

Leprechaunでレンチウイルスの力価と構造を同時に測定しよう！

はじめに

開発・製造プロセスを通してレンチウイルスベクター（LV）のサンプルの力価、構造や夾雑物の量をチェックすることは、遺伝子治療の製品を製造するうえで大きな課題です。一般的に使用されている手法はp24 ELISAとqPCRは、どちらも比較的高純度のサンプルを準備する必要があります。それゆえに、両者いずれもサンプルで「何が起きているか」を完全に把握することができません。

Capsid ELISAはカプセル化されたウィルスのタンパク質から可溶性p24を分離できないため、高純度のサンプルでない限りLVの力価は本来よりも高く推測されます。qPCRは目的遺伝子をダイレクトに検出できますが、結果のばらつきが大きくなることが懸念されます。それゆえにLVの力価測定法としての信頼度は、あまり高くないのが現状です¹。いずれの方法もLVの1つの構成要素に着目しており、分析前にサンプルを溶解する必要があります。そのため多重分析によるウイルスの構造に関する情報を得ることができません。これらの方法はターゲットに対する特異性が高いので、夾雑物を検出することは困難です。

Leprechaunはクルードまたは精製サンプルのLVの力価測定、構造の特性評価や夾雑物の分析を一度に実施できる新しいプラットフォームです（図1）。Leprechaunは粒子サイズを分析するだけでなく、同時にウイルスのエンベロープとキャプシドの有無をチェックします。これにより、それぞれのLV粒子が「損傷していないか」または「誤って組み立てられていないか」を判定します。凝集体と単一の粒子はサイズ



図 1: Leprechaun: レンチウイルスの力価・特性評価ツール

に基づき区別されます。ウイルス粒子と非ウイルス粒子は、表面タンパク質の発現の情報に基づき別々に数えられます。LeprechaunはLVサンプルの5つの主な構成要素を単一粒子ベースで定量できます。それゆえに、それぞれの粒子がレンチウイルスの「キャプシドを含んでいるか」、「エンベロープのタンパク質を含んでいるか」、「凝集体なのか」あるいは「細胞外小胞(EV)なのか」を知ることができます。

Leprechaun専用の消耗品LuniはVSVG、p24やテトラスパニンに対する特異性の高い抗体があらかじめコーティングされています。それゆえに、クルードなサンプルからダイレクトにLV粒子と非ウイルス性の夾雑物をそれぞれ捉えることができます（図2）。VSVG、p24やテトラスパニンに対する免疫蛍光プローブを利用した蛍光顕微鏡法と単一粒

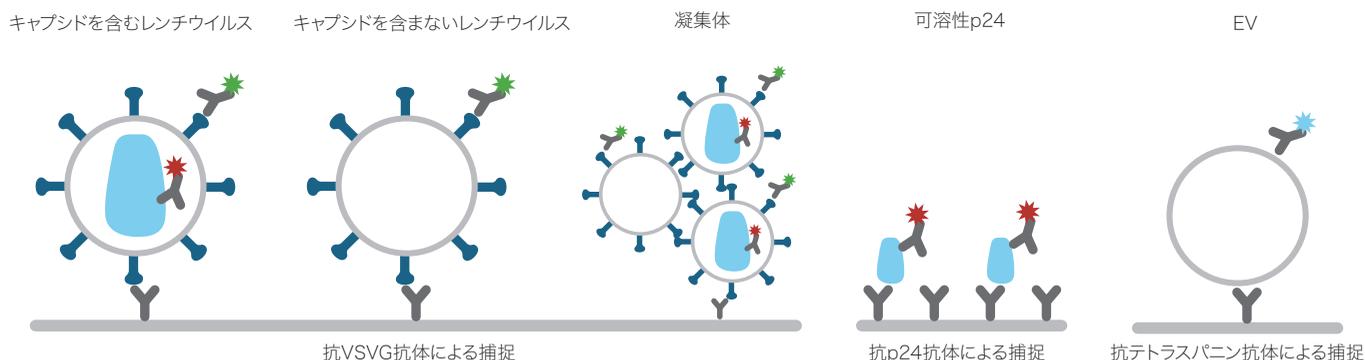


図 2: Leprechaun専用の消耗品LuniにはLV、可溶性p24やEVに対するそれぞれの抗体捕捉スポットが含まれています。1つのLuniからの測定結果は3回以上のリピートから得られるものです。

子干渉法とのコンビネーションにより、LVの力価を 5×10^6 vp/mLまで正確に測定できます。ウイルスが「正しい構造をとっているか」または「正しいサイズであるか」も同時にチェックできます。さらに一回のランで可溶性p24とEVも同時に定量できます。

