

Leprechaunでレンチウイルス力価とRNA量を同時に測定しよう

Introduction

細胞療法の開発と生産を最適化する際には、バッチに含まれるインタクトなRNA含有レンチウイルス(LV)粒子の数を早期に測定することが、真の違いに繋がります。構造的に完全なウイルス粒子の力価が最も高いバッチはどれか、最も低いバッチがどれかを回収後に知ること、質の低いサンプルから開始することによる時間の無駄がなくなります。さらに、FDAやその他の規制当局からのLV療法に対する分析法の開発および製品特性評価の必要性に対する関心が高まっており、コストのかかる遅延を避けるため、LVサンプルに何が含まれているかを正確に把握することがこれまで以上に重要になっています。

他のウイルスベクターと比較して、LV特性評価に利用できる分析法は依然として十分に開発されているとは言えません。P24 EISAやqRT-PCRのような広く用いられているアッセイは、破壊検査であり、ウイルス粒子の構造の一部しか検出できないため、また総カプシド、目的の遺伝子がウイルス粒子内に入っているか確認できないので、限られた情報しか得られません。一方、非特異的な粒子解析に依存する手法は、個々の粒子を検出して計数することはできますが、それらの内容物については仮定するしかなく、内部や表面に何があるかを直接確認することはできません。



図1: Leprechaunは、個々のLV粒子の完全な生物物理学的特性評価が可能なプラットフォームです。

Leprechaunは、生産プロセスの各段階において、シュードタイプにかかわらず、個々のLV粒子の完全な生物物理学的評価が可能な唯一のプラットフォームです(図1)。未精製サンプルから精製することなくウイルス粒子を直接捕捉できるよう、Lentivirus VSVG RNA Luniには、VSVGに対する高特異性の抗体があらかじめコーティングされています(図2)。

非VSVGシュードタイプウイルスを解析する場合は、Lentivirus Flex RNA Luniにより、選択したエンベロープタンパク質に対するお使用の抗体を用いて、捕捉ステップをカスタマイズすることができます。

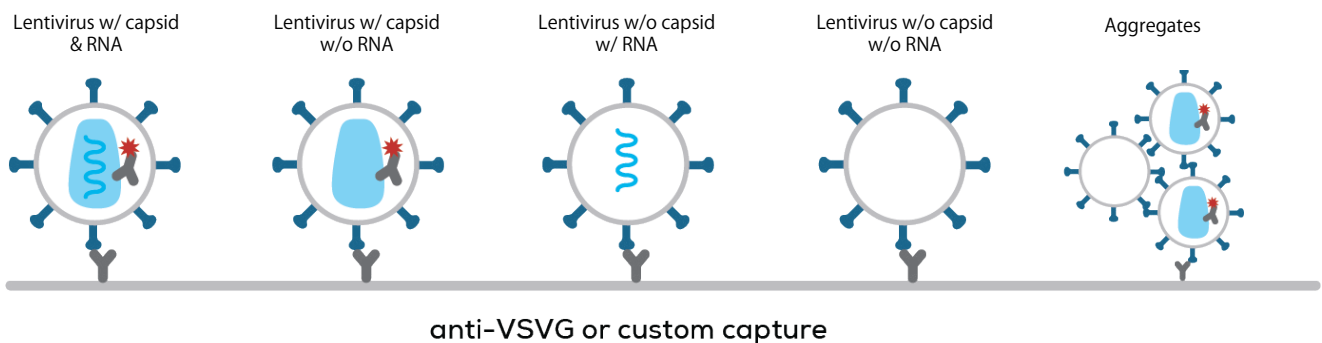


図2: RNA Luniに捕捉されたLVのサイズを測定した後、抗p24抗体-CF647およびSYTO14で染色してウイルスカプシドとRNAを検出します。1つのLuniから各出力について3回以上の繰り返し測定が可能です。

捕捉後、Leprechaunは単一粒子干渉法を用いて各ウイルス粒子のサイズを測定し、それがインタクトであるか、凝集しているか、断片であるかを確認します。抗体でウイルスエンベロップとp24キャプシドの存在を確認し、蛍光RNA色素で極めて重要な核酸をチェックします。サンプルのコンタミネーションにかかわらず、LeprechaunはRNA含有レンチウイルスの力価を下限として 1×10^7 particles/mLまで測定できます。

本アプリケーションノートでは、LeprechaunのLentivirus RNAアプリケーションで未精製サンプルおよび精製サンプル中のRNAおよびキャプシド含有LVを定量する方法について説明し、プロセス開発と分析法開発の両方におけるLV構造解析の価値を実証します。

