

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/025570

発行日 平成16年12月24日 (2004.12.24)

(43) 国際公開日 平成15年3月27日 (2003.3.27)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 7/00

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/569

// (C 1 2 N 7/00

F I

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 N 7/00

G O 1 N 33/53

M

G O 1 N 33/569

Z N A L

C 1 2 N 7/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-529148 (P2003-529148)	(71) 出願人	595155107
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/009558		株式会社ディナベック研究所
(22) 国際出願日	平成14年9月18日 (2002.9.18)		茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
(31) 優先権主張番号	特願2001-283451 (P2001-283451)	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成13年9月18日 (2001.9.18)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	特願2001-356336 (P2001-356336)		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成13年11月21日 (2001.11.21)	(72) 発明者	井上 誠
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
			株式会社ディナベック研究所内
		(72) 発明者	徳炭 由美子
			茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
			株式会社ディナベック研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 粒子形成能が低下した (-) 鎖RNAウィルスベクターの検査方法および製造方法

(57) 【要約】

本発明は、粒子形成能または細胞傷害性が低下または消失した (-) 鎖RNAウィルスベクターの検査方法および製造方法を提供する。(-) 鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞で発現するM蛋白質の局在が低下または消失することにより、該細胞におけるウィルス様粒子形成を抑制できることを見出した。本発明は、粒子形成能が低下または消失した (-) 鎖RNAウィルスベクターの検査方法、スクリーニング方法、および粒子形成能が低下または消失した組み換え (-) 鎖RNAウィルスベクターの製造方法を提供する。ウィルス様粒子形成が低下または消失したベクターはベクターを導入した細胞からのウィルス2次放出による細胞障害や免疫誘導が惹起されないため、遺伝子治療用ベクターとして極めて有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(-) 鎖 R N A ウィルスベクターの粒子形成能を検査する方法であって、該ベクターを導入した細胞における M 蛋白質の局在を検出する工程を含む方法。

【請求項 2】

粒子形成能が低下または消失した (-) 鎖 R N A ウィルスベクターをスクリーニングする方法であって、

(a) 該ベクターを導入した細胞における M 蛋白質の局在を検出する工程、

(b) 該局在が低下または消失したベクターを選択する工程、を含む方法。

【請求項 3】

M 蛋白質の局在が、M 蛋白質の細胞表面の凝集である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(-) 鎖 R N A ウィルスベクターの粒子形成能を低下または消失させる遺伝子をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検遺伝子を保持する (-) 鎖 R N A ウィルスベクターを導入した細胞における M 蛋白質の局在を検出する工程、

(b) 該局在を低下または消失させる遺伝子を選択する工程、を含む方法。

【請求項 5】

M 蛋白質の局在が、M 蛋白質の細胞表面の凝集である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

被検遺伝子が、(-) 鎖 R N A ウィルスの M、F、および H N 遺伝子からなる群より選択される遺伝子の変異体である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

粒子形成能が低下または消失した組み換え (-) 鎖 R N A ウィルスベクターの製造方法であって、請求項 4 から 6 のいずれかに記載の方法により同定または単離され得る遺伝子を保持する (-) 鎖 R N A ウィルスベクターを、該遺伝子による M 蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で再構成させる工程、を含む方法。

【請求項 8】

粒子形成能が低下または消失した組み換え (-) 鎖 R N A ウィルスベクターの製造方法であって、M 遺伝子の欠損または変異により該 M 遺伝子の発現産物の局在が低下または消失する (-) 鎖 R N A ウィルスベクターを、機能的 M 蛋白質が持続的に発現する条件下で再構成させる工程、を含む方法。

【請求項 9】

前記工程が、細胞表面における遺伝子産物の凝集が低下または消失する温度感受性変異 M 遺伝子を保持する (-) 鎖 R N A ウィルスベクターを、許容温度で再構成させる工程である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

温度感受性変異 M 遺伝子が、センダイウィルス M 蛋白質の G 6 9、T 1 1 6、および A 1 8 3 からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換された (-) 鎖 R N A ウィルス M 蛋白質をコードする遺伝子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記工程が、M 遺伝子が欠損している (-) 鎖 R N A ウィルスベクターを、再構成を行う細胞の染色体に組み込まれた M 遺伝子が発現する条件下で再構成させる工程である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

(-) 鎖 R N A ウィルスベクターが、さらに H N および / または F 遺伝子が欠損しているか、または温度感受性変異 H N および / または温度感受性変異 F 遺伝子を保持する、請求項 7 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

温度感受性変異HN遺伝子が、センダイウィルスHN蛋白質のA 2 6 2、G 2 6 4、およびK 4 6 1からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換された(-)鎖RNAウィルスHN蛋白質をコードする遺伝子である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

(-)鎖RNAウィルスベクターが、さらにPおよび/またはL遺伝子に変異を保持する、請求項7から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

P遺伝子の変異が、センダイウィルスP蛋白質のE 8 6および/またはL 5 1 1に相当する(-)鎖RNAウィルスP蛋白質のアミノ酸部位が他のアミノ酸に置換された変異である、請求項14に記載の方法。 10

【請求項16】

L遺伝子の変異が、センダイウィルスL蛋白質のN 1 1 9 7および/またはK 1 7 9 5に相当する(-)鎖RNAウィルスL蛋白質のアミノ酸部位が他のアミノ酸に置換された変異である、請求項14または15に記載の方法。

【請求項17】

ベクターの再構成を35以下で行う工程を含む、請求項7から16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

(-)鎖RNAウィルスがパラミクソウィルスである、請求項1から17のいずれかに記載の方法。 20

【請求項19】

パラミクソウィルスがセンダイウィルスである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

請求項7から19のいずれかに記載の方法により製造された、粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクター。

【請求項21】

組み換え(-)鎖RNAウィルスであって、機能的M蛋白質を有するが、該ウィルスのゲノムにおいてM蛋白質をコードする配列が欠損しているウィルス。

【請求項22】 30

下記(a)から(d)からなる群より選択される少なくとも1つの性質を有する組み換え(-)鎖RNAウィルス。

(a)該ウィルスのゲノムにコードされるM蛋白質において、センダイウィルスM蛋白質のG 6 9、T 1 1 6、およびA 1 8 3からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている。

(b)該ウィルスのゲノムにコードされるHN蛋白質において、センダイウィルスHN蛋白質のA 2 6 2、G 2 6 4、およびK 4 6 1からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている。

(c)該ウィルスのゲノムにコードされるP蛋白質において、センダイウィルスP蛋白質のE 8 6またはL 5 1 1のアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている。 40

(d)該ウィルスのゲノムにコードされるL蛋白質において、センダイウィルスL蛋白質のN 1 1 9 7および/またはK 1 7 9 5のアミノ酸あるいは他の(-)鎖RNAウィルスM蛋白質の相同部位のアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている。

【請求項23】

少なくとも(a)および(b)の性質を有する、請求項22に記載のウィルス。

【請求項24】

少なくとも(c)および(d)の性質を有する、請求項22に記載のウィルス。

【請求項25】

(a) から (d) の全ての性質を有する、請求項 2 2 に記載のウィルス。

【請求項 2 6】

該ウィルスのゲノムにおいてスパイク蛋白質をコードする配列の少なくとも 1 つをさらに欠損する、請求項 2 1 から 2 5 のいずれかに記載のウィルス。

【請求項 2 7】

スパイク蛋白質が F 蛋白質である、請求項 2 6 に記載のウィルス。

【請求項 2 8】

(-) 鎖 RNA ウィルスがパラミクソウィルスである、請求項 2 1 から 2 7 のいずれかに記載のウィルス。

【請求項 2 9】

パラミクソウィルスがセンドイウィルスである、請求項 2 8 に記載のウィルス。

【請求項 3 0】

遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させるために用いる、請求項 2 1 から 2 9 のいずれかに記載の組み換えウィルス。

【請求項 3 1】

遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制するために用いる、請求項 2 1 から 3 0 のいずれかに記載の組み換えウィルス。

【請求項 3 2】

遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス様粒子 (V L P) の放出を抑制するために用いる、請求項 2 1 から 3 1 のいずれかに記載の組み換えウィルス。

【請求項 3 3】

請求項 2 1 から 3 2 のいずれかに記載の組み換えウィルスを 10^6 C I U / m l 以上で含む水溶液。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、粒子形成能が低下または消失した (-) 鎖 RNA ウィルスベクターの検査方法および製造方法に関する。

背景技術

近年、センドイウィルス (S e V) を含む (-) 鎖 RNA ウィルスの組み換え技術の開発により、遺伝子導入ベクターとしての利用が広がっている (国際公開番号 W O 0 0 / 7 0 0 5 5 および W O 0 0 / 7 0 0 7 0) 。しかし、これらのベクターが持つ問題点の 1 つに、標的細胞へのベクター導入後に起こる細胞からのウィルスの 2 次放出がある。複製型ウィルスを感染させた細胞ではビリオンが形成され娘ウィルスが放出されるが、複製能を持たない F 欠損 S e V を導入した細胞等からもウィルス様粒子 (V L P : v i r u s l i k e p a r t i c l e) の放出が観察されている。このような V L P を生産しないウィルスベクターの開発が望まれる。

発明の開示

本発明は、粒子形成能が低下または消失した (-) 鎖 RNA ウィルスベクターの検査方法および製造方法を提供する。

M a t r i x (M) 蛋白はビリオン形成に中心的な役割をしていることが、センドイウィルス (S e V) や、他の (-) 鎖 RNA ウィルスで報告されている。例えば、v e s i c u l a r s t o m a t i t i s v i r u s (V S V) の M 蛋白の強発現のみでウィルス様粒子 (V L P : v i r u s l i k e p a r t i c l e) の発芽が観察されており (J u s t i c e , P . A . e t a l . , J . V i r o l . 6 9 ; 3 1 5 6 - 3 1 6 0 (1 9 9 5)) 、また P a r a i n f l u e n z a v i r u s の場合も M 蛋白のみの強発現で V L P が生じることが報告されている (C o r o n e l , E . C . e t a l . , J . V i r o l . 7 3 ; 7 0 3 5 - 7 0 3 8 (1 9 9 9)) 。このような M 蛋白単独での V L P 形成に関しては、全ての (-) 鎖 RNA ウィルスで観察されているわけではないが、M 蛋白がビリオン形成の c o r e になっていることは、全ての (-) 鎖 RNA ウィルスで共通していると認識することができる (G a r o f f , H . e t a l . , M i c r o

10

20

30

40

50

biol. Mol. Biol. Rev. 62; 1171 - 1190 (1998))。

ビリオン形成に対するM蛋白の具体的な役割に関して主に以下のようにまとめることができる。ビリオン形成の場となるのは細胞膜上のリピッドラフト (Lipid rafts) と呼ばれている場 (Simons, K. and Ikonen, E. Nature 387; 569 - 572 (1997)) であり、元々はTriton X-100のような非イオン性界面活性剤に不溶性の脂質画分として同定された (Brown, D. A. and Rose, J. K. Cell 68; 533 - 544 (1992))。インフルエンザウイルス (Ali, A. et al., J. Virol. 74; 8709 - 8719 (2000))、麻疹ウイルス (Measles virus; MeV: Manie, S. N. et al., J. Virol. 74; 305 - 311 (2000)) 及びSeV (Ali, A. and Nayak, D. P. Virology 276; 289 - 303 (2000)) 等でリピッドラフト (Lipid rafts) でのビリオン形成が証明されており、そこでM蛋白はエンベロープ蛋白 (spike蛋白とも表記される) やribonucleoprotein (RNP) を濃縮しビリオン形成を促進する、即ちウィルスアセンブリと出芽 (budding) の駆動力となっていると考えられる (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17; 3899 - 3908 (1998), Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73; 242 - 250 (1999))。実際に、M蛋白はspike蛋白のcytoplasmic tailと結合することが、インフルエンザウイルス (Zhang, J. et al., J. Virol. 74; 4634 - 4644 (2000)) 及びSeV (Sander son, C. M. et al., J. Virol. 67; 651 - 663 (1993)) 等で示されており、またRNPとの結合もインフルエンザウイルス (Ruigrok, R. W. et al., Virology 173; 311 - 316 (1989)) や、パラインフルエンザウイルス及びSeV (Coronel, E. C. et al., J. Virol. 75; 1117 - 1123 (2001)) 等で示されている。更に、M蛋白自身のオリゴマー形成への関与がSeV (Heggeness, M. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79; 6232 - 6236 (1982)) 及び水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV: Gaudin, Y. et al., Virology 206; 28 - 37 (1995), Gaudin, Y. et al., J. Mol. Biol. 274; 816 - 825 (1997)) 等で報告され、これら多くのウィルスコンポーネント及び脂質との結合能がウィルスアセンブリと出芽の駆動力としての役割を担わせていると考えることができる。

これらの知見から本発明者らは、2次放出粒子、即ちVLP放出抑制を目的とした改変の為には、M蛋白に着目すべきであると考えた。また、エンベロープ蛋白 (spike蛋白) に関しても改変によりVLP放出抑制に繋がる可能性も既に幾つか示唆されている。ビリオン形成が実際に減少した具体的な報告として以下の実験例がある。狂犬病ウイルス (Rabies virus; RV) の場合、G蛋白欠失型においてVLP形成が1/30に減少し (Mebatsion, T. et al., Cell 84; 941 - 951 (1996))、M蛋白欠失型においては1/500, 000以下に減少したと報告されている (Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73; 242 - 250 (1999))。また、麻疹ウイルス (MeV) の場合、M蛋白欠失型においてcell-to-cellの融合が亢進し (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17; 3899 - 3908 (1998))、これはビリオン形成が抑制された為であると考えることができる。また、同様の融合亢進がF或いはH蛋白のcytoplasmic tail (細胞質側のテール) の変異によっても生じている (Cathomen, T. et al., J. Virol. 72; 1224 - 1234 (1998))。特にSeVにおいては以下の点も明らかになっている。SeVのF及びHNが分泌経路に載っている間 (即ちゴルジ体等に存在している間)、それぞれ (F及びHN) のCytoplasmic tailがM蛋白と結合していることが示されている (Sander son, C. M. et al., J. Virol. 67; 651 - 663 (1993), Sande

erson, C. M. et al., J. Virol. 68; 69 - 76 (1994))。即ち、本発明者らは、ビリオン形成の場である細胞膜上のリピッドラフト (Lipid Rafts) へM蛋白が効率的に運搬されるためには、F及びHNのCytoplasmic tailとの結合が重要であり、M蛋白は細胞質に存在しながらF及びHNと結合することで、F及びHNの分泌経路に乗った形で細胞膜へ運搬されていると捉えた。

本発明者らは、実際に2次放出粒子、即ちVLP放出抑制を目的とした改変を行う場合、coreであるM蛋白を欠失させることが最も効果的である可能性が高いと考えた。但し、改変したウィルス遺伝子治療等の産業上に利用しようとした場合、ウィルスを生産する過程を考慮しなければならず、上記のようにRV (Me bat sion, T. et al., J. Virol. 73; 242 - 250 (1999)) 及びMeV (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17; 3899 - 3908 (1998)) で既に報告されているシステム、即ちvaccinia virus (VV) でdriveしたT7 polymeraseで発現を誘導するシステムでは高タイトーのウィルスは得られ難く、また発現誘導に利用したVVが、調製したM欠失型ウィルス溶液中へ混入することは避けられないこともあり、実応用可能なウィルスの生産は困難である。

M蛋白の欠失以外に効果的である方法として、M蛋白を細胞膜上のリピッドラフト (Lipid Rafts) へ運搬する役割が考察されているF及びHN蛋白を欠失させるか、あるいはそれらのcytoplasmic tailのみを欠失させる変異を導入することが考えられる。但し、特にSeVの場合はF欠失型 (W000 / 70070) 或いはHN欠失型 (Stricker, R. and Roux, L., J. Gen. Virol. 72; 1703 - 1707 (1991)) において多くのVLPが存在することが報告されている。即ち、効果は大きくはないと予想される。現在までの所、spike蛋白に関してcytoplasmic tail以外でVLP形成に影響すると予想される領域は同定されていない。またM蛋白質に関しても同様であり、明確にVLP形成に影響すると予想される領域は同定されていない。更に、産業上の利用の為にはウィルス生産に関して考慮する必要があり、デザインは容易ではない。

本発明者らはまず、VLP放出が抑制されたベクターを構築するための一つの解決法として、ウィルス遺伝子の温度感受性変異の利用を考えた。低温で生育するが高温では増殖できない幾つかの変異型ウィルスが報告されている。本発明者らは、特に高温でのビリオン形成が抑制されるような変異蛋白質、特にM蛋白或いはspike蛋白に変異を有するものを利用すれば、低温で (例えば32) ウィルス生産を行い、遺伝子治療等の実応用時はそれよりは高温 (例えば37) で行うことにより、VLP形成を抑制できる可能性があると考えた。この目的のために、本発明者らはM蛋白質およびHN蛋白質で報告されている、それぞれ3つ、計6つの温度感受性変異を持つ変異MおよびHN蛋白質をコードするF遺伝子欠損型の組み換えセンダイウィルスベクターを構築した。このウィルスのVLP放出を調べたところ、野生型ウィルスに比べ約1 / 10またはそれ以下であることが判明した。さらに、VLP放出が抑制されたセンダイウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を、抗M抗体を利用した免疫染色により解析した結果、野生型ウィルスを導入した細胞では見られる細胞表面のM蛋白質の凝集が、VLP放出抑制型ウィルスの場合は有意に減少しており、特に高温 (38) においてM蛋白の濃縮像が極端に減少していた。温度感受性変異M遺伝子を含むこのSeVを感染させた細胞におけるM蛋白質およびHN蛋白質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により詳しく調べたところ、低温 (32) においても細胞表面でのM蛋白の局在は有意に低下しており、微小管 (microtubule) の形態に近い形で観察された。さらに、高温 (37) ではM蛋白は微小管の中心体付近 (すなわちゴルジ体付近) に局在して存在していた。微小管脱重合剤を添加すると、温度感受性M遺伝子を持つSeVのみならず、野生型M遺伝子を持つSeVにおいても、M蛋白質の局在構造が破壊されたことから、M蛋白質は実際に微小管に沿って局在して機能している可能性が高いと判断された。以上の知見から、温度感受性変異導入ウィルスで二次放出粒子が減少しているのは、粒子形成の中心的な役割を担っていると考えられているM蛋白の細胞内局在の不全であると断定された。従って、M蛋白質の正