レンチウイルスをつくるプロセスにおいてEVは、細胞から共に放出されます。EVとレンチウイルスはサイズが類似しており、ゲノムやウイルスのタンパク質を組み込む傾向があります。それゆえにEVはウイルス粒子との区別をするのに厄介な夾雑物です。LVはますますin vivo の治療法に利用されるようになり、EV夾雑物の濃度などより多くの「Critical Quality Attributes (CQA)を管理すべきである」という規制当局からの要求も高まっています。Leprechaunは製造プロセスのそれぞれのステップにおいてレンチウイルスの力価とEV夾雑物の濃度を容易にモニタリングできます。それゆえにエクソソーム夾雑物の量を抑えつつ高いウイルスの収率が得られる最適な方法を探し出すことができるので、プロセス開発の加速に貢献するでしょう。

本アプリケーションノートではLeprechaunがどのようにキャプシドを含むレンチウイルス、キャプシドを含まないレンチウイルスと夾雑物(可溶性p24やエクソソーム)の混入を定量し、凝集体を「測定しているか」を説明していきます。

方法

レンチウイルスのサンプルはBirnbaum Lab (MIT)から提供されたものを使用。滴定実験では、レンチウイルスをPBSで $1.23 \times 10^6 \sim 3.15 \times 10^8$ vp/mL (p24 ELISAにて測定)の濃度に希釈、分析はLeprechaunのレンチウイルス・キット(Unchained Labs)を利用しました。サンプルはメーカー提供のインキュベーション溶液で1:2に希釈しLuniにアプライしてから1時間室温でインキュベートしました。

Solution Aで洗浄後Luniにキットに含まれる蛍光標識した抗VSVG-CF555抗体(1:500)、抗p24-CF647抗体(1:250)や抗テトラスパニン-CF488(1:500)をアプライし1時間室温でインキュベート。その後Luniを洗浄し乾燥させ、Leprechaunのレンチウイルス・アプリケーションにて測定し、Leprechaunにより力価(レンチウイルスと凝集体)や濃度(EV、可溶性またはウイルス内のp24)を分析・測定しました。

結果

LeprechaunはLuniによるウイルス粒子の免疫捕捉後に蛍光顕微鏡法と干渉法を組み合わせ、キャプシドを含むレンチウイルスの力価を測定します。これらの方法のコンビネーションにより、捕捉された粒子のタンパク質発現やサイズを個々のウイルスレベルで分析することが可能になります。

シグナルを増強するためLuniの表面は二酸化ケイ素(SiO_2)でコーティングされています。そのため単一粒子干渉法によりLuniの表面から反射する光の干渉と捕捉されたウイルスからの散乱光を最大化することができます。これにより直径35 nmまでの単一粒子のサイズを高分解能で測定できます。ウイルスのサイズが明らかになればLeprechaunはウイルス断片と凝集体を機能性のあるレンチウイルスの粒子(完成型)から分離することができます。

しかしながら、サイズの情報のみで粒子をレンチウイルスとして同定するには不十分です。蛍光標識した2次抗体をくわえVSVGとp24を可視化することで、構造の重要な情報を得ることができます(表1)。CF555で標識した抗VSVG抗体により、ウイルスのエンベロープとVSVGシュードタイプの有無を確認できます。マイルドな固定と透過処理の後にCF647で標識した抗p24抗体により、カプセル化されたキャプシドを検出できます(図3)。

粒子の種類	Luniの捕捉スポット	粒子の定義	
		サイズ(nm)	検出されるタンパク質
キャプシドを含むLV	抗VSVG抗体	35 – 130	VSVG+ p24+
キャプシドを含まないLV	抗VSVG抗体	35 – 130	VSVG+ p24-
凝集体	抗VSVG抗体	>130 – 200	VSVG+ p24+
p24(ウイルスが含む)	抗VSVG抗体	N/A	VSVG+ p24+
EV	抗テトラスパニン抗体	35 – 200	Tetra+ VSVG+ p24+
可溶性p24(ウイルスが含まない)	抗p24抗体	N/A	p24+ VSVG- Tetra-