方法

Leprechaunによる解析

LVサンプルを5社から入手し、Lentivirus VSVG RNA Kit (Unchained Labs) を用いてLeprechaun解析を行いました。LVは、製造業者が提供する1% FBS添加インキュベーション溶液で1:12~1:2000に希釈しました。キット付属のSYTO14をインキュベーション溶液で10 μ Mに希釈し、希釈したLVサンプルに色素対サンプル比1:10で添加しました。色素サンプル混合液を37°Cで16時間インキュベートしました。色素インキュベーション後、50 μ LのSYTO14標識サンプルを、Lentivirus VSVG RNA Luniを用いて室温で1時間インキュベートしました。C液とD液で固定・透過処理後、Luniをキット付属の抗p24抗体-CF647 (1:250)と室温で1時間インキュベートしました。Luniを洗浄・乾燥し、Lentivirus RNAアプリケーションを用いてLeprechaun上で測定しました。

ベンゾナーゼ処理

25 U/ μ Lのベンゾナーゼ原液 (Sigma-Aldrich) をベンゾナーゼインキュベーションバッファー溶液 (20 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM NaCl) で1:8に希釈し、2 μ Lあたり1 μ LのLVサンプルを加え、混合液を37°Cで1時間インキュベートしました。Leprechaun解析のために、SYTO14 (無色素サンプルには等容量のPBS) をベンゾナーゼ処理サンプルに添加し、上記の方法によりLuniの前処理を行いました。

25 U/ μ Lのベンゾナーゼ (ベンゾナーゼインキュベーションバッファー溶液) および10 μ MのSYTO14に1 mg/mLの仔ウシ肝RNA (Sigma-Aldrich) を添加して、ベンゾナーゼの機能性を検証しました。非ベンゾナーゼ処理コントロールとして、ベンゾナーゼの代わりに等容量のバッファー (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM NaClおよび50%グリセロール) を使用しました。Uncle (Unchained Labs) の等温アプリケーションを用いてサンプルを37°Cで1時間インキュベートし、500~630 nmの蛍光発光をモニタリングしました。

qRT-PCR 解析

解析は、Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (タカラバイオ) を用いてキットのプロトコルに従い、SydLabsが実施しました。各サンプルの3段階希釈を2回繰り返し測定し、結果を平均してゲノム力価を求めました。

Particle type	Capture antibody	Particle definition	
		Size (nm)	Component detected
LV w/ capsid & RNA	anti-VSVG/custom	35 – 130	VSVG+ p24+ RNA+
LV w/ capsid w/o RNA	anti-VSVG/custom	35 – 130	VSVG+ p24+ RNA-
LV w/o capsid w/ RNA	anti-VSVG/custom	35 – 130	VSVG+ p24- RNA+
LV w/o capsid w/o RNA	anti-VSVG/custom	35 – 130	VSVG+ p24- RNA-
Aggregates	anti-VSVG/custom	>130 – 200	VSVG+ p24 \pm RNA \pm
Viral p24	anti-VSVG/custom	N/A	VSVG+ p24+ RNA \pm
Soluble p24	anti-p24	N/A	p24+ VSVG-

表1: VSVGおよびFlex RNA Luniで解析されるLV粒子の種類の定義。デフォルトのサイズ範囲は、解析中にカスタマイズ可能です。ウイルス捕捉スポットに加えて、Luni表面にはp24スポットも含まれており、ウイルス力価と同時に可溶性p24の定量が可能です。

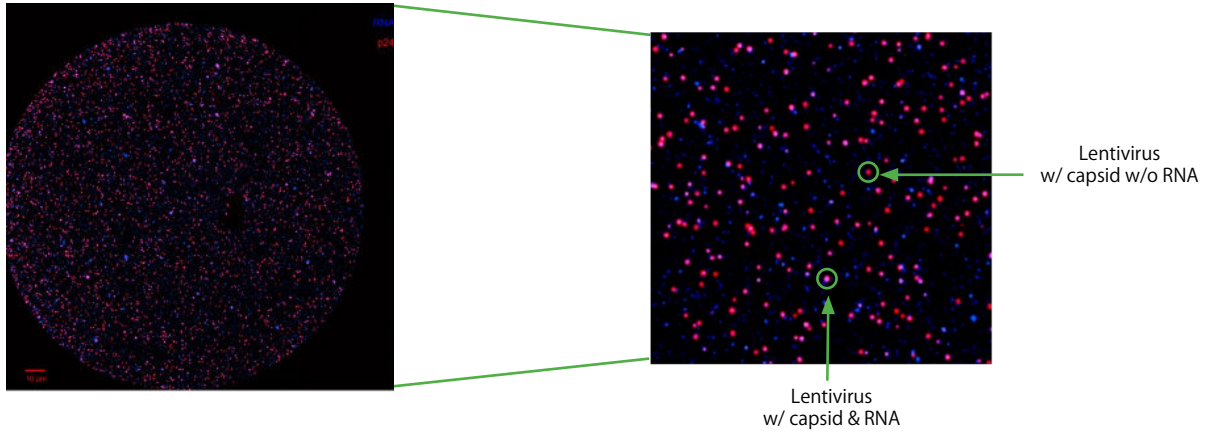


図3: VSVG RNA Luni上のVSVG捕捉スポット。サンプルをSYTO14(青色)とインキュベートした後、固定して透過処理し、封入されたp24(赤色)を検出できるようにしました。p24キャプシドとRNAの両方を含むLVは紫色、キャプシドを含むがRNAを含まないLVは赤色、RNAを含むがキャプシドを含まないウイルスは青色で示されます。