常な細胞内局在を妨げることにより、VLPの形成を効果的に抑制することができると考えられる。また、M蛋白質の機能には微小管との相互作用が重要であり、例えばM蛋白質がゴルジ体から微小管に沿って細胞内移動することを阻害するような遺伝子変異や薬剤を開発することにより、M蛋白の細胞内局在の不具合を生じさせ、結果的に二次放出粒子の減少を達成することが可能と判断される。すなわち本発明者らは、M蛋白質の局在に欠陥を生じさせるような変異を有する(-)鎖RNAウィルスベクターを調製することによって、粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターを得ることができることを見出した。

例えば、M遺伝子、あるいはF遺伝子およびHN遺伝子といったスパイク蛋白質をコードする遺伝子に変異を加え、これら変異遺伝子を持つウィルスベクターについてM蛋白質の局在に異常を持つベクター、特にM蛋白質の細胞表面の凝集が低下または消失しているものをスクリーニングすることによって、効果的に粒子形成能が低下または消失した組み換えウィルスベクターを得ることが可能となる。これにより、例えばspike蛋白のcytoplasmic tailまたはそれ以外の任意の領域の改変によるVLP産生の抑制を試験することが可能である。さらに、M蛋白への改変も含め、多くの変異型ウィルスをM蛋白の細胞膜への局在の有無でスクリーニングすることもできる。これらの方法は、SeVだけではなく、他の(-)鎖RNAウィルスで共通して適用することが可能である。

さらに本発明者らは、P遺伝子およびL遺伝子に変異を導入することによってウィルスの2次放出を抑制するとともに、細胞傷害性を低下させ、挿入遺伝子をより長期に発現できるF欠損型ベクターを構築した。具体的には、E86KまたはL511Fの置換変異を有するSeV P蛋白質遺伝子、ならびにN1197SおよびK1795Eの置換変異を有するSeV L蛋白質遺伝子を用いた。PおよびL遺伝子の両者に変異を導入することで、これらの遺伝子に変異のないベクターに比べ、細胞にベクターを導入した後における、導入遺伝子を発現する細胞数の減少が有意に抑制され、細胞傷害性およびウィルス様粒子の2次放出も明確に低下した。また本発明者らは、このP蛋白質およびL蛋白質の変異と、上記のM蛋白質およびHN蛋白質の温度感受性変異とを組み合わせ、M、HN、P、およびL蛋白質の4種の蛋白質に変異を有するウィルスを構築した。その結果、この変異組み換えウィルスは細胞傷害性の顕著な減弱が認められた。特にL511のアミノ酸が置換置換されたP蛋白質遺伝子を持つSeVは2次放出粒子が顕著に減少した。

また本発明者らは、M遺伝子をウィルスから欠失させることによって、ウィルスを導入した細胞におけるM蛋白質の細胞表面の凝集が完全に欠如したウィルスの構築を試みた。この目的のために、本発明者らはM欠失型ウィルスの生産に利用可能なM蛋白持続発現細胞を初めて構築した。この細胞を利用することにより、高タイターで他のウィルスの混入を否定した遺伝子治療用ベクターの生産が初めて可能になった。持続発現細胞を利用したM蛋白質のトランス供給を行う、本発明のM欠失型SeV生産システムにおいて初めて、実用に適したM欠失型の(-)鎖RNAウィルスが提供された。M遺伝子を欠失した感染性ウィルス粒子は産生細胞の培養上清中に 10^7 C I U / m l 以上の力価で回収され、このウィルスを導入した細胞では、ウィルス様粒子の2次放出はほとんど抑制され、細胞傷害性も低下した。さらに本発明者らは、M/F両蛋白質を発現するヘルパー細胞を新たに作出し、これを用いてM/F両遺伝子を欠失した感染性ウィルス粒子を初めて回収することに成功した。ウィルスは産生細胞の培養上清中に最大 10^8 C I U / m l 以上の力価で回収され、得られたウィルスの2次粒子形成能はほとんど消失していた。またM/F両遺伝子を欠失したウィルスベクターは、それぞれ単独の遺伝子を欠失させた場合に比べ細胞傷害性が顕著に低下していることが確認された。このウィルスベクターは、神経細胞に対してインピボおよびインピトロで効率良く遺伝子を導入できることが示され、非分裂細胞を含む多くの細胞に感染能を有する遺伝子導入ベクターとしての利用が期待される。

本発明は、粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターの検査方法および製造方法に関し、より具体的には、

(1) (-)鎖RNAウィルスベクターの粒子形成能を検査する方法であって、該ベクタ

10

20

30

40

50

- ーを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出する工程を含む方法、
- (2) 粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターをスクリーニングする方法であって、
- (a) 該ベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出する工程、
- (b) 該局在が低下または消失したベクターを選択する工程、を含む方法、
- (3) M蛋白質の局在が、M蛋白質の細胞表面の凝集である、(1)または(2)に記載の方法、
- (4) (-)鎖RNAウィルスベクターの粒子形成能を低下または消失させる遺伝子をスクリーニングする方法であって、
- (a) 被検遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出する工程、
- (b) 該局在を低下または消失させる遺伝子を選択する工程、を含む方法、
- (5) M蛋白質の局在が、M蛋白質の細胞表面の凝集である、(4)に記載の方法、
- (6) 被検遺伝子が、(-)鎖RNAウィルスのM、F、およびHN遺伝子からなる群より選択される遺伝子の変異体である、(4)または(5)に記載の方法、
- (7) 粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターの製造方法であって、(4)から(6)のいずれかに記載の方法により同定または単離され得る遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを、該遺伝子によるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で再構成させる工程、を含む方法、
- (8) 粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターの製造方法であって、M遺伝子の欠損または変異により該M遺伝子の発現産物の局在が低下または消失する(-)鎖RNAウィルスベクターを、機能的M蛋白質が持続的に発現する条件下で再構成させる工程、を含む方法、
- (9) 前記工程が、細胞表面における遺伝子産物の凝集が低下または消失する温度感受性変異M遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを、許容温度で再構成させる工程である、(8)に記載の方法、
- (10) 温度感受性変異M遺伝子が、センダイウィルスM蛋白質のG69、T116、およびA183からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換された(-)鎖RNAウィルスM蛋白質をコードする遺伝子である、(9)に記載の方法、
- (11) 前記工程が、M遺伝子が欠損している(-)鎖RNAウィルスベクターを、再構成を行う細胞の染色体に組み込まれたM遺伝子が発現する条件下で再構成させる工程である、(8)に記載の方法、
- (12) (-)鎖RNAウィルスベクターが、さらにHNおよび/またはF遺伝子が欠損しているか、または温度感受性変異HNおよび/または温度感受性変異F遺伝子を保持する、(7)から(11)のいずれかに記載の方法、
- (13) 温度感受性変異HN遺伝子が、センダイウィルスHN蛋白質のA262、G264、およびK461からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換された(-)鎖RNAウィルスHN蛋白質をコードする遺伝子である、(12)に記載の方法、
- (14) (-)鎖RNAウィルスベクターが、さらにPおよび/またはL遺伝子に変異を保持する、(7)から(13)のいずれかに記載の方法、
- (15) P遺伝子の変異が、センダイウィルスP蛋白質のE86および/またはL511に相当する(-)鎖RNAウィルスP蛋白質のアミノ酸部位が他のアミノ酸に置換された変異である、(14)に記載の方法、
- (16) L遺伝子の変異が、センダイウィルスL蛋白質のN1197および/またはK1795に相当する(-)鎖RNAウィルスL蛋白質のアミノ酸部位が他のアミノ酸に置換された変異である、(14)または(15)に記載の方法、
- (17) ベクターの再構成を35以下で行う工程を含む、(7)から(16)のいずれかに記載の方法、

(1 8) (-) 鎖 R N A ウィルスがパラミクソウィルスである、(1) から (1 7) のいずれかに記載の方法、

(1 9) パラミクソウィルスがセンダイウィルスである、(1 8) に記載の方法、

(2 0) (7) から (1 9) のいずれかに記載の方法により製造された、粒子形成能が低下または消失した組み換え (-) 鎖 R N A ウィルスベクター、

(2 1) 組み換え (-) 鎖 R N A ウィルスであって、機能的 M 蛋白質を有するが、該ウィルスのゲノムにおいて M 蛋白質をコードする配列が欠損しているウィルス、

(2 2) 下記 (a) から (d) からなる群より選択される少なくとも 1 つの性質を有する組み換え (-) 鎖 R N A ウィルス、

(a) 該ウィルスのゲノムにコードされる M 蛋白質において、センダイウィルス M 蛋白質の G 6 9、T 1 1 6、および A 1 8 3 からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、 10

(b) 該ウィルスのゲノムにコードされる H N 蛋白質において、センダイウィルス H N 蛋白質の A 2 6 2、G 2 6 4、および K 4 6 1 からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、

(c) 該ウィルスのゲノムにコードされる P 蛋白質において、センダイウィルス P 蛋白質の E 8 6 または L 5 1 1 のアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、

(d) 該ウィルスのゲノムにコードされる L 蛋白質において、センダイウィルス L 蛋白質の N 1 1 9 7 および / または K 1 7 9 5 のアミノ酸あるいは他の (-) 鎖 R N A ウィルス M 蛋白質の相同部位のアミノ酸部位に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、 20

(2 3) 少なくとも (a) および (b) の性質を有する、(2 2) に記載のウィルス、

(2 4) 少なくとも (c) および (d) の性質を有する、(2 2) に記載のウィルス、

(2 5) (a) から (d) の全ての性質を有する、(2 2) に記載のウィルス、

(2 6) 該ウィルスのゲノムにおいてスパイク蛋白質をコードする配列の少なくとも 1 つをさらに欠損する、(2 1) から (2 5) のいずれかに記載のウィルス、

(2 7) スパイク蛋白質が F 蛋白質である、(2 6) に記載のウィルス、

(2 8) (-) 鎖 R N A ウィルスがパラミクソウィルスである、(2 1) から (2 7) のいずれかに記載のウィルス、 30

(2 9) パラミクソウィルスがセンダイウィルスである、(2 8) に記載のウィルス、

(3 0) 遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させるために用いる、(2 1) から (2 9) のいずれかに記載の組み換えウィルス、

(3 1) 遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制するために用いる、(2 1) から (3 0) のいずれかに記載の組み換えウィルス、

(3 2) 遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス様粒子 (V L P) の放出を抑制するために用いる、(2 1) から (3 1) のいずれかに記載の組み換えウィルス、

(3 3) (2 1) から (3 2) のいずれかに記載の組み換えウィルスを 10^5 C I U / m l 以上で含む水溶液、に関する。 40

本発明は、(-) 鎖 R N A ウィルスベクターを導入した細胞における M 蛋白質の局在を検出する工程を含む、該ベクターの粒子形成能を検査する方法を提供する。本発明者らは、ベクター産生細胞における M 蛋白質の局在が、(-) 鎖 R N A ウィルスベクターの粒子形成能と密接に関連することを実証した。粒子形成が行われる細胞では、M 蛋白質は細胞表面に強く検出され、より厳密には細胞表面に凝集して存在している。しかし、粒子形成能が低下したベクターを感染させた細胞では、細胞表面への M 蛋白質の局在は減少し、細胞質中により多く検出されるようになる。さらに粒子形成能が喪失する条件では、M 蛋白質は核の近くに濃縮する。この場合、M 蛋白質はゴルジ体付近と予想される部位に濃縮しており、微小管が関与する M 蛋白質輸送に異常を来していることが示唆される。すなわち、細胞における M 蛋白質の局在は、ベクターの粒子形成能と相関しており、M 蛋白質の局在 50

を検出することによりベクターの粒子形成能を検査することができる、本発明の検査では、ベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出し、M蛋白質の局在を粒子形成能と関連付けることにより行う。すなわち細胞におけるM蛋白質の局在が低下または消失するベクターは粒子形成能が低く、その程度が重篤であるほど粒子形成能が低下する。具体的には、上記のように、M蛋白質の細胞表面における凝集が低下するほど、該ベクターの粒子形成能は低いと判断され、特にM蛋白質の細胞表面における凝集が消失したベクターは、粒子形成能が喪失していると判断される。また、より巨視的には、細胞表面に局在するM蛋白質が減少するほどベクターの粒子形成能は低いと判断され、細胞表面に局在する代わりに細胞質や核周辺にM蛋白質が局在するようなベクターの粒子形成能は低い。特に核付近に濃縮してM蛋白質が局在したり、ゴルジ体領域にM蛋白質が凝縮している場合は、ベクターの粒子形成能はほとんどまたは完全に喪失していると判断される。細胞におけるM蛋白質の局在、特に細胞表面のM蛋白質の凝集が抑制されたベクターを開発することにより、感染細胞からのウィルス様粒子の放出を抑制することができる。

本発明において細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失とは、例えば細胞におけるM蛋白質の局在の欠陥である。すなわち、粒子形成能またはVLP形成能を有するパラミクソウィルス（例えば野生型パラミクソウィルスおよびVLP形成能を有するスパイク蛋白質遺伝子欠損型パラミクソウィルスなど）を感染させた細胞におけるM蛋白質の局在（これをM蛋白質の正常な局在とも言う）が有意に破壊されることである。具体的には細胞におけるM蛋白質の局在の欠陥とは、粒子形成能またはVLP形成能を持つベクターを感染させた細胞におけるM蛋白質の局在の変化または消失である。正常な粒子形成能またはVLP形成能を持つパラミクソウィルスを感染させた細胞では、M蛋白質は細胞表面付近に局在し、より詳細には細胞表面に凝集して存在している。本発明においてこのようなM蛋白質の正常な局在が変化または消失することを、それぞれM蛋白質の局在の低下または消失と言う。本発明においてM蛋白質の局在の欠陥には、例えばM蛋白質が異常な（M蛋白質の正常な局在とは違った）局在を示すことであってよく、例えば細胞表面における凝集の低下および喪失、細胞表面への発現量の低下、細胞質におけるM蛋白質レベルの上昇、細胞質内での凝縮（例えば核周辺での凝縮）、ならびに細胞全体におけるM蛋白質量の低下および喪失などを、本発明におけるM蛋白質の局在の欠陥として特に挙げることができる。

細胞におけるM蛋白質の局在の検出は、細胞分画による方法、および免疫染色によりM蛋白質の局在を直接検出する方法などで実施することができる。免疫染色では、例えば蛍光標識された抗体を用いてM蛋白質を染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察することができる。また、細胞を溶解後、公知の細胞分画法により細胞画分を得て、M蛋白質に対する抗体を用いた免疫沈降またはウェスタンブロッティング等によりM蛋白質が含まれる画分を同定することにより局在を調べることができる。粒子形成能を持つベクターを感染させた細胞では、M蛋白質は主に細胞膜に存在する。細胞膜におけるM蛋白質の局在が低下していれば、そのウィルスは、粒子形成が低下していると判断される。本発明の方法においては、特に細胞表面のM蛋白質の凝集を検出することによりM蛋白質の局在を調べることが好ましい。

細胞表面のM蛋白質の凝集を検出するには、細胞分画による方法、および免疫染色により、M蛋白質の細胞内局在を直接検出する方法などが考えられる。ビリオン形成の場となるのは細胞膜上のLipid raftsと呼ばれている場であり、Triton X-100のような非イオン性界面活性剤に不溶性の脂質画分である。M蛋白質はspike蛋白、RNP及びM蛋白自身更には脂質との結合能により、このリピッドラフト（Lipid rafts）でウィルスコンポーネントを凝集すると考えられていることから、リピッドラフト（Lipid rafts）分画後、電気泳動等で検出されるM蛋白は凝集したM蛋白質を反映していると捉えることができる。すなわち、検出されるM蛋白質量が低下していれば、細胞表面のM蛋白質の凝集が低下していると判断される。一方、本発明者が利用した細胞免疫染色により細胞内局在を検出する方法では、細胞膜上のおそらくはリピッドラフト（Lipid rafts）でのM蛋白の凝集を直接観察することが可能

である。この場合、細胞免疫染色に利用可能な抗M抗体の取得が必須となる。この方法で検出した場合、M蛋白質が凝集していれば、細胞膜近傍に強い濃縮像が観察され、M蛋白質の凝集がなければ濃縮像はなく細胞膜の輪郭が明確でなくなり、細胞質全体が薄く染色される。このように濃縮像が少ない或いは濃縮像がなく、さらに好ましくは細胞膜の輪郭がぼやけて観察され、細胞質全体が薄く染色された場合に、細胞表面のM蛋白質の凝集が低下していると判断される。M蛋白質の細胞表面における凝集が低下しているこれらのウィルスは、粒子形成が抑制されている。