表 1: LV粒子の種類に対する定義

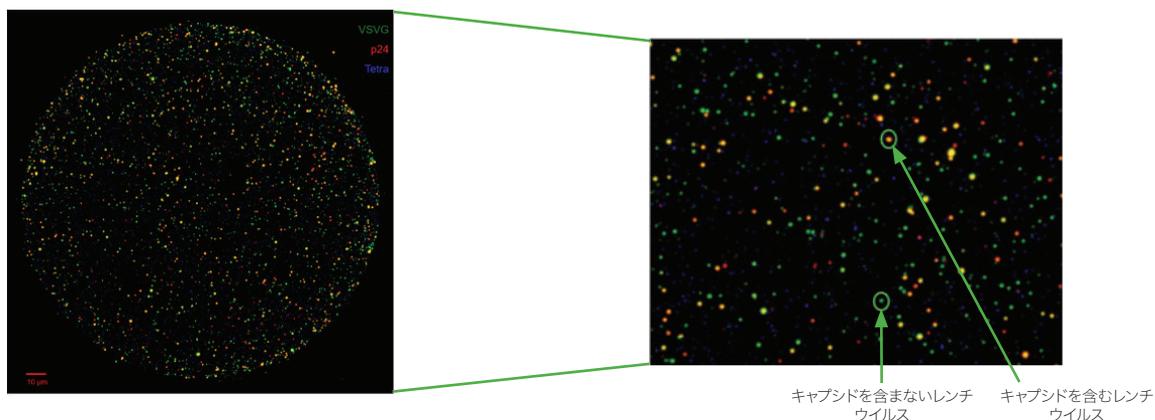


図3: レンチウイルス測定用LuniのVSVG捕捉スポット。カプセル化されたp24を検出できるようにサンプルを固定し、透過処理をおこなった。VSVGエンベロープ・タンパク質とp24キャプシドの両方を含むレンチウイルスは黄色、キャプシドを含まないレンチウイルスは緑色で表されている。

抗VSVG抗体捕捉ステップでは抗体の高い特異性により非ウイルス粒子の結合がおこらないため、夾雑物がウイルスの力価に干渉することはありません。Leprechaunがクルードと精製サンプルの両方で 5×10^6 vp/mLまで線形範囲を維持できるのは、抗VSVG抗体の高い特異性によるものです(図4、表2)。LV力価の典型的なCVは6%です。可溶性p24測定の典型的なCVは8%です。

Leprechaunはウイルスの力価をp24キャプシドを含むLVとキャプシドを含まないウイルスの2つのカテゴリーに分類します(図5A)。この例では総LVの力価が 6.2×10^8 vp/mLのサンプルにキャプシドを含むLVが 2.7×10^8 vp/mL (43%) 存在することがわかります。LVサンプルのサイズ・プロファイルから、この例では少量の凝集体(>130 nm)が存在することがわかります(図5B)。

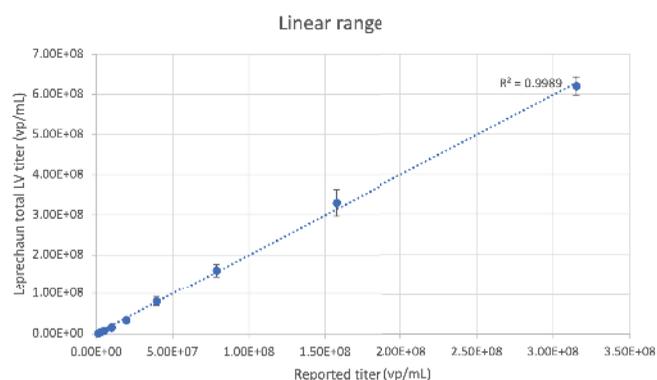


図4: Leprechaunで測定したレンチウイルスの力価とp24 ELISAで報告されているウイルスの力価との線形相関。エラーバーはSDによるもの。

EV夾雑物の量を測定するため、Luniは抗テトラスペニン抗体スポット上でEVを特異的に捕捉します。総LVの力価が 6.2×10^8 vp/mLの同じサンプルには、EVが 5.7×10^8 particles/mL存在しています(図5A)。LVサンプルのEVの濃度を知ることは、EVがベクターの「働きを妨げているのか」または「助けているのか」を評価するのに役立ちます。

またLeprechaunは、可溶性p24の混入も定量できます(図5C)。サンプルの一貫性は測定全体をとおして維持されるため、可溶性p24とウイルスが含むp24を別々に定量できます。

溶液中に遊離しているp24はLuniの抗p24抗体スポット上で捉えられ、可溶性p24として測定されます。捕捉されたp24の蛍光強度は検量線によりpg/mLに換算されます。これによりLeprechaunは混入する可溶性p24の濃度を正確に測定できるので精製プロセスをとおし、その夾雑物

粒子の種類	ダイナミック・レンジ
キャプシドを含むLV	5×10 ⁶ ~5×10 ⁸ particles/mL
キャプシドを含まないLV	
凝集体	
EV	5~10,000 pg/mL
可溶性p24(ウイルスが含まない)	
p24(ウイルスが含む)	500~50,000 pg/mL

表2: Leprechaunでの各種LV関連粒子のダイナミック・レンジ

LEPRECHAUNでレンチウイルスの力価と構造を同時に測定しよう!

