とご指導を賜りました神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科の尾崎弘之教授、福家信洋准教授、幸田徹客員教授に、深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究計画の策定、実験内容の議論、実験サンプルの手配、結果の考察、論文執筆と様々な角度からご助言とご支援を賜りました神戸大学 バイオ生産工学研究室の遊佐敬介特命教授、増見恭子特命准教授、苑宇哲特命助教、東山紀代子氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するために必要となる DNA や AAV ベクターを作製して頂き、科学的助言から特許出願に必要なデータの取得まで幅広く支援いただいた、株式会社シンプロジェンの近藤昭彦取締役（神戸大学教授）、柘植謙爾取締役（神戸大学客員准教授）、西村勇哉主任研究員（神戸大学客員准教授）、宮本尚樹研究員に心から感謝申し上げます。

神戸大学および前職の先輩であり、私が株式会社シンプロジェンに入社するまでの間、本研究に必要な準備を広くサポート頂いた岩田清和氏に心から感謝申し上げます。

末筆ながら、本研究活動に邁進する生活の中、平日も休日も関係なく家庭で支えて頂き、私のベンチャー企業に転職する決断を受け入れてくれた妻に心から感謝いたします。

2023年7月
齋藤俊介

神戸大学博士論文「遺伝子治療用ウイルスベクターの品質試験およびプロセス開発に必要な技術プラットフォームの構築と事業化」全 102 頁

提出日 2023 年 7 月 26 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ **Kernel** にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

©齋藤 俊介

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。

本論文に基づく学位審査にあたっては、以下の参考論文とともに審査された。

・イノベーション・ストラテジー研究成果書（本論文著者の作成物）