上記の検出方法を利用することによって、粒子形成能が低下または消失した（-）鎖RNAウィルスベクターをスクリーニングすることが可能である。このスクリーニング方法は、（a）該ベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出する工程、および（b）該局在が低下または消失した（すなわち正常なM蛋白質の局在が変化した）ベクターを選択する工程、を含む方法である。局在の低下または消失は、上記のようにM蛋白質の正常な局在が有意に破壊されることを言う。また局在の低下または消失には、局在の完全な喪失や、M蛋白質自体が喪失している場合なども含む。局在の低下または消失は、全ての細胞において局在が低下または消失する場合のみならず、一部の細胞において局在が低下または消失する場合、細胞内の一部において局在が低下または消失する場合なども含む。さらに、特定の条件下で局在が低下または消失する場合も含む。例えば、特定の温度以下では野生型と同等の局在が起こるが、その温度より高い温度において野生型よりも局在性が低下または消失する場合などを含む。温度条件については、哺乳動物体内に相当する約37～38℃において野生型ウィルスに比べ局在が低下または消失することが好ましい。例えば種々のウィルス変異株等を細胞に感染させ、この細胞においてM蛋白質の局在を検出する。M蛋白質の局在が低下または消失するウィルス株を選択すれば、粒子形成能が低下または消失したウィルスを単離することができる。

特に本発明のスクリーニングにおいては、M蛋白質の細胞表面の凝集を指標にした検出方法を利用することによって、粒子形成能が低下または消失した（-）鎖RNAウィルスベクターをスクリーニングすることが好ましい。このスクリーニング方法は、（a）該ベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の細胞表面の凝集を検出する工程、および（b）該凝集が低下または消失したベクターを選択する工程、を含む方法である。凝集の低下とは、凝集が有意に低下することを言う。また凝集の低下には、凝集の完全な喪失や、M蛋白質自体が喪失している場合なども含む。凝集の低下または消失は、全ての細胞において凝集が低下または消失する場合のみならず、一部の細胞の細胞表面において凝集が低下または消失する場合、細胞表面の一部において凝集が低下または消失する場合などを含む。さらに、特定の条件下で凝集が低下または消失する場合も含む。例えば、特定の温度以下では野生型と同等の凝集が起こるが、その温度より高い温度において野生型よりも凝集が低下または消失する場合などを含む。温度条件については、哺乳動物体内に相当する約37～38℃において野生型ウィルスよりも凝集が低下または消失することが好ましい。例えば種々のウィルス変異株等を細胞に感染させ、この細胞においてM蛋白質の細胞表面における局在を検出する。M蛋白質の細胞表面における凝集が低下または消失しているウィルス株を選択すれば、粒子形成能が低下または消失したウィルスを単離することができる。本発明において粒子形成能とは、ウィルスベクターを感染させた細胞において、感染性ウィルス粒子および非感染性ウィルス粒子（これをウィルス様粒子という）を放出（これを2次放出という）するベクターの能力を言う。本発明において粒子形成能の低下および抑制とは、粒子形成能が有意に低下することを言う。また粒子形成能の低下には、粒子形成能が完全に消失する場合を含む。粒子形成能の低下または消失は、ウィルスベクターの平均的な粒子形成能が低下している場合が含まれ、例えば一部の感染細胞において感染したウィルスの粒子形成能が低下または消失する場合、一部の感染ウィルスにおいて粒子形成能が低下または消失する場合などを含む。さらに、特定の条件下で粒子形成能が低下または消失する場合も含む。例えば、特定の温度以下では野生型と同等の粒子形成が起こるが、その温度より高い温度において野生型よりも粒子形成能が低下または消失する場合などを含む。温度条件については、哺乳動物体内に相当する約37～38℃（例えば37℃）

10

20

30

40

50

において野生型ウィルスよりも粒子形成能が低下または消失することが好ましい。

ウィルスの粒子形成能の低下は、例えば統計学的に有意（例えば有意水準5%またはそれ以下の%値）に低下している。統計学的な検定は、例えばスチューデントのt検定またはマンホイットニーU検定などにより行うことができる。粒子形成能は、1/2以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/30以下、より好ましくは1/50以下、より好ましくは1/100以下、より好ましくは1/300以下、より好ましくは1/500以下に低下している。

また、粒子形成能の消失には、量的または機能的に粒子形成が消失することを含む。粒子形成能の量的な消失は、例えば、VLPが検出限界以下であることを言う。このような場合、VLPは 10^3 /ml以下、好ましくは 10^2 /ml以下、より好ましくは 10^1 /ml以下である。粒子形成能の機能的な消失は、例えばVLPが含まれる可能性のある試料を細胞にトランスフェクションしても検出可能な感染価を示さないことを言う。ウィルス粒子は、電子顕微鏡等で直接確認することができる。あるいは、ウィルスに含まれる核酸または蛋白質を指標に検出および定量することが可能である。例えば、ウィルス粒子中に含まれるゲノム核酸をPCR等の一般的な核酸検出法で検出および定量してもよい。あるいは、外来遺伝子を持つウィルス粒子は、これを細胞に感染させ該遺伝子の発現を検出することにより定量することができる。感染性を持たないウィルス粒子（VLP等）は、トランスフェクション試薬と組み合わせて細胞に導入し、遺伝子発現を検出することにより定量することができる。具体的には、例えばDOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland; Cat No. 1811169)などのリポフェクション試薬を用いて行うことができる。ウィルス粒子を含むあるいは含まない溶液100 μ lにDOSPER 12.5 μ lを混合し、室温で10分放置後、6wellプレートにコンフルエントに培養した細胞に15分毎に振盪しながらトランスフェクションする。2日後に感染細胞の有無を検出することでVLPの検出が可能である。ウィルス粒子または感染価は、また、例えばCIU測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。トランスフェクションは、例えばリポフェクション試薬を用いて行うことができる。トランスフェクションは、例えばDOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland; Cat No. 1811169)を用いて行うことができる。VLPを含むあるいは含まない溶液100 μ lにDOSPER 12.5 μ lを混合し、室温で10分放置後、6wellプレートにコンフルエントに培養した細胞に15分毎に振盪しながらトランスフェクションする。2日後に感染細胞の有無を検出することでVLPの検出が可能である。

スクリーニングに用いる被検ウィルスは、天然に存在する変異株などであってもよく、あるいは人為的に作出した変異体であってもよい。スクリーニングにより選択されたウィルスは、粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターとして用いることができる。

また、上記の検出方法を利用することによって、(-)鎖RNAウィルスベクターの粒子形成能を低下または消失させる遺伝子をスクリーニングすることが可能である。このスクリーニング方法は、(a)被検遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を検出する工程、および(b)該局在を低下または消失させる遺伝子を選択する工程、を含む。局在の低下または消失は、上記したように検出すればよい。例えば、局在として細胞表面におけるM蛋白質の凝集を指標とするスクリーニ

10

20

30

40

50

ング方法は、(a)被検遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の細胞表面の凝集を検出する工程、および(b)該凝集を低下または消失させる遺伝子を選択する工程、を含む。例えば種々のウィルス遺伝子変異体やその他の遺伝子を挿入したウィルスベクターを作製し、これを細胞に感染させ、この細胞において感染させたウィルスから発現されるM蛋白質の細胞表面における局在を検出する。M蛋白質の細胞表面における凝集が低下または消失しているウィルスベクターが保持する遺伝子を選択すれば、粒子形成能を低下または消失させる遺伝子を単離することができる。スクリーニングに用いる被検遺伝子に特に制限はなく、ウィルスや細胞に由来する遺伝子、あるいは天然に存在するまたは人為的に作出したそれらの変異遺伝子などであってよい。好適には、被検遺伝子として(-)鎖RNAウィルスのM、F、およびHN遺伝子からなる群より選択される遺伝子の変異体を用いる。また、これらと同等の機能を有する遺伝子として、(-)鎖RNAウィルスの中で、M遺伝子はM1、FおよびHN遺伝子はそれぞれGおよびHを表記される場合もある。本発明においてM遺伝子にはM1遺伝子が、FおよびHN遺伝子にはそれぞれGおよびH遺伝子が含まれる。変異体とは、例えば野生型遺伝子産物に対して1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿入などを有する蛋白質をコードする遺伝子などである。被検遺伝子として変異M遺伝子を用いる場合には、工程(a)において被検変異M遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞における該変異M遺伝子の発現産物の局在を検出する。被検遺伝子として変異Fおよび/またはHN遺伝子を用いる場合には、工程(a)において被検変異変異Fおよび/またはHN遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを導入した細胞において、該ベクターから発現されるM蛋白質の局在を検出する。細胞におけるM蛋白質の局在を検出し、M蛋白質の局在を低下または消失させる遺伝子を選択する。例えば、M蛋白質の局在として細胞表面の凝集を指標とする場合には、細胞表面のM蛋白質の凝集を検出し、M蛋白質の凝集が低下または消失するような遺伝子を選択する。また、被検遺伝子として、例えばM、F、またはHN蛋白質等のウィルス遺伝子産物に相互作用し得る蛋白質をコードする他の遺伝子を用いて、同様のスクリーニングを行うこともできる。得られた遺伝子は、粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターを製造するために用いることができる。

ここで「細胞におけるM蛋白質の局在を低下または消失させる遺伝子」とは、該遺伝子に依存してM蛋白質の細胞における局在を低下または消失させる(すなわちM蛋白質の正常な局在を変化させる)遺伝子を言う。例えば該遺伝子を発現させた場合にM蛋白質の局在に欠陥が生じる場合、および該遺伝子を発現させ、さらにその他の環境を変化させる(例えば、pH、塩濃度、温度、化合物の添加、他の遺伝子の共発現など)ことにより、M蛋白質の局在が低下または消失する場合などが含まれる。

また、このスクリーニングを利用すれば、上記の粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターのスクリーニングにおいて単離されたウィルスから、粒子形成能の低下または消失に関与する遺伝子を特定することもできる。すなわち、単離されたウィルスが持つ遺伝子を被検遺伝子として用いて上記の粒子形成能を低下または消失させる遺伝子のスクリーニングを行う。得られた遺伝子は、粒子形成能が低下または消失した組み換えウィルスの製造に用いられ得る。

上記で単離された遺伝子を用いて粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターを製造する場合、本発明者らは、該遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターを、該遺伝子によるM蛋白質の局在の低下または消失、例えばM蛋白質の細胞表面の凝集の低下または消失を、持続的に相補する条件下で再構成させる工程、を含む方法により効率的に製造できることを見出した。本発明の方法により製造された、粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターは、標的細胞導入後にウィルス様粒子を放出しないという利点がある。

「持続的に相補する条件」とは、(-)鎖RNAウィルスベクターを再構成させるのに十分な時間相補する条件を言う。通常、少なくとも2日間、好ましくは4日間以上、より好ましくは7日間以上、さらに好ましくは10日間以上、最も好ましくは14日間以上、細

10

20

30

40

50

胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失、例えばM蛋白質の細胞表面の凝集の低下または消失を持続的に相補する条件を言う。

例えば、ある条件下で細胞表面の凝集が低下する変異を有するM遺伝子を有するベクターを製造するには、細胞表面の凝集の低下を抑制する条件を持続的に維持してウィルスの再構成を行う。例えば、変異形質が現れない条件下で再構成を行ってもよいし、あるいは細胞において野生型M遺伝子を持続的に発現させ、M変異を相補してもよい。また、例えば、M遺伝子を欠損するベクターを製造する場合においても、野生型M遺伝子を細胞で持続的に発現させて再構成を行う。

本発明において、ウィルスベクターの再構成を低温で行うと、M蛋白質の正常な局在の低下または消失が抑制され、ウィルス再構成の効率が有意に上昇することが判明した。特に粒子形成能が低下する変異遺伝子（または遺伝子欠失）を有するベクターの再構成においては、37 および 38 での再構成の効率は低く、細胞傷害性も観察され、35 以下好ましくは32 において初めて効率的な再構成が可能となった。従って、本発明におけるウィルスベクターの再構成にあたっては、温度を35 以下で行うことが好ましい。ウィルス再構成は、より好ましくは34 以下、さらに好ましくは33 以下、最も好ましくは32 またはそれ以下で行う。

特に本発明は、このような方法の1つとしてM遺伝子が欠損または変異した（-）鎖RNAウィルスベクターを再構成する方法を提供する。すなわち本発明は、粒子形成能が低下または消失した組み換え（-）鎖RNAウィルスベクターの製造方法であって、M遺伝子の欠損または変異によりM蛋白質の局在が低下または消失する（-）鎖RNAウィルスベクター、具体的には例えばM蛋白質の細胞表面の凝集が低下または消失する（-）鎖RNAウィルスベクターを、機能的M蛋白質が持続的に発現する条件下で再構成させる工程、を含む方法に関する。「機能的M蛋白質」とは、野生型M蛋白質またはそれと同等の機能を有する蛋白質を言う。具体的には、細胞表面の凝集を起こし、（-）鎖RNAウィルスベクターの粒子形成を支持する活性を有する蛋白質を言う。

この方法の特に好ましい一態様としては、細胞における遺伝子産物の局在が低下または消失する温度感受性変異M遺伝子を保持する（-）鎖RNAウィルスベクターを、許容温度で再構成させる工程を含む方法が挙げられる。温度感受性変異とは、低温（例えば32）に比べ、高温（例えば37）において有意に活性が低下する変異を言う。具体的には、例えば細胞表面における遺伝子産物の凝集が低下または消失する温度感受性変異M遺伝子を保持する（-）鎖RNAウィルスベクターを、許容温度で再構成させる工程を含む方法である。M遺伝子の温度感受性変異としては特に限定されるものではないが、例えばセンダイウィルスのM蛋白質のG69、T116、およびA183からなる群より選択される少なくとも1つ、好ましくは任意に選択される2つ、さらに好ましくは3つすべてのアミノ酸部位、あるいは他の（-）鎖RNAウィルスM蛋白質のそれらと相同な部位に変異を含むものを好適に用いることができる。ここでG69とはM蛋白質の69番目のアミノ酸Gly、T116とはM蛋白質の116番目のアミノ酸Thr、A183とはM蛋白質の183番目のアミノ酸Alaを指す。

M蛋白質をコードする遺伝子（M遺伝子）は、（-）鎖RNAウィルスで広く保存されており、ウィルスのヌクレオカプシッドとエンベロープの両者に相互作用する機能を有することが知られている（Garoff, H. et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 117-190 (1998);）。また、SeV M蛋白質においてamphiphilic α -helixと予想されている104-119 (104-KACTDLRITVRRTVRA-119/配列番号: 38)は粒子形成に重要な領域として同定されている（Genevieve Mottet, et al., J. Gen. Virol. 80: 2977-2986 (1999)）が、当該領域は（-）鎖RNAウィルス間で良く保存されている。M蛋白質のアミノ酸配列は（-）鎖RNAウィルスで類似しており、特にパラミクソウィルス亜科においては既知のM蛋白質は共通して全長約330~380アミノ酸からなる塩基性蛋白質であり、全領域にわたって類似性があるが、特にC端側半分での類似性が高い（Gould, A. R. Virus Res. 4

10

20

30

40

50

3 : 17 - 31 (1996)、Harcourt, B. H. et al., Virology 271 : 334 - 349 (2000))。従って、例えばSeV M蛋白質のG69、T116、及びA183と相同なアミノ酸は容易に同定することが可能である。

SeV M蛋白質のG69、T116、及びA183と対応する他の(-)鎖RNAウィルスM蛋白質の相同な部位のアミノ酸は、当業者であれば、例えばBLASTなどのアミノ酸配列のホモロジー検索プログラム(アライメント作成機能を持つもの)またはCLUSTAL Wなどのアライメント作成プログラムを用いてSeV M蛋白質のアミノ酸と整列化することにより同定することができる。例えばSeV M蛋白質のG69に相当する各M蛋白質の相同部位としては、human parainfluenza virus - 1 (HPIV - 1) (括弧は略称)であればG69、human parainfluenza virus - 3 (HPIV - 3)であればG73、phocine distemper virus (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればG70、dolphin morbillivirus (DMV)であればG71、peste - des - petits - ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、およびrinderpest virus (RPV)であればG70、Hendra virus (Hendra)およびNipah virus (Nipah)であればG81、human parainfluenza virus - 2 (HPIV - 2)であればG70、human parainfluenza virus - 4a (HPIV - 4a)およびhuman parainfluenza virus - 4b (HPIV - 4b)であればE47、mumps virus (Mumps)であればE72が挙げられる(文字と番号はアミノ酸とその位置を表す)。また、SeV M蛋白質のT116に相当する各M蛋白質の相同部位としては、human parainfluenza virus - 1 (HPIV - 1)であればT116、human parainfluenza virus - 3 (HPIV - 3)であればT120、phocine distemper virus (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればT104、dolphin morbillivirus (DMV)であればT105、peste - des - petits - ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)およびrinderpest virus (RPV)であればT104、Hendra virus (Hendra)およびNipah virus (Nipah)であればT120、human parainfluenza virus - 2 (HPIV - 2)およびsimian parainfluenza virus 5 (SV5)であればT117、human parainfluenza virus - 4a (HPIV - 4a)およびhuman parainfluenza virus - 4b (HPIV - 4b)であればT121、mumps virus (Mumps)であればT119、Newcastle disease virus (NDV)であればS120が挙げられる。SeV M蛋白質のA183に相当する各M蛋白質の相同部位としては、human parainfluenza virus - 1 (HPIV - 1)であればA183、human parainfluenza virus - 3 (HPIV - 3)であればF187、phocine distemper virus (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればY171、dolphin morbillivirus (DMV)であればY172、peste - des - petits - ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)およびrinderpest virus (RPV)であればY171、Hendra virus (Hendra)およびNipah virus (Nipah)であればY187、human parainfluenza virus - 2 (HPIV - 2)であればY184、simian parainfluenza virus 5 (SV5)であればF184、human parainfluenza virus - 4a (HPIV - 4a)およびhuman parainfluenza virus - 4b (HPIV - 4b)であればF188、mumps virus (Mumps)で