結果

すべてを知る

エンベロープタンパク質を介してウイルス粒子をRNA Luniの表面上に免疫捕捉し、その後、それらの構造を、干渉法と蛍光顕微鏡法を組み合わせで解析します。単一粒子干渉法では、シグナル増強性の二酸化ケイ素表面を用いることで、Luni表面から反射される光とウイルス粒子が散乱する光の干渉を最大化します。これにより、直径35 nmまでの単一粒子の高分解能でのサイズ決定が可能になります。ウイルスのサイズが決定されれば、Leprechaunで単一のウイルスからウイルス断片や凝集体を分離することができます。

粒子がインタクトなLVであるかどうか同定するには、サイズだけでは不十分です。p24とRNAの蛍光染色により、重要な構造成分をチェックできます(表1)。Luni上に固定する前に、サンプルを膜透過性RNA色素SYTO14とインキュベートし、ウイルスRNAを標識します。結合後、穏やかな固定および透過処理を行い、CF647を標識した抗p24抗体でウイルスを含むキャプシドを検出します(図3)。

バリデートされたRNA 検出

RNAとの結合後、SYTO14発光は530 nmにピークを示し、これをLeprechaunの青色チャンネルで検出します。青色チャンネルの蛍光がSYTO14とLV粒子との結合に特異的であることを確認するため、Luniを4つの条件(ウイルスあり/なし、色素あり/なし)でインキュベートしました(図4)。LVサンプルとSYTO14色素の両方が存在する場合のみ、青色チャンネルで数が検出されます。色素を除去し、ウイルスサンプルのみを分析した場合、青色シグナルとVSVG陽性粒子の共局在は検出されません。この場合、す

べてのウイルス粒子が「RNAなし」に分類され、シグナルがSYTO14とRNAの結合に特異的であり、サンプルからの自己蛍光の結果ではないこと、また他の蛍光チャンネルによる影響ではないことが確認されます。さらに、Luniを色素のみとインキュベートした場合にも青色シグナルは検出されず、SYTO14がLuni表面に非特異的に結合しないことが確認されます。

SYTO14は細胞透過性があり、ウイルス構造を損なうことなくウイルスエンベロープを通過できるため、LV RNA検出にはSYTO14を選択しました。SYTO14が表面に結合した、または溶液中に浮遊する核酸ではなく、ウイルス内部のRNAに結合していることを確認するため、Luni上でインキュベートする前に、LVサンプルをヌクレアーゼであるベンゾナーゼで処理しました。

まず、RNAとSYTO14を酵素の存在下および非存在下でインキュベートし、その結果得られた蛍光シグナルをUncleで測定してベンゾナーゼ活性をテストしました(図5A)。