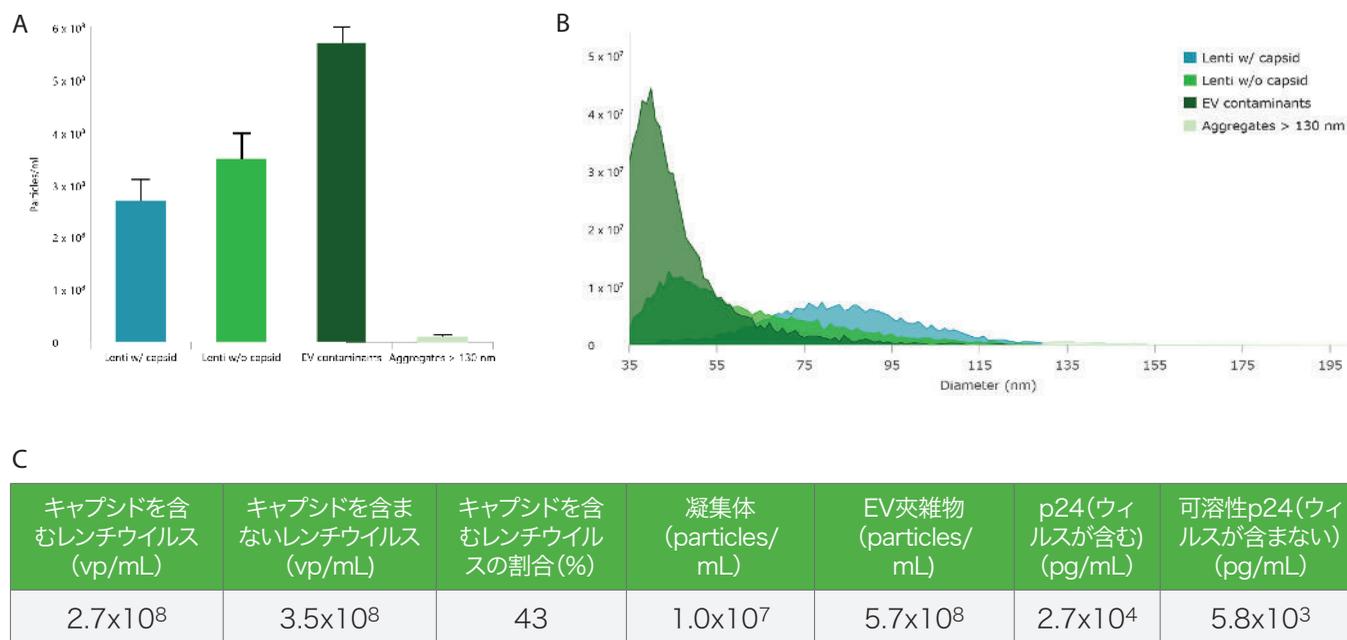


図5: (A) Leprechaunはキャプシドを含むレンチウイルスの力価、キャプシドを含まないレンチウイルスの力価、凝集体の力価やEV夾雑物の濃度を測定。(B) LV、凝集体やエクソソーム集団のサイズ・プロファイル。(C) LVサンプルの異なる構成要素の総合的な定量。

の量を追跡することができます。可溶性p24濃度の関連情報を提供するため、Leprechaunのソフトウェアはウイルスが含むp24の濃度も定量します²。その方法はp24の1 pgあたり物理的なレンチウイルスの粒子1×10⁴個に換算します。

結論

キャプシドを含むLVの力価を追跡することにより、ペイロードを運べる可能性のあるLVの割合について洞察が得られます。さらにベクターにダメージを与えているワークフローのステップを特定することもできます。既存の分析法ではクルードなサンプルに対して有効ではありません。なぜならばレンチウイルスの1つの特性のみに着目し、構造の特性評価をおこなえないからです。

Leprechaunは複数の分析手法や測定法の最適化をおこなうことなく、細胞培養から最終処方までLVサンプルの全体像を明らかにします。表面のタンパク質やキャプシドの発現などの構造情報を分析するためにLeprechaunを利用すればサ

イズ、力価や夾雑物に関する詳細な情報を一度に得ることができます。Leprechaunはウイルス粒子と夾雑物をそれぞれ特異的に免疫捕捉することができるので、クルードなサンプルでも容易に取り扱うことができます。

これによりウイルスの力価や完成度に対する各ステップの影響を評価でき、開発プロセスにおいて変化があっても迅速なフィードバックが得られます。LV開発のどのステージであってもLeprechaunを利用すれば、あなたが知りたいウイルスの力価を速やかに評価できるでしょう。

参考文献

- 1 Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. Vermeire, J. et al. PLoS One, 2012. 7(12):e50859.
- 2 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
6870 Koll Center Parkway
Pleasanton, CA 94566
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2023 Unchained Labs. 禁無断複写・転載。Leprechaunは Unchained Labsの商標、Unchained LabsはUnchained Labsの登録商標です。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