あれば F 1 8 6、Newcastle disease virus (NDV) であれば Y 1 8 7 が挙げられる。ここに挙げたウィルスにおいて、それぞれの M 蛋白質に上記の 3 つの部位のいずれか、好ましくは任意の 2 部位の組み合わせ、さらに好ましくは 3 つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異 M 蛋白質をコードするゲノムを有するウィルスは、本発明において好適できる。

アミノ酸変異は、所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えばアミノ酸は、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などのグループに分類することができるが、あるアミノ酸について、そのアミノ酸が属するグループのアミノ酸以外のアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、塩基性アミノ酸であれば、酸性または中性アミノ酸への置換、極性アミノ酸であれば非極性アミノ酸への置換、20 種の天然のアミノ酸の平均分子量より大きい分子量を持つアミノ酸であれば、その平均分子量より小さいアミノ酸への置換、逆にその平均分子量より小さいアミノ酸であれば、それより大きいアミノ酸への置換などが挙げられるが、それに限定されない。例えばセンダイウィルス M 蛋白質における G 6 9 E、T 1 1 6 A、および A 1 8 3 S からなる群より選択される変異あるいはそれらと相同な変異を含むものを好適に用いることができる。ここで G 6 9 E とは、M 蛋白質の 6 9 番目のアミノ酸 G l y が G l u に置換された変異、T 1 1 6 A とは、M 蛋白質の 1 1 6 番目のアミノ酸 T h r が A l a に置換された変異、A 1 8 3 S とは、M 蛋白質の 1 8 3 番目のアミノ酸 A l a が S e r に置換された変異を言う。すなわち、センダイウィルス M 蛋白質の G 6 9、T 1 1 6、および A 1 8 3 あるいは他のウィルス M 蛋白質の相同部位を、それぞれ G l u (E)、A l a (A)、および S e r (S) へ置換することができる。これらの変異は組み合わせて有していることが好ましく、特に上記 3 変異の全てを保持していることがより好ましい。M 遺伝子への変異の導入は、公知の変異導入方法に従って実施することができる。例えば実施例に記載のように目的の変異を入れたオリゴヌクレオチドを用いて導入することが可能である。

また、例えば麻疹ウィルスにおいては、M 蛋白質のモノクローナル抗体に対するエピトープが変化している温度感受性株の P 2 5 3 - 5 0 5 (M o r i k a w a , Y . e t a l . , K i t a s a t o A r c h . E x p . M e d . , 6 4 ; 1 5 - 3 0 (1 9 9 1)) の M 遺伝子配列を導入することが想定される。また、SeV M 蛋白質の 1 1 6 番目の T h r に対応する麻疹ウィルス M 蛋白質の 1 0 4 番目の T h r、またはムンプスウィルスの M 蛋白質の 1 1 9 番目の T h r を他のアミノ酸（例えば A l a）に置換してもよい。

また、上記本発明の方法の特に好ましい他の 1 つの態様としては、M 遺伝子が欠損している（-）鎖 RNA ウィルスベクターを、再構成を行う細胞の染色体に組み込まれた M 遺伝子が発現する条件下で再構成させる工程を含む方法が挙げられる。M 遺伝子が欠損するとは、機能的 M 蛋白質をコードする配列が欠損していることをいい、機能欠失型の変異を有する M 遺伝子を持つ場合および M 遺伝子を欠失する場合を含む。M 遺伝子の機能欠失型変異は、例えば M 遺伝子の蛋白質コード配列を欠失させたり、他の配列を挿入することにより作製することができる。例えば、M 蛋白質コード配列の途中に停止コドンを設定することができる（W O 0 0 / 0 9 7 0 0）。M 遺伝子欠損型のベクターは、最も好ましくは M 蛋白質のコード配列を完全に欠失している。M 蛋白質の O R F を欠失したベクターは、温度感受性変異 M 蛋白質をコードするベクターとは違い、任意の条件においてウィルス粒子を形成する能力を失っている。本発明において、ベクター再構成に用いる宿主細胞の染色体に M 遺伝子を組み込み、これを発現させて持続的に M 蛋白質を供給することによって、効率的な組み換えウィルス産生が可能となることを見出された。M 遺伝子が染色体に組み込まれた細胞は、例えば実施例に記載の方法により得ることができる。M 遺伝子は恒常的に

10

20

30

40

50

発現していてもよいし、ウィルス再構成時に誘導的に発現させてもよい。また、驚くべきことに、野生型M蛋白質の存在下で再構成を行う場合においても、再構成を低温で行うことによりベクター産生の効率が顕著に上昇することが判明した。従って、ベクターの再構成は低温、すなわち35以下、より好ましくは34以下、さらに好ましくは33以下、最も好ましくは32またはそれ以下で行うことが好ましい。

M遺伝子の欠損または変異によりM蛋白質の局在が低下または消失する(-)鎖RNAウィルスベクターを、機能的M蛋白質が持続的に発現する条件下で再構成させる工程、を含む粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターの製造方法においては、さらに(-)鎖RNAウィルスベクターがHNおよび/またはF遺伝子が欠損しているか、または温度感受性変異HNおよび/またはF遺伝子を保持することが好ましい。特に、M遺伝子の欠損または変異に加えてHN遺伝子に温度感受性変異を有するベクターは、非許容温度における粒子形成能が極めて低くなることが判明した。HN遺伝子の温度感受性変異としては特に限定されるものではないが、例えばセンダイウィルスのHN蛋白質のA262、G264、およびK461からなる群より選択される少なくとも1つ、好ましくは任意に選択される2つ、さらに好ましくは3つすべてのアミノ酸部位、あるいは他の(-)鎖RNAウィルスM蛋白質のそれらと相同な部位に変異を含むものを好適に用いることができる。ここでA262とはHN蛋白質の262番目のアミノ酸Ala、G264とはHN蛋白質の264番目のアミノ酸Gly、K461とはHN蛋白質の461番目のアミノ酸Lysを指す。アミノ酸変異は、所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、上記のM蛋白質の変異と同様、側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えば、上記したように異なるグループのアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、例えばセンダイウィルスHN蛋白質におけるA262T、G264R、およびK461Gからなる群より選択される変異あるいはそれらと相同な変異を含むものを好適に用いることができる。ここでA262Tとは、HN蛋白質の262番目のアミノ酸AlaがThrに置換された変異、G264Rとは、HN蛋白質の264番目のアミノ酸GlyがArgに置換された変異、K461Gとは、HN蛋白質の461番目のアミノ酸LysがGlyに置換された変異を言う。すなわち、センダイウィルスHN蛋白質のA262、G264、およびK461あるいは他のウィルスHN蛋白質の相同部位を、それぞれThr(T)、Arg(R)、およびGly(G)へ置換することができる。これらの変異は組み合わせて有していることが好ましく、特にこれらの3つの変異の全てを保持していることがより好ましい。

また、例えば、ムンプスウィルスにおいては、温度感受性の性質を示しワクチンとして使用されているUrabe AM9株(Wright, K. E. et al., Virus Res., 67; 49-57 (2000))を参考に、HN蛋白の464及び468番目のアミノ酸に変異導入することは本発明において好ましい。これと相同な位置のアミノ酸の変異は、他の(-)鎖RNAウィルスにも適用することができる。

特に、温度感受性M遺伝子を保持する(-)鎖RNAウィルスベクターにおいては、F遺伝子を欠損していることが好ましい。また、温度感受性M遺伝子を保持するF遺伝子欠損型ベクターは、さらにHN遺伝子に温度感受性変異を有することがより好ましい。本発明において、温度感受性Mおよび温度感受性HN遺伝子を保持するF遺伝子欠失型(-)鎖RNAウィルスベクターは、F蛋白質発現ヘルパー細胞を用いて許容温度でウィルスベクターを再構成させることにより、高力価のベクターを製造することが可能であり、製造されたベクターは、ウィルス様粒子の放出が有意に減少していることが実証された。なお、本発明において遺伝子の「欠損」とは、該遺伝子の機能的な遺伝子産物(蛋白質をコードする遺伝子であれば蛋白質)が実質的に発現されないことを言う。対象遺伝子に関してnullの表現型を示す場合は、該遺伝子を欠損していることに含まれる。遺伝子欠損には、遺伝子が欠失していること、転写開始配列等の変異により当該遺伝子が転写されないこと、フレームシフトまたはコドンの変異等により機能的蛋白質が産生されないこと、アミノ酸変異等により発現される蛋白質の活性が実質的に失われる[または非常に(例えば1/10以下に)低下する]こと、および蛋白質への翻訳が起こらない[または非常に(例

10

20

30

40

50

例えば 1 / 10 以下に) 低下する] ことなどが含まれる。

また本発明は、(-) 鎖 RNA ウィルスの P 遺伝子または L 遺伝子に持続感染を促進する変異を有する組み換えウィルスに関する。このような変異としては、具体的には、S e V P 蛋白質の 86 番目の G l u (E 86) の変異、S e V P 蛋白質の 511 番目の L e u (L 511) の他のアミノ酸への置換、または他の (-) 鎖 RNA ウィルス P 蛋白質の相同部位の置換が挙げられる。アミノ酸変異は、所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、上記と同様、側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えば、上記したように異なるグループのアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、E 86 の L y s への置換 (E 86 K)、L 511 の P h e への置換 (L 511 F) などが例示できる。また L 蛋白質においては、1197 番目の A s n (N 1197) および / または 1795 番目の L y s (K 1795) の他のアミノ酸への置換、または他の (-) 鎖 RNA ウィルス L 蛋白質の相同部位の置換が挙げられる。L 蛋白質のこれら 2 つの変異の両方を有する L 蛋白質遺伝子は特に好ましい。アミノ酸変異は、やはり所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、上記と同様、側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えば、上記したように異なるグループのアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、N 1197 の S e r への置換 (N 1197 S)、K 1795 の G l u への置換 (K 1795 E) などが例示できる。P 遺伝子と L 遺伝子の変異は、両方持っていることで、持続感染性、2 次粒子放出の抑制、または細胞傷害性の抑制の効果を顕著に高めることができる。さらに、上記の H N 蛋白質および / または M 蛋白質の温度感受性変異遺伝子を組み合わせることで、これらの効果を劇的に上昇させることができる。M および / または H N 遺伝子に温度感受性変異の少なくとも 1 つを、そして P および / または L 遺伝子に持続感染型の変異の少なくとも 1 つを有する組み換え (-) 鎖 RNA ウィルスが好ましく、特に M、H N、P、および L 遺伝子の 4 遺伝子の全てに変異を有するウィルスがより好ましい。特に M および H N 遺伝子のそれぞれに上記の 3 箇所のアミノ酸 (S e V においては M の G 69、T 116、および A 183、H N の A 262、G 264、および K 461) に変異を、かつ P 遺伝子に上記の 2 箇所の変異 (S e V においては E 86 または L 511) のうち少なくともどちらかを、さらに L 遺伝子に上記の 2 箇所の変異 (S e V においては N 1197 および K 1795) を持つウィルスは最も好ましい。また、これらの P 遺伝子および / または L 遺伝子に変異を有する組み換えウィルスは、(-) 鎖 RNA ウィルスのスパイク蛋白質遺伝子、例えば F 遺伝子を欠損することが好ましい。F 遺伝子を欠失させ、F 蛋白質を発現する F ヘルパー細胞を用いてウィルスを製造することによって、標的細胞に感染後に増殖せず、2 次粒子形成が劇的に抑制され、細胞傷害性が低下したウィルスベクターを得ることが可能である。このベクターは、野生型の P または L 遺伝子を持つベクターに比べ、導入遺伝子をより長期間にわたって発現できる。これら本発明のウィルスは、遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させるために、また遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制するために、また遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス粒子およびウィルス様粒子 (V L P) の放出を抑制するために有用である。

本発明は、本明細書に記載した、ウィルス遺伝子 (例えば M、H N、P、または L 遺伝子あるいはそれらの組み合わせ) に変異または欠損を有するウィルスを細胞に導入する工程を含む、遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させる方法を提供する。また本発明は、該ウィルスを細胞に導入する工程を含む、遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制する方法を提供する。さらに本発明は、該ウィルスを細胞に導入する工程を含む、遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス様粒子 (V L P) の放出を抑制する方法を提供する。細胞傷害性は、例えば実施例に記載したような L D H の放出を定量することにより測定することができる。また導入遺伝子の発現レベルは、導入遺伝子断片をプローブまたはプライマーに用いたノーザンハイブリダイゼーションまたは R T - P C R、または導入遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫沈降またはウェスタンブロット解析、あるいは導入遺伝子産物の活性の測定などにより決定することができる。ウィルス様粒子 (V L P) の放出は、例えば実施例に示した H A 活性の測定で知ることができるほ

10

20

30

40

50

か、細胞外液を回収し、細胞へのトランスフェクションしてVLPに含まれる遺伝子を発現を測定することにより、溶液中に含まれるウィルス様粒子を定量することができる。細胞傷害性の減弱、導入遺伝子の発現レベルの低下、およびウィルス様粒子(VLP)の放出の抑制は、当該変異または欠損がないウィルスと比べて、例えば統計学的に有意(例えば有意水準5%またはそれ以下の%値)に低下(または抑制)していることが好ましい。統計学的な検定は、例えば学生t検定またはマンホイットニーU検定などにより行うことができる。好ましくは、該抑制または低下は元のウィルスに比べ90%以下、好ましくは80%以下、より好ましくは70%以下、または60%以下に抑制または低下されているものであり、より好ましくは1/2以下、さらに好ましくは1/3以下、1/5以下、または1/8以下に抑制または低下している。

10

また本発明は、本明細書に記載したウィルス遺伝子に変異または欠損を有するウィルスの、遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させるための使用、遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制するための使用、および遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス様粒子(VLP)の放出を抑制するための使用を提供する。これらのウィルスは、遺伝子導入における細胞傷害性を減弱させるために用いるウィルス、遺伝子導入における導入遺伝子の発現レベルの低下を抑制するために用いるウィルス、または遺伝子導入においてウィルスを導入した細胞からのウィルス様粒子(VLP)の放出を抑制するために用いるウィルスとなる。

本発明において、(-)鎖RNAウィルスとは、(-)鎖をゲノムに持つRNAウィルスを言う。本発明において(-)鎖RNAウィルスは、好ましくは非分節型(-)鎖RNAウィルス、すなわち(-)鎖をゲノムに持つ一本鎖RNAウィルスである。(-)鎖RNAウィルスとしては、例えばパラミクソウィルス科(Paramyxoviridae)のセンダイウィルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウィルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウィルス(Mumps virus)、麻疹ウィルス(Measles virus)、RSウィルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウィルス(rinderpest virus)、ジステンパーウィルス(distemper virus)、オルトミクソウィルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウィルス(Influenza virus)、ラブドウィルス科(rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウィルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウィルス(Rabies virus)等が挙げられる。本発明において、(-)鎖RNAウィルスベクターは、より好ましくは非分節型の(-)鎖RNAウィルスであり、さらに好ましくはパラミクソウィルスである。

20

30

本発明において特に好ましい(-)鎖RNAウィルスには、例えばSendai virus(SeV)、human parainfluenza virus-1(HPIV-1)、human parainfluenza virus-3(HPIV-3)、phocine distemper virus(PDV)、canine distemper virus(CDV)、dolphin morbillivirus(DMV)、peste-des-petits-ruminants virus(PDPR)、measles virus(MV)、rinderpest virus(RPV)、Hendra virus(Hendra)、Nipah virus(Nipah)、human parainfluenza virus-2(HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5(SV5)、human parainfluenza virus-4a(HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b(HPIV-4b)、mumps virus(Mumps)、およびNewcastle disease virus(NDV)などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus(SeV)、human parainfluenza virus-1(HPIV-1)、human parainfluenza virus-3(HPIV-3)、phocine distemper virus(PDV)、canine distemper virus(C

40

50

DV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、およびNipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウィルスが例示できる。

これらのウィルスがコードするウィルス遺伝子は知られている。アクセッション番号を例示すれば、N遺伝子については、CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; およびTupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; およびTupaia, AF079780、C遺伝子についてはCDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; およびTupaia, AF079780、M遺伝子についてはCDV, M12669; DMV, Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; およびSV5, M32248、F遺伝子についてはCDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303; HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; およびSV5, AB021962、HN(HまたはG)遺伝子についてはCDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; およびSV-5, S76876が例示できる。但し、各ウィルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