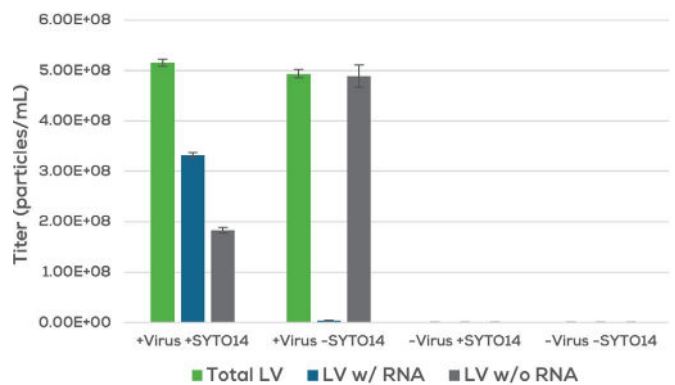


図4: ネガティブコントロールにより、青色シグナルがSYTO14とLVとの結合に特異的であることが確認できます。エラーバーは標準偏差、各条件についてn=3。

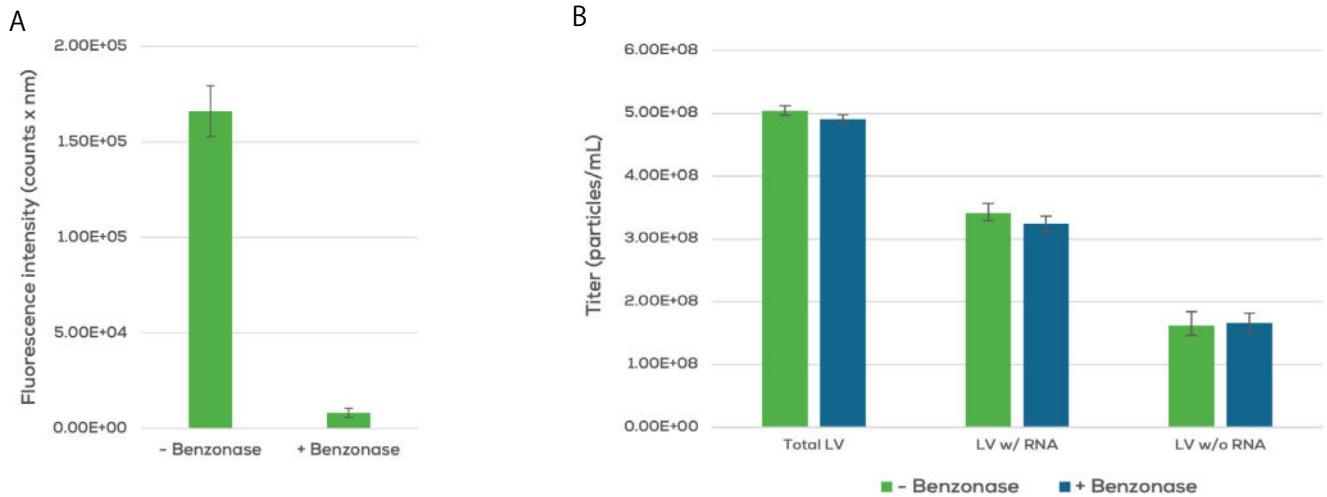


図5: (A)ヌクレアーゼ活性の確認。SYTO14とRNAをベンゾナーゼの存在下および非存在下でインキュベートし、得られた蛍光をUncleで測定しました。

ベンゾナーゼの添加により蛍光は95%減少し、ヌクレアーゼの機能が確認されました。LeprechaunによってRNAを含むことが確認されたLV粒子の数に対して、ベンゾナーゼ処理は影響を及ぼさなかったことから(図5B)、SYTO14がウイルス粒子内のRNAに結合していることが確認されました。

ウイルスタンパク質キャプシド全体で、SYTO14などの低分子色素の取込みは時間と温度に依存することが知られています^{1,2}。高いRNA染色効率を確認するため、時間を延長し、異なる温度でSYTO14をLVとインキュベートしました。RNAを含むことが確認されたウイルスの割合は、37°Cでインキュベートした場合、時間とともに増加し、16時間後にほぼ一定となりました(図6A)。インキュベーション温度を25°Cまたは4°Cに下げると、SYTO14染色されたLV

粒子は大幅に減少しました(図6B)。これらのデータを総合すると、高温で一晩インキュベーションを行うことが、ウイルスによるSYTO14の効率的な取込みと封入RNAへのアクセスに有効であることが確認されます。

ウイルスタンパク質キャプシド全体で、SYTO14などの低分子色素の取込みは時間と温度に依存することが知られています^{1,2}。高いRNA染色効率を確認するため、時間を延長し、異なる温度でSYTO14をLVとインキュベートしました。RNAを含むことが確認されたウイルスの割合は、37°Cでインキュベートした場合、時間とともに増加し、16時間後にほぼ一定となりました(図6A)。

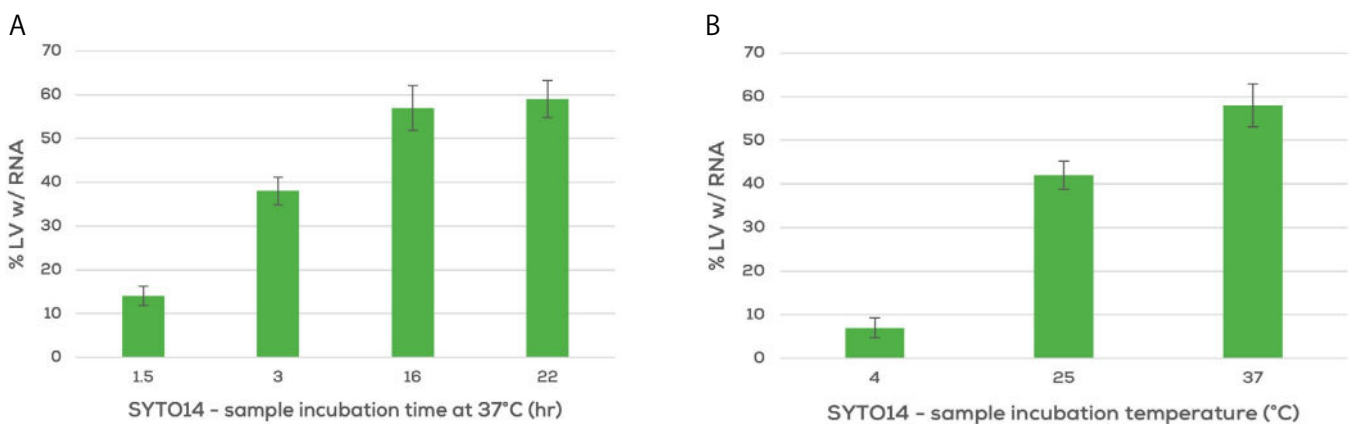


図6: RNAを含むことが確認されたウイルスの割合は、37°Cでインキュベートした場合、時間とともに増加し、16時間後にほぼ一定となりました(図6A)。インキュベーション温度を25°Cまたは4°Cに下げると、SYTO14染色されたLV粒子は大幅に減少しました(図6B)。

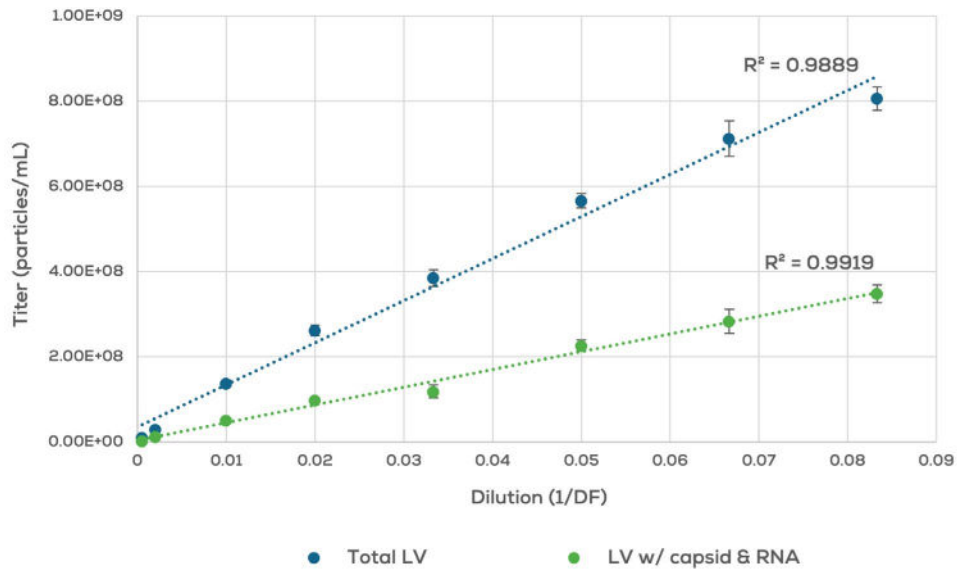


図7: Leprechaunで測定したLV力価の直線性。エラーバーはSD。

Particle type	Dynamic range
LV w/ capsid & RNA	1x10 ⁷ – 5x10 ⁸ particles/mL
LV w/ capsid w/o RNA	
LV w/o capsid w/ RNA	
LV w/o capsid w/o RNA	
Aggregates	
Soluble p24	5 – 10,000 pg/mL
Viral p24	1,000 - 50,000 pg/mL

表2: Leprechaun Lentivirus VSVG/Flex RNA Kitで測定されるすべての出力値のダイナミックレンジ。

インキュベーション温度を25°Cまたは4°Cに下げると、SYTO14染色されたLV粒子は大幅に減少しました(図6B)。

これらのデータを総合すると、高温で一晩インキュベーションを行うことが、ウイルスによるSYTO14の効率的な取込みと封入RNAへのアクセスに有効であることが確認されます。

線形かつ精密

Luni表面上でのLV粒子のエンベロープ特異的捕捉により、非ウイルス粒子は捕捉されないで、夾雑物がウイルス力価に干渉することはありません。これにより、Leprechaunは未精製サンプルと精製サンプルの両方で、レンチウイルス

力価の直線範囲を下限で1x10⁷ particles/mLまで維持できます(図7、表2)。このときのCVは通常8%ほどです。

ゲノム力価との相関

様々な業者から得られた異なるウイルスゲノムを含む未精製サンプルおよび精製LVサンプルを、LeprechaunとqRT-PCRの両方で解析しました。Leprechaunで測定したRNAを持つLVの総力価とゲノム力価を比較したところ、精製サンプルでは正の相関(R²=0.95)が認められました(図8A)。

興味深いことに、こうした相関は未精製サンプルでは認められませんでした(図8B)。このことは、産生細胞から放出される粒子のうち、LVと同じサイズで、VSVGを発現し、目的とするウイルスゲノム以外のRNAを含む粒子がかなりの数存在することを強く示唆しています。おそらく、これらの粒子はLV粒子とともに放出され、細胞質RNAを含む小胞だと考えられます。Leprechaunは、RNAと同時にキャプシドタンパク質を検出することによってこの集団に対応し、正しいアセンブリプロセスを経たLVのみを確実に数えることが可能です。すなわち、初期LVサンプルの解析で一般的なRNA検出に依存する手法では、p24キャプシドの存在も確認できることが極めて重要です。