本発明においてパラミクソウィルスとはパラミクソウィルス科 (Paramyxoviridae) に属するウィルスまたはその誘導体を指す。パラミクソウィルスは、非分節型ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウィルスのグループの1つで、パラミクソウィルス亜科 (Paramyxovirinae) (レスピロウィルス属 (パラミクソウィルス属とも言う)、ルブラウィルス属、およびモービリウィルス属を含む) およびニューモウィルス亜科 (Pneumovirinae) (ニューモウィルス属およびメタニューモウィルス属を含む) を含む。本発明を適用可能なパラミクソウィルスとしては、例えばパラミクソウィルス科のセンダイウィルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウィルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウィルス (Mumps virus)、麻疹ウィルス (Measles virus)、RSウィルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウィルス (rinderpest virus)、ジステンパーウィルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウィルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウィルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明のウィルスは、好ましくはパラミクソウィルス亜科 (

10

20

30

40

50

レスピロウィルス属、ルブラウィルス属、およびモービリウィルス属を含む)に属するウィルスであり、より好ましくはレスピロウィルス属(*Respirovirus*)(パラミクソウィルス属(*Paramyxovirus*)とも言う)に属するウィルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なレスピロウィルス属ウィルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウィルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウィルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウィルス3型(BPIV-3)、センダイウィルス(*Sendai virus*; マウスパラインフルエンザウィルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウィルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明においてパラミクソウィルスは、最も好ましくはセンダイウィルスである。これらのウィルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。DI粒子(J. Virol. 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウィルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウィルスベクターを製造するための材料として使用することができる。(-)鎖RNAウィルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み(integration)は起こらない。このため染色体異常による癌化や不死化などの安全面における問題が生じない。この特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、SeVを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている(Yu, D. et al., *Genes Cells* 2, 457-466(1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性(flexibility)など性質上のメリットがある。SeVベクターは、外来遺伝子を4 kb以上導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。

また、センダイウィルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウィルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている(Hurwitz, J. L. et al., *Vaccine* 15: 533-540, 1997)。更に特筆すべき利点として以下の2点、すなわち「高感染性」及び「高発現量」を挙げることができる。SeVベクターは細胞膜蛋白糖鎖のシアル酸に結合して感染するが、このシアル酸はほとんどの細胞で発現しており、このことが感染スペクトルを広くする、則ち高感染性に繋がっている。SeVのレプリコンをベースにした複製型ベクターは放出されたウィルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。広範な感染性を有するということは、様々な種類の抗体治療(及び解析)に利用可能であることを示している。また、細胞質のみでの転写・複製という特徴的な発現機構であることから、搭載遺伝子の発現量が非常に高いことが示されている(Moriya, C. et al., *FEBS Lett.* 425(1) 105-111(1998); WO00/70070)。

本発明においてベクターとは、核酸を細胞に導入する担体である。また本発明において「(-)鎖RNAウィルスベクター」とは、(-)鎖RNAウィルスに由来し核酸を細胞に導入するベクター(担体)を指す。本発明の(-)鎖RNAウィルスベクターは、感染力を持つウィルス粒子であってよい。ウィルス粒子とは、ウィルス蛋白質の働きにより細胞から放出される、核酸を含む微小粒子を言う。ウィルス粒子の形状はウィルスの種類により球状、棍棒状など様々であってよいが、細胞より十分に小さく、その大きさは通常10 nm ~ 800 nm程度である。パラミクソウィルスのウィルス粒子は、ゲノムRNAとウィルス蛋白質を含む上記RNPが細胞膜由来の脂質膜(エンベロープという)に含まれた構造をしている。アミノ酸置換を含む変異ウィルス蛋白質(実施例に記載の変異M、HM、P、またはL蛋白質など)をコードする遺伝子をゲノムに持つウィルスにおいては、ウィルスベクターは(-)鎖RNAウィルスのゲノムRNAとウィルス蛋白質からなる複合

10

20

30

40

50

体、すなわちリボヌクレオプロテイン (RNP) であってよい。RNP は、例えば所望のトランスフェクション試薬と組み合わせて標的とする細胞に導入することができる。このような RNP は、具体的には (-) 鎖 RNA ウィルスのゲノム RNA、N 蛋白質、P 蛋白質、および L 蛋白質を含む複合体である。RNP は細胞内に導入されると、ウィルス蛋白質の働きによりゲノム RNA からウィルス蛋白質をコードするシストロンが転写されると共に、ゲノム自身が複製され娘 RNP が形成される。ゲノム RNA の複製は、該 RNA のコピー数の増加を RT-PCR またはノーザンハイブリダイゼーション等により検出することにより確認することができる。「感染力」とは、組換え (-) 鎖 RNA ウィルスベクターが細胞への接着能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。好ましい態様では、(-) 鎖 RNA ウィルスベクターは、外来遺伝子を発現することができるように保持する。本発明における (-) 鎖 RNA ウィルスベクターは、M 蛋白質の細胞表面の凝集が低下または消失し、粒子形成が抑制されるため、野生型ウィルスのような複製能を有さない。「複製能」とは、ウィルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウィルスが複製され、感染性ウィルス粒子が産生される能力を指す。宿主細胞としては、例えば LLC-MK2 または CV-1 等が挙げられる。

(-) 鎖 RNA ウィルスベクターは、(-) 鎖 RNA ウィルスのゲノム RNA を含んでいる。ゲノム RNA とは、(-) 鎖 RNA ウィルスのウィルス蛋白質と共に RNP を形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、該核酸が複製して娘 RNP が形成される機能を持つ RNA を言う。(-) 鎖 RNA ウィルスは (-) 鎖 (ネガティブ鎖) RNA をゲノムに持つウィルスであるので、このような RNA は搭載遺伝子をアンチセンスとしてコードしている。一般に (-) 鎖 RNA ウィルスのゲノムは、3' リーダー領域と 5' トレイラー領域の間に、ウィルス遺伝子がアンチセンスとして並んだ構成をしている。各遺伝子の ORF の間には、転写終結配列 (E 配列) - 介在配列 (I 配列) - 転写開始配列 (S 配列) が存在し、これにより各遺伝子の ORF をコードする RNA が別々のシストロンとして転写される。本発明のウィルスに含まれるゲノム RNA は、該 RNA にコードされる遺伝子群の発現および RNA 自身の自律的な複製に必要なウィルス蛋白質である N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、および L (ラージ) あるいはこれらの変異蛋白質をアンチセンスにコードしている。好ましい態様では、該 RNA は、ウィルス粒子の形成に必要な M (マトリックス) 蛋白質をコードしていないか、あるいは変異 M 蛋白質をコードしている。さらに該 RNA は、ウィルス粒子の感染に必要なスパイク蛋白質をコードしていてもよく、していなくてもよい。好ましい態様では、該 RNA はスパイク蛋白質の少なくとも 1 つに変異を有するか、あるいは少なくとも 1 つの蛋白質をコードしていない。パラミクソウィルスのスパイク蛋白質としては、細胞膜融合を起こす蛋白質である F (フュージョン) 蛋白質および細胞への接着に必要な HN (ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ) 蛋白質が挙げられる。

「組み換え」体とは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成した化合物または組成物を言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。すなわち、人為的にポリヌクレオチド鎖がつなぎ替えられたり、あるいは合成されたポリヌクレオチドなどが含まれる。本明細書において、「組み換え」(-) 鎖 RNA ウィルスベクターとは、遺伝子操作により構築された (-) 鎖 RNA ウィルスベクターまたはそれを増幅して得られる (-) 鎖 RNA ウィルスベクターを言う。組み換え (-) 鎖 RNA ウィルスベクターは、例えば、組み換え (-) 鎖 RNA ウィルス cDNA を再構成して生成することができる。

例えばパラミクソウィルスのウィルス蛋白質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、および L 遺伝子が挙げられる。「NP、P、M、F、HN、および L 遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。例えばパラミクソウィルス亜科に属する各ウィルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP 遺伝子は「N 遺伝子」と表記されることもある。

レスピロウィルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウィルス属	NP	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウィルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウィルス科 (*Paramyxoviridae*) のレスピロウィルス (*Respirovirus*) に分類されるセンドライウィルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP 遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P 遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M 遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F 遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN 遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L 遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886 を参照のこと。

本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNA および DNA 等の核酸が含まれる一般に、遺伝子は蛋白質をコードしてもよく、また蛋白質をコードしていなくてもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンス RNA などの機能的 RNA をコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA を含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードする ORF をセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。

本発明において検査または製造される (-) 鎖 RNA ウィルスベクターとしては、特に制限はない。好適な (-) 鎖 RNA ウィルスベクターとして、例えば、M 蛋白質の細胞表面の凝集の低下または消失が持続的に相補される条件下で複製能を示し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウィルスのゲノムは、3' の短いリーダー領域に続き、N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、M (マトリックス)、F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ)、および L (ラージ) 蛋白質をコードする 6 つの遺伝子が並んでおり、短い 5' トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能なパラミクソウィルスベクターを製造することができる。例えばこれらの遺伝子のいずれかに変異や欠失を有することにより M 蛋白質の局在を低下または消失させるウィルスのゲノムや、または M 蛋白質の局在を低下または消失させる他の遺伝子を持つウィルスゲノムを構築し、これを相補する条件下でゲノムを転写させてウィルスの再構成を行う。ゲノム内に外来遺伝子を挿入することにより、外来遺伝子を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明における (-) 鎖 RNA ウィルスベクターは、ベクター上のウィルス遺伝子の配置は野生型ウィルスから改変されていてもよい。

本発明における粒子形成能が低下または消失したウィルスベクターは、保持するウィルス遺伝子をさらに欠失させたりまたは変異させてもよい。例えば、M 遺伝子に温度感受性変異を有していたり、あるいは M 遺伝子が欠失することにより粒子形成能が低下または消失したウィルスベクターは、さらに HN および / または F 遺伝子、あるいはその他のウィルス遺伝子に変異を有していたり、あるいは欠失していることもできる。例えば、実施例に記載のように、温度感受性 M 遺伝子を持つベクターにおいて、HN 遺伝子および / または F 遺伝子等にも温度感受性変異を有していたり、あるいは F および / または HN 遺伝子が欠失しているベクターを、本発明に従って製造することができる。また、M 遺伝子を欠失したベクターにおいて、さらに F および / または HN 遺伝子を欠失していたり、あるいは

F および / または H N 遺伝子に温度感受性変異等の変異を有するベクターを製造することもできる。これらのベクターを再構成させるには、温度感受性変異を持つ場合においては許容温度において再構成を行う。また、遺伝子を欠失または欠損する場合においては、正常な機能を有する遺伝子産物をトランスに供給して再構成を行う。例えば、これらの遺伝子産物をコードする遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入して発現させ、該宿主細胞内において該遺伝子産物を供給してベクターの再構成を行うことができる。これらの遺伝子産物のアミノ酸配列は、ウィルス由来の配列そのままでなくとも、産生されるウィルスベクターの核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウィルスの相同遺伝子で代用してもよい。

10

また、ベクターゲノムが由来するウィルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウィルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウィルスのゲノムがコードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有するウィルスベクターを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。例えば、他のウィルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウィルス (V S V) の G 蛋白質 (V S V - G) を挙げることができる。本発明における (-) 鎖 R N A ウィルスベクターには、V S V - G 蛋白質などのように、ゲノムが由来するウィルス以外のウィルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウィルスベクターが含まれる。

また、本発明における (-) 鎖 R N A ウィルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウィルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウィルスゲノムにコードされていてもよいし、ウィルスベクターの再構成時に、ウィルスゲノム以外の遺伝子 (例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子) の発現により供給されてもよい。

20

また、本発明における (-) 鎖 R N A ウィルスベクターは、例えばベクターに由来するウィルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、または R N A の転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウィルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されたものであってもよい。具体的には、例えばパラミクソウィルスベクターにおいては、複製因子である N P 遺伝子、P / C 遺伝子および L 遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の 1 つである H N 蛋白質は、赤血球凝集素であるヘماغグ lut i n i n (h e m a g g l u t i n i n) 活性とノイラミニダーゼ (n e u r a m i n i d a s e) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウィルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わる F 蛋白質を改変することにより、膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうる F 蛋白質や H N 蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたウィルスベクターを作製することもできる。

30

40

また本発明における (-) 鎖 R N A ウィルスベクターにおいては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであってもよい。例えば S e V のアクセサリー遺伝子の 1 つである V 遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対する S e V の病原性が顕著に減少する (K a t o , A . e t a l . , 1997 , J . V i r o l . 71 : 7266 - 7272 ; K a t o , A . e t a l . , 1997 , E M B O J . 16 : 578 - 587 ; C u r r a n , J . e t a l . , W O 01 / 04272 , E P 1067179) 。このような弱毒化ベクターは、i n v i v o または e x v i v o における遺伝子導入用ウィルスベクターとして特に好適である。

本発明のウィルスベクターは、ゲノム R N A 中に外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子

50

を含む組換えウィルスベクターは、上記のウィルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。あるいは、天然型蛋白質の欠失型や人工的な蛋白質などであってもよい。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウィルスベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ウィルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウィルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい(Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830)。

外来遺伝子は、ウィルスの各遺伝子(例えばNP、P、M、F、HN、およびL遺伝子)の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜E-I-S配列(転写開始配列-介在配列-転写終結配列)またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列のユニットが配置されるようにする。あるいは、IRESを介して外来遺伝子を挿入し得る。

挿入した遺伝子の発現量は、その遺伝子上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる(国際公開番号WO 01/18223)。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウィルスにおいては、挿入位置がウィルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど(野生型ウィルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が高い。挿入遺伝子の高い発現を得るためには、挿入遺伝子をNP遺伝子上流(マイナス鎖においては3'側)またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、上流領域(ネガティブ鎖ゲノムにおいて3'側)に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど(野生型ウィルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5'側、すなわち野生型ウィルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流(ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位)、またはL遺伝子上流(ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位)に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウィルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウィルスベクターの投与による導入遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウィルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける挿入遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖ゲノムのなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のウィルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な治療効果が得られるようにすることも可能である。

一般に、細胞毒性を示さない限りにおいて、外来遺伝子の高い発現が得られることが有利と考えられるため、外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3'端近くに挿入することが好ましい。好適なベクターの例としては、外来遺伝子が、(-)鎖RNAウィルスベクターのネガティブ鎖ゲノムにおいて、該ウィルスが持つウィルス蛋白質遺伝子のいずれよりも3'側に配置されているベクターが挙げられる。例えばN遺伝子上流(ネガティブ鎖においてN遺伝子コード配列の3'側)に外来遺伝子が挿入されたベクターが好ましい。あるいは、N遺伝子のすぐ下流に挿入してもよい。Mおよび/またはF遺伝子等のウィルス遺伝子を欠失するゲノムでは、その欠失領域に外来遺伝子を挿入することができる。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、ゲノムをコードするベクターDNA中の挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明における(-)鎖RNAウィルスベクターは、このように挿入した以外の位置に他の外来遺伝子を

10

20

30

40

50

保持するものでもよい。

(-)鎖RNAウィルスベクターを製造するには、哺乳動物細胞において(-)鎖RNAウィルスのゲノムRNAを含むRNPの再構成に必要なウィルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、(-)鎖RNAウィルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりネガティブ鎖ゲノム(すなわちウィルスゲノムと同じアンチセンス鎖)を生成させてもよく、あるいはポジティブ鎖(ウィルス蛋白質をコードするセンス鎖)を生成させても、ウィルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはポジティブ鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウィルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる(Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。

例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウィルスベクターは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

外来遺伝子を組み込む場合は、まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25 ng/μl以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を、Not I部位を利用してウィルスゲノムRNAをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNot I認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、Not I部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。2つのプライマーの5'部分にNot I部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端をNot I部位とする。ウィルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウィルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列のユニットが配置されるように、プライマー中にE-I-S配列(または挿入部位によってはその部分)を含めるようにする。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、Not Iによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNot I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACCT)を選択し、その3'側にNot I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNot I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACCT)を選択し、その3'側にNot I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、E-I-S配列を含む最終的なPCR増幅産物のNot I断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する(いわゆる「6のルール(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72: 891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 482

10

20

30

40

50

2 - 4 8 3 0 , 1 9 9 3 ; C a l a i n , P . a n d R o u x , L . , J . V i r o l . 6 7 : 4 8 2 2 - 4 8 3 0 , 1 9 9 3) 。さらに挿入断片の3'側にセンダイウィルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5' - C T T T C A C C C C T - 3' (配列番号: 1) 、I配列の相補鎖配列、好ましくは5' - A A G - 3' 、E配列の相補鎖配列、好ましくは5' - T T T T T C T T A C T A C G G - 3' (配列番号: 2) 、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ(宝酒造)を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ(NEB)、より好ましくはPfuポリメラーゼ(Toyoobo)を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウィルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウィルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる(Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457 - 466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813 - 2820, 1997)。例えば、まずNotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列(5' - (G) - C G G C C G C A G A T C T T C A C G - 3') (配列番号: 3) を、クローニングされたセンダイウィルスゲノムcDNA(pSeV(+))のリーダー配列とN蛋白質をコードするORFとの間に挿入し、デルタ肝炎ウィルスのアンチゲノム鎖(antigenomic strand)由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18⁺b(+)を得る(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813 - 2820)。

例えば、M遺伝子を欠損させたり、あるいはM遺伝子へ温度感受性変異を導入する場合、(-)鎖RNAウィルス全長ゲノムcDNAを制限酵素で消化して、M遺伝子を含むフラグメントを回収し、適当なプラスミドにクローニングする。M遺伝子の変異またはM遺伝子欠損部位の構築はこのプラスミド上で行う。変異導入には、例えばQuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)などを利用してKitに記載の方法に従って実施することができる。M遺伝子の欠損または欠失のためには、例えばPCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、M遺伝子のORF全部または一部を欠失させ、適宜適当なスペーサー配列で連結することができる。目的のM遺伝子の変異体または欠損体を得られたら、これを含むフラグメントを回収し、もとの全長ゲノムcDNAのM遺伝子と置換することにより、温度感受性変異M遺伝子を持つウィルスゲノムcDNAなどを調製することができる。同様の方法で、例えばFおよび/またはHN遺伝子等に変異を導入することができる。