精製サンプルの追跡

Leprechaunにより、生産プロセスを通してLVバッチの品質を追跡することができますので、重要なキャプシドとRNAを含むLVが濃縮されているかどうか、誤ってアセンブリされたウイルス様粒子が除去されているかどうか確認できます。

LEPRECHAUNでレンチウイルス力価とRNA量を同時に測定しよう

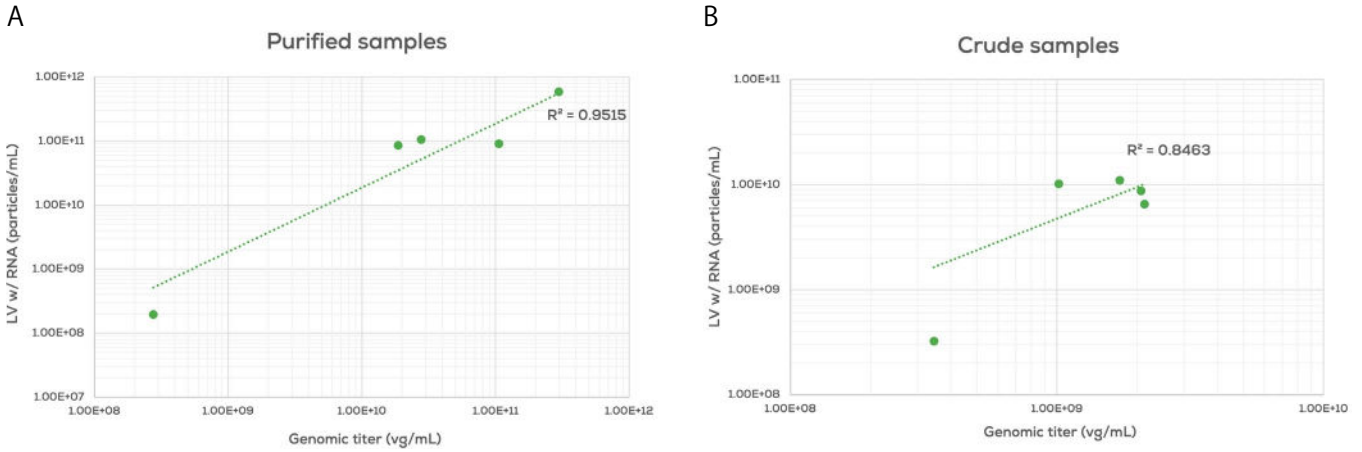


図8: 精製サンプル(A) および未精製サンプル(B) 中のLeprechaunで測定したRNAを持つLVの力価とqRT-PCRで測定したゲノム力価との関係。

同じLVバッチで、精製工程の異なる段階[未精製の回収物、PEG沈殿後および最終生成物(PEG、UCおよびUF精製)]から採取したサンプルをLeprechaunで分析しました(図9A)。Leprechaunで個々の粒子の構造を調べてみると、総LV力価は精製段階ごとに増加していますが、最終生成物中の構造的に完全なウイルス粒子の割合は未精製の回収物よりも高くないことが明らかになりました(図9Aの青色の線)。このことから、標準的なLV精製法では、LVのサイズと密度を持つ粒子の濃縮には成功しているものの、構造的に完全なLVを濃縮するという意味では必ずしも有効ではないことが分かります。

て力価を算出し、p24 ELISAと同等の出力値を得ました³。p24濃度は段階ごとに上昇しており、ウイルス力価が増加していることが示されています(図9B)。しかし、この出力値は、従来のELISAでは得られない情報であるp24陰性ウイルス粒子の残存数(図9Aの灰色、黄色のバー)を考慮しなければ、誤解を招く可能性があります。これらの粒子は同じエンベロープタンパク質を発現しており、RNAを含んでいる可能性があり、標的細胞の形質導入においてインタクトなLVと競合する可能性があります。p24陰性粒子を考慮すると、最終生成物と未精製の回収物に含まれているキャプシド含有LVの割合は同程度になります。