(-)鎖RNAウィルスベクターのゲノムをコードするDNAを転写させ、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下でベクターを再構成させることにより、粒子形成能が低下または消失した(-)鎖RNAウィルスベクターを製造することができる。本発明は、本発明の粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターの製造方法に適用するための、(-)鎖RNAウィルスベクターのゲノムをコードするDNAを提供する。また本発明は、本発明の粒子形成能が低下または消失した組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターの製造方法に適用するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウィルスベクターDNAからのウィルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる(国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323 - 332; Whelan, S. P. et al., 1995,

10

20

30

40

50

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388 - 8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195 - 4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773 - 5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477 - 4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087 - 6094; Kato, A. et al., 1996, Gene Cells 1: 569 - 579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265 - 1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400 - 15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む(-)鎖RNAウイルスまたはウイルス成分となるRNPをDNAから再構成させることができる。

組み換え(-)鎖RNAウイルスベクターは、具体的には、(a) (-)鎖RNAウイルスに由来するネガティブ鎖RNAまたはその相補鎖(ポジティブ鎖) をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞(ヘルパー細胞) で転写させる工程、(b) 該細胞あるいは該細胞から得られたウイルスベクターまたはそのRNP成分を導入した細胞を、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失(例えばM蛋白質の細胞表面の凝集の低下または消失) を持続的に相補する条件下で培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収する工程、により製造することができる。ベクターDNAから転写されたRNAはNP、L、およびP蛋白質とRNP複合体を形成し、さらに工程(b) においてエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。本発明においては、工程(b) における培養を低温、すなわち35 以下、より好ましくは34 以下、さらに好ましくは33 以下、最も好ましくは32 またはそれ以下で行うことが好ましい。

上記の細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件で培養するとは、具体的には、温度感受性変異蛋白質を用いる場合であれば許容温度で培養することである。また、遺伝子欠損(または欠失) 変異を持つウイルスの製造であれば、例えば、その遺伝子の野生型またはそれと同等の機能を有する遺伝子を持続的に発現させた条件下で培養すること、より具体的には、例えばヘルパー細胞の染色体に組み込まれた該遺伝子の野生型またはそれと同等の機能を有する遺伝子が発現する条件下で培養することである。

ヘルパー細胞で発現させる、ウイルスゲノムをコードするDNA(ベクターDNA) は、ゲノムのマイナス鎖(ネガティブ鎖RNA) またはその相補鎖(ポジティブ鎖RNA) をコードしている。例えば、ネガティブ鎖RNAまたはその相補鎖をコードするDNAをT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNAポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAをヘルパー細胞にトランスフェクトしてもよい。細胞内で転写させる鎖は、ウイルスゲノムのポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよいが、ポジティブ鎖が転写されるようにすることが再構成の効率を上げるためには好ましい。

例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、▲1▼目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、▲2▼目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、▲3▼目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

▲2▼としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA(Boehringer)、Superfect(QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER(Boehringer #1811169) などが挙げられる。▲1▼としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙

げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1)細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を2~4% CO₂、35℃、15~24時間、2)DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3)沈殿液中のDNA濃度が20~30 µg/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。▲2▼の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAB-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10⁵) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。▲3▼の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で▲1▼や▲2▼の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリの中で▲2▼の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適にはSuperfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、またはDOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない。

cDNAからのウィルスベクターの再構成は具体的には例えば次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質 (100 units/ml ペニシリンG および 100 µg/ml ストレプトマイシン) を含む最少必須培地 (MEM) を用いてサル腎臓由来細胞株 LLC-MK2 を70~80% コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 µg/ml psoralen (ソラレン) 存在下 UV 照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウィルス vTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 µg、より好ましくは3~20 µgの粒子形成能が低下または消失した組換えセンダイウィルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウィルスRNPの生成に必須なトランスに作用するウィルス蛋白質を発現するプラスミド (0.5~24 µgのpGEM-N、0.5~12 µgのpGEM-P、および0.5~24 µgのpGEM-L、より好ましくは例えば1 µgのpGEM-N、0.5 µgのpGEM-P、および1 µgのpGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にSuperfect (QIAGEN社) を用いたりポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は2:1:2とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば1~4 µgのpGEM-N、0.5~2 µgのpGEM-P、および1~4 µgのpGEM-L程度で適宜調整する。粒子形成させるために必要な遺伝子を、ここで共にトランスフェクションすれば、形成したウィルス粒子がヘルパー細胞に再感染してウィルスをより増幅させることができる。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 µg/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは40 µg/mlのシトシンアラビノシド (AraC)

10

20

30

40

50

(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物を再度LLC-MK2細胞にトランスフェクションして、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で培養する。この過程では、ウイルス粒子形成が遂行し、ウイルスが増幅する。または、培養上清を回収し、ウイルス産生用細胞の培養液に添加して感染させ培養する。細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で培養3~7日後に培養液を回収する。

10

RNPのトランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA(Roche)、Superfect(QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER(Roche #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる(Callos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。

エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損したウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞をエンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞に重層し、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で培養することによってウイルスベクターを増幅することもできる(国際公開番号WO00/70055およびWO00/70070参照)。あるいは、上記の凍結融解による細胞破碎物を10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種し、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で維持し、約3日後に、尿液を回収してもよい。培養上清または尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)により決定することができる。混入し得るT7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈(例えば 10^6 倍)して、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは -80°C で保存することができる。

20

30

回収されたウイルスの力価は、例えばCIU(Cell-Infected Unit)測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる(WO00/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、GFP(緑色蛍光蛋白質)などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーの指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる(例えばGFP-CI

40

50

Uとして)。このようにして測定した力価は、C I Uと同等に扱うことができる(W O 0 0 / 7 0 0 7 0)。

ウィルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウィルスベクター等の再構成においては、サル腎由来LLC MK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウィルス粒子を得ることもできる。また、大量にウィルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウィルスベクターを発育鶏卵に感染させ、細胞におけるM蛋白質の局在の低下または消失を持続的に相補する条件下で該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウィルスベクターの製造方法は既に開発されている(中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153 - 172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間37~38℃で培養し、胚を成長させる。ウィルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウィルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、増幅する組み換えウィルスにより変わり得る。その後、ウィルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのウィルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代真人, 「ウィルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68 - 73, (1995))。

具体的には、例えば細胞におけるM蛋白質の局在が低下または消失する温度感受性変異M遺伝子を保持する組み換え(-)鎖RNAウィルスベクターを再構成させるには、(a) 該(-)鎖RNAウィルスに由来するネガティブ鎖RNAまたはその相補鎖(ポジティブ鎖)をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞(ヘルパー細胞)で転写させる工程、(b) 該細胞あるいは該細胞から得られたウィルスベクターまたはそのRNP成分を導入した細胞を、許容温度以下で培養し、その培養上清からウィルス粒子を回収する工程、により製造することができる。本発明においては、特に工程(b)における培養を許容温度以下であり、かつ35℃以下、より好ましくは34℃以下、さらに好ましくは33℃以下、最も好ましくは32℃またはそれ以下で行うことが好ましい。

また、M蛋白質を欠失した(-)鎖RNAウィルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる。

1 M欠失型(-)鎖RNAウィルスゲノムcDNAおよびM発現プラスミドの構築
(-)鎖RNAウィルス全長ゲノムcDNAを制限酵素で消化して、M遺伝子を含むフラグメントを回収し、pUC18にクローニングする。M欠損部位の構築はこのプラスミド上で行う。M遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてM遺伝子のORFを除いて適当なスペーサー配列で連結し、M欠失型ゲノムcDNAを構築する。M遺伝子の上流および下流のゲノムをコードするDNAをPCRにより増幅し、これらを連結して全長M欠失型(-)鎖RNAウィルスゲノムcDNAを含むプラスミドを得る。外来遺伝子は、例えばM欠失部位にある制限酵素部位に挿入することができる。

2 (-)鎖RNAウィルスM蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製
例えば(-)鎖RNAウィルスのM遺伝子の誘導的な発現が可能なベクターを構築するため、誘導性プロモーターまたはCre/LoxPなどの組み換えによる発現制御系などを利用する。(-)鎖RNAウィルスのM遺伝子を発現するCre/LoxP誘導型発現プラスミドの構築は(-)鎖RNAウィルスM遺伝子をPCRで増幅し、例えば、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNd1w(Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p 1115 - 1121)のユニークサイトSwAI部位に増幅産物を挿入する。

M欠損ゲノムから感染ウィルス粒子を回収するため、M蛋白を持続的に高発現可能なヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞等を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FB

S)、ペニシリンGナトリウム50単位/ml、およびストレプトマイシン50 μ g/mlを添加したMEMで37、5% CO₂で培養する。Cre DNAリコンビナーゼによりM遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit(Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

例えば、10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 μ gのM発現プラスミドをトランスフェクション後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37の5% CO₂インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418(GIBCO-BRL)を1200 μ g/mlを含む10mlの10% FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

ヘルパー細胞においてM蛋白質が高発現することが、高価のウィルスを回収するためには重要である。そのためには、例えば上記のM発現細胞の選択を2回またはそれ以上行うことが好ましい。例えばある薬剤耐性マーカー遺伝子を持つM発現プラスミドをトランスフェクションし、その薬剤を用いてM遺伝子を保持する細胞を選択した後、別の薬剤耐性マーカー遺伝子を持つM発現プラスミドを再度、この細胞にトランスフェクションしこの別の薬剤耐性マーカーで細胞を選択することにより、1回目のトランスフェクションで選択された細胞よりも、さらにM蛋白質を高発現できる細胞を選択することが可能である。このように、2回のトランスフェクションを経て構築されたMヘルパー細胞を好適に用いることができる。Mヘルパー細胞は、同時にF遺伝子も発現することにより、FおよびM遺伝子の両方を欠損する感染性ウィルス粒子を産生させることができる(実施例参照)。この場合、F遺伝子の発現プラスミドも2回以上トランスフェクションし、F蛋白質の発現誘導レベルをより高めることが好ましい。

M蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、例えば、アデノウィルスAxCANCreを斉藤らの方法(Saito et al., Nucleic Acids Res. 23:3816-3821(1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121(1998))により、好ましくはmoi = 3程度で感染させて行う。

3 M欠失ウィルスの再構築及び増幅

野生型M蛋白質またはそれと同等の蛋白質を発現する細胞(Mヘルパー細胞)を用いて組み換えM欠失型(-)鎖RNAウィルス粒子を産生させるには、この細胞内にM欠失型(-)鎖RNAウィルスのRNPを導入または形成させればよい。RNPの導入は、例えばRNPを含む細胞溶解物などをMヘルパー細胞にトランスフェクションしてもよいし、あるいはRNPを産生する細胞とMヘルパー細胞とを共培養することによっても、細胞融合によりMヘルパー細胞にRNPを導入することができる。あるいは、Mヘルパー細胞内で、ゲノムRNAを転写させ、N、P、およびL蛋白質の存在下でRNPを新規に形成させてもよい。M欠失型(-)鎖RNAウィルスゲノムcDNAからの組み換えウィルスベクターの再構成は、具体的には、(a)(-)鎖RNAウィルスに由来する、M遺伝子を欠失したネガティブ鎖RNAまたはその相補鎖(ポジティブ鎖)をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞(ヘルパー細胞)で転写させる工程、(b)該細胞あるいは該細胞から得られたウィルスベクターまたはそのRNP成分を導入した細胞を、該細胞あるいは該導入細胞の染色体に組み込まれたM遺伝子が発現する条件下で培養し、その培養上清からウィルス粒子を回収する工程、により製造することができる。本発明においては、特に工程(b)における培養を許容温度以下であり、かつ35以下、より好ましくは34以下、さらに好ましくは33以下、最も好ましくは32またはそれ以下で行うことが好ましい。温度感受性変異M蛋白質を用いたベクター産生では、ウィルス粒子産生過程を許容温度以下で行うことが必要であるが、驚くべきことに、野

10

20

30

40

50

生型M蛋白質を用いた本方法においても、ウィルス粒子を形成させる過程を低温で行うことで効率的な粒子形成を行わせることが可能であることが判明した。工程(a)においてNP、P、およびL蛋白質を発現させるには、例えばこれらの蛋白質をコードする発現プラスミドを細胞にトランスフェクションすればよい。また、工程(a)において、M蛋白質を(Fおよび/またはHN遺伝子欠損型ウィルスの場合は、これらの遺伝子も)、ヘルパー細胞で発現させてもよい(実施例参照)。あるいは、工程(b)で用いるM遺伝子が染色体に組み込まれた細胞を工程(a)において使用することも可能である。工程(a)で産生されたRNPを工程(b)の細胞の導入するには、例えば工程(a)の細胞を凍結融解により破碎し、これを工程(b)の細胞に公知のトランスフェクション試薬を用いて導入することができる。

具体的には、例えば上記M欠失型(-)鎖RNAウィルスゲノムをコードするプラスミドを以下のようにしてLLC-MK2細胞にトランスフェクションする。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、LLC-MK2細胞を 5×10^6 cells/dishで100mmペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線(365nm)で20分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウィルス(PLWUV-VacT7:Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986))に室温で1時間感染させる($moi = 2$)($moi = 2 \sim 3$ 、好適には $moi = 2$ が用いられる)。ワクシニアウィルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備されたUV Stratallinker 2400(カタログ番号400676(100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA)を用いる。細胞を3回洗浄してからゲノムRNAを発現するプラスミド、およびNP、P、およびL蛋白質(選択的にM蛋白質等も)を発現するプラスミドをOptiMEM(GIBCO)に懸濁し、Superfect transfection reagent(1μg DNA/5μlのSuperfect, QIAGEN)を入れて混合し、室温で10分間放置後、最終的に3% FBSを含むOptiMEM 3mlに入れ、細胞に添加して培養する。あるいは、ゲノムRNAを発現するプラスミド、およびそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白質を発現する発現プラスミド適当なりポフェクション試薬と用いてこの細胞にトランスフェクトしてもよい。プラスミドの量比は、例えば順に6:2:1:2:2:2とすることができるがこれに限定されない。3~5時間培養後、細胞を、血清を含まないMEMで2回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド 40μg/ml(AraC, Sigma), トリプシン 7.5μg/ml(GIBCO)を含むMEMで24~70時間培養する。ここで、約 8.5×10^6 cells/dishあたりにM蛋白質を持続発現する細胞(Mヘルパー細胞)を重層し、40μg/mlのAraC及び7.5μg/mlのTrypsinを含むMEMで更に2日間37℃で培養してもよい。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEMに懸濁する(10^7 cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER(Roche)と混合し(10^6 cells/25μl DOSPER)室温で15分放置した後、上記でクローニングしたM発現ヘルパー細胞にトランスフェクション(10^6 cells/well 12-well-plate)し、血清を含まないMEM(40μg/ml AraC, 7.5μg/ml トリプシンを含む)で培養し(好ましくは低温で)、上清を回収する。このとき、Lipofection reagent DOSPERなどのトランスフェクション試薬の添加なしにトランスフェクションが可能である。さらにFおよび/またはHN蛋白質を欠失したウィルスベクターは、ゲノムからFおよび/またはHN遺伝子を欠失させ、ヘルパー細胞でFおよび/またはHN蛋白質を共発現させることにより製造することができる。

本発明の方法によれば、本発明のウィルスベクターは、例えば 1×10^5 CIU/ml以上、好ましくは 1×10^6 CIU/ml以上、より好ましくは 5×10^6 CIU/ml以上、より好ましくは 1×10^7 CIU/ml以上、より好ましくは 5×10^7 CIU/ml以上、より好ましくは 1×10^8 CIU/ml以上、より好ましくは 5×10^8 CIU

10

20

30

40

50

/mL以上の力価でウィルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウィルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる(Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74(1990); WO00/70070)。

M欠失型(-)鎖RNAウィルスゲノムcDNAから組み換えウィルスベクターを再構成させるためのより好ましい態様としては、以下のような方法が挙げられる。すなわち、(a)(-)鎖RNAウィルスに由来する、M遺伝子を欠失したネガティブ鎖RNAまたはその相補鎖(ポジティブ鎖)をコードするベクターDNAを、感染性ウィルス粒子の形成に必要なウィルス蛋白質群(すなわちNP、P、L、M、F、およびHN蛋白質)を発現する細胞(ヘルパー細胞)で転写させる工程、(b)該細胞と、染色体に組み込まれたM遺伝子が発現する細胞(Mヘルパー細胞)を共培養する工程、(c)該培養から細胞抽出物を調製する工程、(d)該抽出物を染色体に組み込まれたM遺伝子が発現する細胞(Mヘルパー細胞)に導入して培養する工程、および(e)該培養上清からウィルス粒子を回収する工程、を含む方法である。工程(d)は上記の低温条件にて行うことが好ましい。得られたウィルス粒子は、再度Mヘルパー細胞に感染させて(好ましくは低温で)増幅することができる。具体的には、実施例の記載に従ってウィルスを再構成させることができる。

10

ウィルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウィルスゲノム上で欠損しているウィルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウィルス蛋白質が、他のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウィルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウィルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、ウィルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウィルス遺伝子欠損型ウィルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウィルスは、ウィルス遺伝子が欠損しているため、ウィルス遺伝子を欠損していないウィルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができる。また、ウィルス遺伝子の欠損により増殖性がないこれらのウィルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

20

回収した(-)鎖RNAウィルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウィルスが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウィルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウィルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。(-)鎖RNAウィルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができる。

30

40

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウィルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明の方法により製造されたウィルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接(in vivo)投与による遺伝子発現、間接(ex vivo)投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどの蛋白質をコードしない核酸であってもよい。

本発明の方法により製造された(-)鎖RNAウィルスベクターは、必要に応じて薬理学

50

的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせる組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えばベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などで適宜希釈して組成物とすることができる。(-)鎖RNAウィルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでもよい。またベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロス水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。(-)鎖RNAウィルスベクターを含む組成物は試薬として、および医薬として有用である。ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。(-)鎖RNAウィルスベクターであれば、投与されるベクター量は好ましくは約 10^5 CIU/mlから約 10^{11} CIU/ml、より好ましくは約 10^7 CIU/mlから約 10^9 CIU/ml、最も好ましくは約 1×10^8 CIU/mlから約 5×10^8 CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は 2×10^5 CIU ~ 2×10^{10} CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比(例えば平均値)で上記の投与量を換算した量を投与することができる。(-)鎖RNAウィルスベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

10

20

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[実施例1] 温度感受性変異導入F欠失型SeVゲノムcDNAの構築

下記記載の温度感受性変異導入F欠失型SeVゲノムcDNAの構築のスキームを図1に表した。F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センドライウィルス全長ゲノムcDNA(pSeV18+/ΔF-EGFP:Li,H.-O.et al., J. Virology 74, 6564-6569(2000), WO00/70070)をNaeIで消化し、M遺伝子を含む断片(4922bp)をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System(QIAGEN, Bothell, WA)で回収し、pBluescript II(Stratagene, La Jolla, CA)のEcoRVサイトにサブクローニングした(pBlueNaeIfrg-ΔFEGFPの構築)。M遺伝子への温度感受性変異導入はこのpBlueNaeIfrg-ΔFEGFP上で、QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)を利用してKitに記載の方法に従って行った。M遺伝子上への変異導入の種類はKondoらが報告しているCl.151 strain(Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268:21924-21930(1993))の配列を利用し、G69E, T116A及びA183Sの3箇所の変異導入を行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は、G69E(5'-g a a a c a a a c a a c c a a t c t a g a g a g c g t a t c t g a c t t g a c - 3' / 配列番号: 4, 5'-g t c a a g t c a g a t a c g c t c t c t a g a t t g g t t g t t t g t t t c - 3' / 配列番号: 5)、T116A(5'-a t t a c g g t g a g g a g g g c t g t t c g a g c a g g a g - 3' / 配列番号: 6, 5'-c t c c t g c t c g a a c a g c c c t c c t c a c c g t a a t - 3' / 配列番号: 7)及びA183S(5'-g g g c a a t c a c c a t a t c c a a g a t c c c a a a g a c c - 3' / 配列番号: 8, 5'-g g t c t t t g g g a t c t t g g a t a t g g t g a t t g c c c c - 3' / 配列番号: 9)である。

30

40

50

M遺伝子上に3箇所の変異を有するpBlueNaefrg-ΔFGFPをSalIで消化後ApaIで部分消化を行い、全M遺伝子を含むフラグメント(2644bp)を回収した。一方でpSeV18+/ΔF-GFPをApaI/NheIで消化してHN遺伝子を含む断片(6287bp)を回収し、この2種の断片をLitmus38(New England Biolabs, Beverly, MA)のSalI/NheIサイトにサブクロニングした(LitmusSalI/NheIfrg-MtsΔFGFPの構築)。HN遺伝子への温度感受性変異導入はこのLitmusSalI/NheIfrg-MtsΔFGFP上で、M遺伝子への変異導入時と同様にQuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kitを利用してKitに記載の方法に従って行った。HN遺伝子上への変異導入の種類はThompsonらが報告しているts271 strain(Thompson, S. D. et al., Virology 160:1-8(1987))の配列を利用し、A262T, G264R及びK461Gの3箇所の変異導入を行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は、A262T/G264R(5'-catgctctgtgtgggtgacaaacccggagctagggttatca-3'/配列番号:10, 5'-tgataaacccctagtcctgggtgtgtcacccacagagcatg-3'/配列番号:11)、及びK461G(5'-cttggtcttagaccaggaaatgaagagtgcatttggtacaaata-3'/配列番号:12, 5'-tattgtaccatttgcaactcttctcatcttctctgtgtcttagacaaag-3'/配列番号:13)である。今回はM或いはHN遺伝子への変異導入を別々のベクター上で行ったが、pSeV18+/ΔF-GFPをSalI/NheIで消化し得られるM及びHN遺伝子を含むフラグメント(8931bp)をLitmus38のSalI/NheIサイトにサブクロニングして得られるプラスミド(LitmusSalI/NheIfrg-ΔFGFP)を利用して、M及びHN遺伝子への全変異を導入することは可能である。このようにして順次変異導入を行い、M遺伝子上に3箇所、HN遺伝子上に3箇所の計6箇所の温度感受性変異を導入した(LitmusSalI/NheIfrg-MtsHNtsΔFGFPの構築)。

LitmusSalI/NheIfrg-MtsHNtsΔFGFPをSalI/NheIで消化して回収したフラグメント(8931bp)と、またpSeV18+/ΔF-GFPをSalI/NheIで消化して回収したM及びHN等遺伝子を含まないフラグメント(8294bp)をライゲーションして、M及びHN遺伝子に6箇所の温度感受性変異を有し、F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA(pSeV18+/MtsHNtsΔF-GFP)を構築した(図2)。

更に、搭載遺伝子発現量の定量を行う為に、分泌型アルカリホスファターゼ(SBAP)遺伝子を搭載したcDNAの構築も行った。即ち、SEAP遺伝子の下流に終止シグナル-介在配列-開始シグナルを有するSEAP断片(WO00/70070)をNotIで切り出し(1638bp)、電気泳動後回収・精製し、pSeV18+/ΔF-GFP及びpSeV18+/MtsHNtsΔF-GFPのNotIサイトに組み込んだ。それぞれ、pSeV18+/SEAP/ΔF-GFP及びpSeV18+/SEAP/MtsHNtsΔF-GFPとした(図2)。

[実施例2] 温度感受性変異導入ウィルスの再構成と増幅

ウィルスの再構成はLiらの報告(Li, H. - O. et al., J. Virology 74.6564-6569(2000), WO00/70070)に従って行った。F欠失型であるのでF蛋白のヘルパー細胞を利用するが、当該ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNDLw(Arai, T. et al., J. Virol. 72:1115-1121(1988))を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィルス(AxCANCre)をSaitoらの方法(Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-38

10

20

30

40

50

21 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) で感染させて挿入遺伝子を発現させる。SeV-F 蛋白の場合、F 遺伝子を有する同トランスフォーマント細胞を LLC-MK2/F7 と記載し、AxCA NC re で誘導後 F 蛋白を持続発現している細胞を LLC-MK2/F7/A と記載することにする。

温度感受性変異導入ウィルスの再構成は以下のように行った。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells/dish で 100 mm のシャーレに播き、24 時間培養後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365 nm) で 20 分間処理した T7 ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウィルス (PLWUV-VacT7: Fuers t, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) を室温で 1 時間感染させた (m.o.i. 2)。細胞を血清を含まない MEM で洗浄した後、プラスミド pSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L 及び pGEM/F-HN (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g 及び 4 μ g/dish の量比で Opti-MEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) に懸濁し、1 μ g DNA/5 μ L 相当の Superfect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) を入れて混合し、室温で 15 分間放置後、最終的に 3% FBS を含む Opti-MEM 3 mL に入れ、細胞に添加して培養した。5 時間培養後血清を含まない MEM で 2 回洗浄し、40 μ g/mL の Cytosine β -D-arabino furanoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) 及び 7.5 μ g/mL の Trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含む MEM で培養した。24 時間培養後、 8.5×10^6 cells/dish あたりに F 蛋白を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/A: Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000), WO00/70070) を重層し、40 μ g/mL の AraC 及び 7.5 μ g/mL の Trypsin を含む MEM で更に 2 日間 37 で培養した (P0)。これらの細胞を回収し、ペレットを 2 mL/dish あたりの Opti-MEM に懸濁した。凍結融解を 3 回繰り返した後、ライゼートをそのまま LLC-MK2/F7/A にトランスフェクションし、40 μ g/mL の AraC 及び 7.5 μ g/mL の Trypsin を含む血清を含まない MEM を用い 32 で培養した (P1)。5~7 日後培養上清の一部をとり、新たに調製した LLC-MK2/F7/A に感染させ、同 40 μ g/mL の AraC 及び 7.5 μ g/mL の Trypsin を含む血清を含まない MEM を用い 32 で培養した (P2)。3~5 日後に新たに調製した LLC-MK2/F7/A に再度感染させ、7.5 μ g/mL の Trypsin のみを含む血清を含まない MEM を用い 32 で 3~5 日間培養した (P3)。回収した培養上清に終濃度 1% になるように BSA を添加し -80 にて保存した。保存ウィルス液を解凍し、その後の実験に供した。

この方法で調製した各ウィルス溶液のタイターは SeV18+/ Δ F-GFP, SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, SeV18+/SEAP/ Δ F-GFP 及び SeV18+/SEAP/MtsHNts Δ F-GFP でそれぞれ、 3×10^8 , 7×10^7 , 1.8×10^8 及び 8.9×10^7 GFP-CIU/mL (GFP-CIU の定義は WO00/70070 に記載) であった。これらのタイターを測定する際、SeV18+/ Δ F-GFP 及び SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP について、F 蛋白を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/A) に感染後のプラークの広がりをも 32 及び 37 で観察した。感染 6 日後の写真を図 3 に示したが、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP は 32 ではある程度プラークの広がりがあるものの 37 では激減しており、ビリオン形成の減少が示唆された。

[実施例 3] ウィルス再構成における培養温度 (32) の効果

実施例 2 で示した温度感受性導入ウィルスの再構成実験において、P1 以降の温度を 32 で行った。これは温度感受性変異を導入するにあたって変異の参考にしたウィルスが 3

10

20

30

40

50

2 での生育が良い (Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268 : 21924 - 21930 (1993), Thompson, S. D. et al., Virology 160 : 1 - 8 (1987)) ことから試みたものであるが、当該実験条件を詳細に観察することで、SeV再構成にあたっては (温度感受性変異導入ウイルス以外でも)、P1以降で32で行うことで再構成効率が上昇し、従来取れ難かったものでも回収できるようになる可能性が高いことが明らかになった。

32でウイルス再構成効率が上昇する理由として2点考えられる。まず、ワクシニアウイルスの増幅を抑制する為に添加しているAracによる細胞毒性が、32での培養の方が抑制されていると考えられる点である。再構成時の条件である、40 μ g/mLのArac及び7.5 μ g/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用いてLLC-MK2/F7/Aを培養した場合、37では3-4日後で既に細胞障害が惹起され剥がれた細胞が増えてくるのに対し、32で培養した場合は7-10日は十分に培養継続が可能であり細胞が維持されている。転写複製効率の良くない或いは感染性ビリオン形成効率の良くないSeVを再構成する場合、培養継続期間は再構成の可否に直接反映されると考えられる。2点目は32で培養した場合にはLLC-MK2/F7/AにおけるF蛋白の発現が維持されている点である。F蛋白を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/A) を6wellプレートに10% FBSを含むMEMでコンフルエントになるまで37で培養後、7.5 μ g/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMに置換し32 或いは37で培養し、経時的にセルスクレーパーで細胞を回収した後、抗F抗体 (マウスモノクローナル) を利用したWestern-blottingを行うことで、細胞内のF蛋白質を半定量的に解析した。37では2日間は発現が維持されているもののそれ以降は減少していたが、32では少なくとも8日間はF蛋白の発現が維持されていた (図4)。この点からも32での再構成 (P1以降) の有効性が確認された。

上記Western-blottingは以下の方法で行った。6wellプレートの1wellから回収した細胞を-80で凍結保存後、1xに希釈したSDS-PAGE用サンプルバッファー (Red Loading Buffer Pack; New England Biolabs, Beverly, MA) 100 μ Lで溶解し、98で10分間加熱した。遠心後、上清10 μ LをSDS-PAGEゲル (マルチゲル10/20; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd, Tokyo, Japan) にロードした。15mMで2.5時間泳動後、PVDF膜 (Immobilon PVDF transfer membrane; Millipore, Bedford, MA) にセミドライ法にて100mAで1時間転写した。転写膜をブロッキング溶液 (Block Ace; Snow Brand Milk Products Co., Ltd, Sapporo, Japan) で4-1時間以上放置した後、10% Block Aceを含み抗F抗体を1/1000容量添加した一次抗体溶液に浸し、4で一晩放置した。0.05% Tween20を含むTBS (TBST) で3回、更にTBSTで3回洗浄した後、10% Block Aceを含みHRPを結合した抗マウスIgG + IgM抗体 (Goat F(ab')₂ Anti-Mouse IgG + IgM, HRP; BioSource Int., Camarillo, CA) を1/5000容量添加した二次抗体溶液に浸し、室温で1時間振盪した。TBSTで3回、TBSTで3回洗浄した後、化学発光法 (ECL western blotting detection reagents; Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden) により検出した。

[実施例4] 温度感受性変異導入ウイルスの2次放出粒子定量 (HA assay, Western-blotting)

SeV18+/ Δ F-GFP, SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPと共に、全てのウイルス蛋白を有する自立複製型でNotI部位にGFP遺伝子とその下流に終止シグナル-介在配列-開始シグナルを有するGFP断片 (780bp) を搭載したSeV (SeV18+GFP: 図2) を用いて比較を行った。

10

20

30

40

50

6 w e l l p l a t e においてコンフルエントに増殖させた L L C - M K 2 細胞に、 3×10^7 C I U / m L の各ウイルス溶液を 1 w e l l あたり 100 μ L を添加して (m . o . i . 3) 1 時間感染し、M E M で洗浄後、1 w e l l あたり 1 m L の血清を含まない M E M を添加して 32 , 37 及び 38 の各温度で培養した。1 日毎にサンプリングし、サンプリング後直ぐに血清を含まない新しい M E M 1 m L を添加して経時的に培養・サンプリングを行った。感染 3 日後に蛍光顕微鏡下で G F P 発現の観察を行った所 3 種のウイルス共に、また 32 , 37 及び 38 の全ての条件において、ほぼ同程度に感染し、また類似した G F P の発現があると予想された (図 5)。

2 次放出粒子は赤血球凝集活性 (H A 活性) で定量し、K a t o らの方法 (K a t o , A . e t a l . , G e n e s C e l l 1 , 569 - 579 (1996)) に倣って行った。即ち、丸底の 96 穴プレートを使用し、ウイルス液を段階的に P B S で希釈し各 w e l l 50 μ L の 2 倍希釈系列を作製した。その 50 μ L に 1 % 濃度に P B S で希釈したニワトリ保存血 (コスモバイオ , T o k y o , J a p a n) 50 μ L を混合し、4 で 1 時間放置し赤血球の凝集を観察し、凝集したもののうち最もウイルス希釈率の高いものの希釈率を H A 活性として判定した。また、1 H A U を 1×10^6 ウィルスと換算して、ウィルス数で表した (図 6)。S e V 18 + / M t s H N t s Δ F - G F P で 2 次放出粒子がかなり減少し、37 で S e V 18 + / Δ F - G F P の約 1 / 10 に減少していると判断された。また、S e V 18 + / M t s H N t s Δ F - G F P は、32 でもウィルス粒子形成は減少しているが、少ないながらもある程度は粒子がでるので、生産が可能になっていると考えられた。

別の観点からの 2 次放出粒子の定量として、W e s t e r n - B l o t t i n g による定量を行った。上記と同じように L L C - M K 2 細胞に m . o . i . 3 で感染後、感染 2 日後に培養上清と細胞を回収し、培養上清は 48 , 000 g で 45 分間遠心しウィルス蛋白を回収した。S D S - P A G E 後、W e s t e r n - B l o t t i n g を行い、抗 M 抗体で検出した。抗 M 抗体は新たに調製したポリクローナル抗体であり、S e V - M 蛋白質の 1 - 13 (M A D I Y R F P K F S Y E + C y s / 配列番号 : 14) , 23 - 35 (L R T G P D K K A I P H + C y s / 配列番号 : 15) 及び 336 - 348 (C y s + N V V A K N I G R I R K L / 配列番号 : 16) の合成ペプチドを 3 種混合して免疫したウサギ血清から調製したものである。W e s t e r n - B l o t t i n g は実施例 3 に記載の方法で行い、一次抗体の抗 M 抗体は 1 / 4000 希釈、二次抗体の H R P を結合した抗ラビット I g G 抗体 (A n t i - r a b b i t I g G (G o a t) H + L c o n j . ; I C N P . , A u r o l a , O H) は 1 / 5000 容量に希釈したものを使用した。S e V 18 + / M t s H N t s Δ F - G F P では、細胞中には M 蛋白が同程度に多く発現しているのに対し v i r u s の蛋白量が減少しており (図 7)、W e s t e r n - B l o t t i n g の手法によっても、当該ウイルスに於いて 2 次放出粒子が減少していることが確認された。