3つのサンプルの総p24含有量をLeprechaunで分析し、p24 1 pgあたり物理的LV粒子 1×10^4 個として換算し

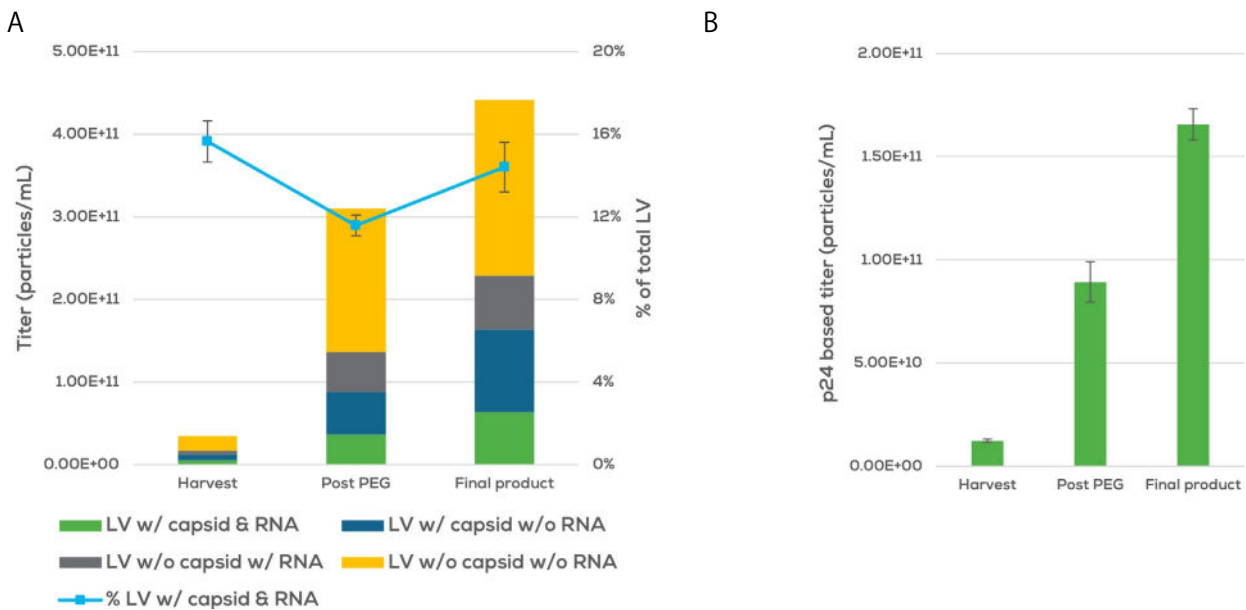


図9: (A) 異なる精製段階におけるLVバッチのLeprechaun解析。(B) Leprechaunで測定したp24に基づく力価。ウイルスp24と可溶性p24濃度の和から力価を算出しました。エラーバーはSD、n=3。

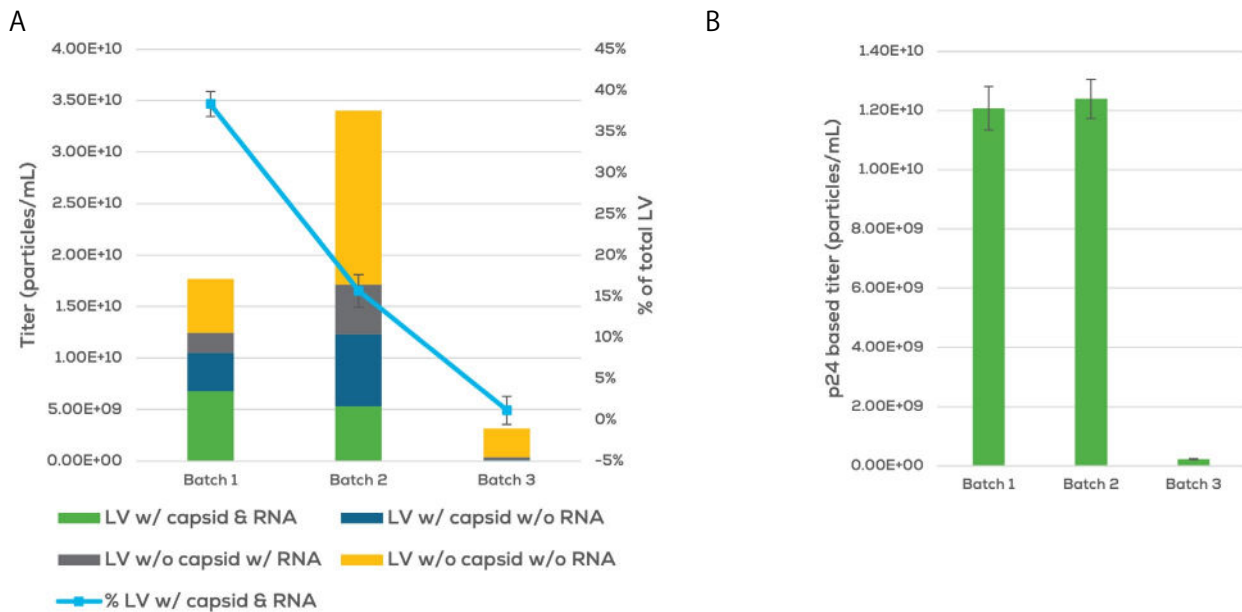


図10: (A) 3種類の未精製LVサンプルの構造組成のLeprechaun解析。(B) Leprechaunで測定したp24に基づくLV力価。エラーバーはSD, n=3。

良好なバッチの識別

また、Leprechaunは、回収時にLVサンプルをスクリーニングして、バッチに構造的に完全な高力価のLVが含まれているかどうか、そのバッチを継続する価値があるか、バッチの大部分がジャンクであることを示す低力価のインタクトLVが含まれておりロスが減らすべきかどうか確認することも可能です。3つのLVバッチの未精製サンプルをLeprechaunで分析し、その組成を比較しました(図10A)。

一見、バッチ2がLV粒子の全体的な力価が最も高いように見えますが、これらの粒子の構造組成をよく見てみると、バッチ2ではかなりの割合がキャプシドもRNAも含まない空のウイルス粒子であることが示されています。バッチ1とバッチ2のキャプシドとRNAを持つLVの力価は同程度ですが、バッチ1は構造的に不完全なLV夾雑物がはるかに少ないため、キャプシドとRNAを持つLVがかなり多く濃縮されていることとなります(全LV粒子の39%対14%)。キャプシドおよび/またはRNAを持たないウイルス粒子を精製中に除去するのは難しいため、これらの粒子の割合が低い出発物質(この場合はバッチ1)を選択することが重要です。

先の一連のサンプルと同様、p24含有量をLeprechaunで測定し、ELISAと同等の物理的力価に変換しました(図10B)。バッチ3が最も力価が低いサンプルであることはp24含有量だけでも確認できますが、キャプシド陰性LVとキャプシド陽性粒子のRNA含有量の両方に関する情報がいないため、バッチ1とバッチ2の品質を区別することはできません。

結論

従来の精製法はLVの濃縮に有効ですが、正しいサイズと密度を持ち、重要な構造成分(特にp24キャプシドとRNA)を持たないLV粒子を除去するのは困難な可能性があります。これらの粒子は、インタクトLVと同じエンベロープタンパク質を持ち、標的細胞の形質導入において競合する可能性があります。目的のペイロードを送達することができず、実際にはウイルスゲノム以外のRNAを有している可能性があります。細胞療法の安全性と有効性を確保するためには、患者の治療に使用する細胞に未知のRNA配列を送達することは避ける必要があります。

現在のLV解析法は、キャプシドとRNAのいずれかのみを調べるため、構造的に不完全なウイルス粒子の数に関する情報は得られません。細胞に基づく機能アッセイであっても、正しいウイルスゲノムを持つ粒子にのみ焦点を当てており、他のRNAやカーゴタンパク質を有する粒子の影響は測定できません。p24キャプシド、RNA、またはその両方を持たないウイルスの数を含め、LVサンプルの全体像を示せる唯一のプラットフォームであるLeprechaunの助けを借りて、プロセス開発を次のレベルに進めましょう。サンプルに何が含まれているかを初めて真に知ることができ、LV生産プロセスの各段階の有効性について詳細な洞察を得ることができますので、プロセス開発に対して十分な情報に基づく意思決定を行うことができます。

どの上流物質がキャプシドとRNAを持つLVを最も多く含んでいるのか、標的細胞を未知の方法で変化させる可能性がある構造的に不完全なLVが少ないのかをLeprechaunで知ることで、ベストな立場から高品質の最終生成物を作製することができます。生産プロセスがベストなものであったとしても、LV精製法には限界があります。これを克服するためには、早期に最良のサンプルを特定することが極めて重要です。LV特性評価に対する規制当局の要求が高まる中、LeprechaunでLV解析に革命をもたらし、LVサンプルが常にゴールドスタンダードを満たせるようにしましょう。

参考文献

- 1 Binding of fluorescent dye to genomic RNA inside intact human rhinovirus after viral capsid penetration investigated by capillary electrophoresis. Kremser, L. et al. Anal Chem, 2004. 76: 882-887
- 2 Quantitative evaluation of protein heterogeneity within herpes simplex virus 1 particles. El Bilali, N. et al. J Virol, 2017. 91:e00320-17
- 3 Production of high-titer lentiviral vectors. Zufferey, R. and D. Trono. Curr Protocols in Neuroscience, 2001. 12: 4.21.1-4.21.12.



Unchained Labs

東京都千代田区神田須田町 2-9-2 PMO神田岩本町 3F

Phone: 03-3526-2811

Email: unchained.labsjp@unchainedlabs.com

©2023 Unchained Labs. 禁無断複写・転載。Unchained Labsのロゴ、StunnerおよびStunnerのロゴはUnchained Labsの商標および/または登録商標です。掲載されているその他すべてのブランドや製品名は、各社が所有する商標です。

Rev A