[実施例 5] 温度感受性変異導入ウイルスの搭載遺伝子発現量 (S E A P a s s a y) S e V 18 + / M t s H N t s Δ F - G F P において 2 次放出粒子が減少しているが、それと同時に搭載遺伝子の発現量が減少しては遺伝子発現ベクターとしては意味のない改変になってしまうので、その発現量について検証を行った。S e V 18 + S E A P / Δ F - G F P 及び S e V 18 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を L L C - M K 2 細胞に m . o . i . 3 で感染後、経時的に (感染 12 , 18 , 24 , 50 , 120 時間後) 培養上清を回収し、上清中の S E A P 活性を R e p o r t e r A s s a y K i t - S E A P (T O Y O B O , O s a k a , J a p a n) を利用して K i t に記載の方法に従って行った。S E A P 活性は両者間での差が殆どなかった (図 8)。また同サンプルについて赤血球凝集活性 (H A 活性) を測定したが、H A 活性は S e V 18 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P でやはり約 1 / 10 に減少していた (図 9)。また、同サンプルのウイルスを 48 , 000 g で 45 分間遠心しウィルス蛋白を回収した後、W e s t e r n - B l o t t i n g で抗 M 抗体を利用して半定量的に解析した。この場合も、上清中のウィルス蛋白の減少が確認された (図 10)。温度感受性変異の導入によって、搭載遺伝子

10

20

30

40

50

の発現量を殆ど減少することなく、2次放出粒子を約1/10に減少できたと判断された。

[実施例6] 温度感受性変異導入ウィルスの細胞障害性 (LDH assay)
SeV感染によって細胞が障害を受ける場合も多い。この点に関して、変異導入による影響を調べた。LLC-MK2, BEAS-2B及びCV-1細胞をそれぞれ 2.5×10^4 cells/well (100 μ L/well)で96well plateに播き培養した。培養にはLLC-MK2及びCV-1には10% FBSを含むMEMを、BEAS-2Bには10% FBSを含むD-MEM及びRPMI (Gibco-BRL, Rockville, MD)の1:1混合液を使用した。24時間培養後、1% BSAを含むMEMで希釈したSeV18+/ Δ F-GFP或いはSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP溶液を5 μ L/wellで添加し感染させ、6時間後ウィルス液を含む培地を除き、10% FBSを含む或いは含まない各培地に置き換えた。FBSを含まない培地の場合は感染3日後に、FBSを含む培地の場合は感染6日後に培養上清をサンプリングし、Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland)を利用してKitに記載の方法に従って細胞障害性の定量を行った。LLC-MK2では両者ともに細胞障害は観察されなかった。またCV-1及びBEAS-2Bにおいては、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPの細胞障害性はSeV18+/ Δ F-GFPと同等以下であると判断された(図11)。即ち、温度感受性変異導入での2次放出粒子の抑制による細胞障害性の惹起はないと結論した。

[実施例7] 2次放出粒子抑制メカニズムの検討
温度感受性変異導入によって2次粒子抑制が可能となったメカニズムの一端を調べる為に、M蛋白の細胞内局在について調べた。各SeV (SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP, SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP)をLLC-MK2細胞にそれぞれ感染し、32、37或いは38で培養し2日後に抗M抗体を利用して免疫染色を行った。免疫染色は以下の方法で行った。培養細胞をPBSで1回洗浄した後、-20に冷却したメタノールを添加し4で15分間固定した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Serum及び0.1% Tritonを含むPBS溶液で室温1時間Blockingを行った。再度PBSで3回洗浄後、2% Goat Serumを含む一次抗体溶液(10 μ g/mL抗M抗体)で37 30分間反応した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Serumを含む二次抗体溶液(10 μ g/mL Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate: Molecular Probes, Eugene, OR)で37 15分間反応した。最後にPBSで3回洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察した。自立複製型でF, HN両蛋白を有するSeV18+GFPでは、検討した何れの温度においても細胞表面でのM蛋白の濃縮像が観察された(図12)。このようなM蛋白の濃縮像に関しては既に報告されており(Yoshida, T. et al., Virology 71:143-161 (1976))、ビリオン形成の場所を反映していると考えられている。即ちSeV18+GFPにおいては、何れの温度においてもM蛋白の細胞表面への局在が正常であり、十分なビリオンが形成していることを示していると考えられる。一方SeV18+/ Δ F-GFPでは、38においてM蛋白の濃縮像が極端に減少した。M蛋白はF及びHN蛋白のそれぞれのCytoplasmic tailに結合して、細胞表面へ局在すると考えられており(Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68:69-76 (1994)、Ali, A. et al., Virology 276:289-303 (2000))、SeV18+/ Δ F-GFPではその一方のF蛋白を欠失している為、M蛋白の局在に影響していると考えられる。また、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPではその影響が強く出て、37でさえM蛋白の局在に支障が出て、結果的に2次放出粒子減少に繋がったものと予想された。

[実施例8] 2次放出粒子抑制メカニズムの検討(2)
細胞内におけるSeV蛋白の細胞内局在をより詳細に調べるために、共焦点レーザー顕微鏡(MRC1024; Bio-Rad Laboratories Inc., Herc

ules, CA) による解析を実施した。SeV18 + SEAP / ΔF - GFP 及び SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP を A - 10 細胞 (rat myoblast) にそれぞれ感染し (m.o.i. 1)、32 或いは 37 で 10% 血清を含む MEM で培養し、1 日後及び 2 日後に抗 M 抗体及び抗 HN 抗体を利用して免疫染色を行った。免疫染色は以下の方法で行った。培養感染細胞を PBS で 1 回洗浄した後、-20 に冷却したメタノールを添加し 4 で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、2% Goat Serum, 1% BSA 及び 0.1% Triton を含む PBS 溶液で室温 1 時間ブロッキングを行った。2% Goat Serum を含む M の一次抗体溶液 (10 μg / mL 抗 M 抗体) で 37 30 分間反応し、更に HN の一次抗体溶液 (1 μg / mL 抗 HN 抗体 (IL4 - 1)) で 37 30 分間反応した。PBS で 3 回洗浄後、2% Goat Serum を含む二次抗体溶液 (10 μg / mL Alexa Fluor 568 goat anti - rabbit IgG (H + L) conjugate 及び 10 μg / mL Alexa Fluor 488 goat anti - mouse IgG (H + L) conjugate: Molecular Probes, Eugene, OR) で 37 15 分間反応した。PBS で 3 回洗浄後、核を染色するために 1 / 4000 に希釈した TO__PRO3 (Molecular Probes, Eugene, OR) を添加後室温で 15 分間放置し、最後に消光を抑えるために、Slow Fade Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) の溶液に置換し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。感染 1 日後の結果を図 13 に示したが、赤色が M 蛋白、緑色が HN 蛋白の局在を示し、共存している場合には黄色に表される。また遠赤色を色変換しているため青色が核である。SeV18 + SEAP / ΔF - GFP の場合は、32, 37 何れの温度においても各蛋白の局在に大きな違いはなく、細胞表面への M 蛋白及び HN 蛋白の局在が観察されている。一方 SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP の場合は、両温度ともに各蛋白の局在に SeV18 + SEAP / ΔF - GFP の場合と比べ違いがあり、細胞表面での M 蛋白の局在がほとんどない。特に 37 の場合は、M 蛋白と HN 蛋白がほぼ完全に分離し、M 蛋白は微小管 (microtubule) の中心体付近 (すなわちゴルジ体付近) と予想される部分に局在して存在している。感染後 2 日間培養した場合も同様の結果が得られており、特に SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP 感染細胞においては、M 蛋白の細胞内局在に感染 1 日後と変化がなく (図 14)、それぞれの位置で移動が止まっているように見える。この結果によっても、温度感受性変異導入ウィルスで二次放出粒子が減少しているのは、粒子形成の中心的な役割を担っていると考えられている M 蛋白の局在不全であると断定された。

また、SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP 感染後 32 で培養した場合、M 蛋白が微小管の形態に近い形で染色されている (図 13)。実際に微小管の関与を証明するために、微小管の脱重合を促進する薬剤を添加し、M 蛋白 (及び HN 蛋白) の局在の変化を調べた。SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP を A - 10 に m.o.i. 1 で感染後、直後に脱重合試薬である colchicine (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) 或いは colcemide (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) を終濃度 1 μM 添加し、32 で培養した。感染 2 日後に上述と同じ方法で、M 蛋白、HN 蛋白の細胞内局在を観察した。脱重合試薬を添加しない場合は、M 蛋白は微小管様形態に似た分布を示した (図 13) のに対し、脱重合試薬を添加することで、その構造が壊れ、大きな繊維状構造体として検出された (図 15)。この構造は、M 蛋白そのものが凝集したものか或いは脱重合した微小管の残骸に M 蛋白が結合している可能性があるが、何れにしても図 13 に見られる、SeV18 + SEAP / MtsHNtsΔF - GFP 感染後 32 で培養した場合の M 蛋白は、微小管に沿って局在している可能性が高いと判断された。

上記の微小管への M 蛋白の局在が温度感受性ウィルスの特有のものか否かを調べるために、SeV18 + / ΔF - GFP 及び SeV18 + / MtsHNtsΔF - GFP の両ウィルスについて、感染後の M 蛋白 (及び HN 蛋白) の局在変化に対する微小管脱重合試薬 (

colchicine)の影響を調べた。SeV18+/ΔF-GFP あるいは SeV18+/MtsHNtsΔF-GFP を A-10 に m.o.i. 1 で感染後、直後に脱重合試薬である colchicine を終濃度 1 μM 添加し、32 あるいは 37 で培養した。感染2日後に上述と同じ方法で、M蛋白(及びHN蛋白)の細胞内局在を観察した。結果を図16に示すが、両ウイルス感染細胞共に類似の現象を示した。即ち、感染後32で培養した場合は図15と同様に大きな繊維状構造体として観察された。SeV18+/ΔF-GFP の場合もM蛋白は微小管と共存している可能性が示唆された。更に、37においては特にSeV18+/MtsHNtsΔF-GFP 感染細胞において、ゴルジ体付近と予想される部位に局在して観察された。

以上の結果から、以下のことが推察される。M蛋白はゴルジ体付近で合成され、主にF及びHN蛋白のそれぞれのCytoplasmic tailに結合した状態(Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68:69-76 (1994)、Ali, A. et al., Virology 276:289-303 (2000))で微小管に沿って(例えばキネシンのようなモーター蛋白に結合して)細胞内を移動し、細胞表面へ局在し粒子形成が達成される。温度感受性変異を導入したウイルスにおいては、32においては微小管に沿った細胞内移動までは正常であるが、微小管から細胞表面へ局在する段階で不具合が生じ、微小管に沿っての局在が観察されていると考えることができる。37においては微小管に沿った細胞内移動さえ不具合が生じ、ゴルジ体付近で局在が観察されていると捉えることができる。M蛋白質の合成の場としては、ゴルジ体付近と予想されるが、凝集が観察されるのがその付近ということであって、合成の場そのものは別である可能性がある。但し、過去の報告例によると、微小管のコンポーネントであるtubulinはSeVの転写・複製活性に関与し、転写・複製を促進することが報告されており(Moyer, S.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5405-5409 (1986); Oginno, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 35999-36008 (1999))、またゴルジ体は、そのtubulinが多く存在すると予想される中心体付近に局在することから、微小管の中心体付近(すなわちゴルジ体付近)で合成されると予想できる。更に、SeVの変異株であるF1-R strainはM遺伝子に変異を有しているが、感染後微小管を変化させて、F1-R strainの細胞の極性に依存しない粒子形成を可能にしていると考えられている(Tashiro, M. et al., J. Virol. 67, 5902-5910 (1993))。即ち、tubulinに沿ったM蛋白の細胞内移動を想定することで、本実施例の結果も説明できる。このように予想されるメカニズムにおいて、M及びHN遺伝子へ当該温度感受性変異を導入することで、M蛋白の細胞内局在の不具合を生じ、結果的に二次放出粒子の減少が達成されていると判断された。

[実施例9] P及びL遺伝子へ変異を導入したF欠失型SeVゲノムcDNAの構築
F欠失型SeVベクターへのさらなる変異導入による二次放出粒子抑制(及び細胞障害性減弱)を目的として、持続感染SeVで同定されている遺伝子構造(Bossow, S. et al., Negative Strand Viruses 2000 P157)をもとにした改変を行った。実際のデザインは次の2種について行った。何れも上記持続感染SeVの解析で同定されたものであり、Pに一ヶ所(2種で異なる)、Lに二ヶ所(2種で同じ)の変異を導入した。具体的には、P(E86K), L(N1197S/K1795E)及びP(L511F), L(N1197S/K1795E)の2種類である。これらの変異を有する同定された変異株は、転写・複製がそれぞれ1/4-1/8及び1/2-1/3に減少し、virus releaseは約1%にまで減少していたと報告されていた(Bossow, S. et al., Negative Strand Viruses 2000 P157)。

変異導入のスキームを図17に示した。F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウイルス全長ゲノムcDNA(pSeV18+/ΔF-GFP: Li, H. - O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000), WO 00/70070)をSalI及びNheIで消化しNP遺伝子を含む断片(8294 b

10

20

30

40

50

p)を回収し、合成オリゴDNAを利用してマルチクローニングサイトを導入した(pSeV/ Δ SalINheIfrg-MCSの構築)。マルチクローニングサイト導入に使用した合成オリゴの配列は(5'-tcgacacccagggtattttaaatatttaattcgcgcgag-3'/配列番号:17, 5'-ctagctcgcgcgatttaatttaattttaaataccctgggtg-3'/配列番号:18)である。構築したpSeV/ Δ SalINheIfrg-MCSを用いてL遺伝子への変異導入を行った。変異導入にはQuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)を利用してKitに記載の方法に従って行った。L遺伝子のN1197Sの変異導入に使用した合成オリゴの配列は(5'-gttctatcttctcctgacTCTatagacccctggacacgccttac-3'/配列番号:19, 5'-gtaaagcgtgtccagggtctataGAggtcaggaagatagaac-3'/配列番号:20)、K1795Eの変異導入に使用した合成オリゴの配列は(5'-ctacctatttgagccccccttagttgacGaAgataaagataggccta-3'/配列番号:21, 5'-tagccctatcttttatctTtCgtcaactaaaggggctcaataggtag-3'/配列番号:22)である。P遺伝子への変異導入は、pSeV18+/ Δ F-GFPをSalI/NheIで消化して回収したP遺伝子を含むフラグメント(8931bp)をLitmus38の同サイトへライゲーションして得られているLitmusSalI/NheIfrg Δ F-GFPを用いて行った。P遺伝子のE86Kの変異導入に使用した合成オリゴの配列は(5'-caagataatcgaatcagggtAaAgagagtagaggtctcttgaggag-3'/配列番号:23, 5'-ctccccagagactctactctctTtTacctgacgaattatctttg-3'/配列番号:24)、L511Fの変異導入に使用した合成オリゴの配列は(5'-ctcaaacgcatacacgtctctTtTccccctccaaagagaaagc-3'/配列番号:25, 5'-gcttctctcttttgaggggAaAgagacgtgatgcgttttgag-3'/配列番号:26)である。変異導入後、P遺伝子にそれぞれ一ケ所の変異を有するプラスミド(LitmusSalI/NheIfrg Δ F-GFP)をSalI/NheIで消化して回収したフラグメント(8294bp)と、また、L遺伝子に二ケ所の変異を有するプラスミド(pSeV/ Δ SalINheIfrg-MCS)をSalI/NheIで消化して回収したL遺伝子を含むフラグメント(8931bp)をライゲーションして、pSeV18+/P86Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP(P(E86K), L(N1197S/K1795E)の変異を有する)及びpSeV18+/P511Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP(P(L511F), L(N1197S/K1795E)の変異を有する)を構築した(pSeV18+/PLmut Δ F-GFPと総称する)。更に、搭載遺伝子発現量の定量を行う為に、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子を搭載したcDNAの構築も行った。即ち、SEAP遺伝子の下流に終止シグナル-介在配列-開始シグナルを有するSEAP断片(W000/70070)をNotIで切り出し(1638bp)、pSeV18+/P86Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP及びpSeV18+/P511Lmut $\cdot\Delta$ F-GFPの+18位のNotIサイトに組み込んだ。それぞれ、pSeV18+SEAP/P86Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP、及びpSeV18+SEAP/P511Lmut $\cdot\Delta$ F-GFPとした。

[実施例10]持続感染SeVの配列をP/Lへ導入したF欠失型SeVの再構成と増幅ウィルスの再構成はLiらの報告(Li, H.-O. et al., J. Virology-74, 6564-6569(2000), W000/70070)に従って行った。詳細は本明細書の実施例2に記載の方法で行った。同方法で調整した各ウィルス溶液のタイトルはSeV18+/P86Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP, SeV18+/P511Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP, SeV18+SEAP/P86Lmut $\cdot\Delta$ F-GFP及びSeV18+SEAP/P511Lmut $\cdot\Delta$ F-GFPでそれぞれ、 4.0×10^8 , 2.8×10^8 , 3.7×10^8 及び 2.0×10^8 GFP-CIU/mL(GFP-CIUの定義はW000/70070に記載)であった。

[実施例 1 1] 持続感染 S e V の配列を P / L へ導入した F 欠失型 S e V の 2 次放出粒子定量

2 次放出粒子の定量は感染細胞の培養上清を用いた H A 活性の測定により行った。この時、S e V 1 8 + / Δ F - G F P との比較を行った。実験方法の詳細は上記の実施例 4 に記載しているが、簡単に記すと、6 w e l l p l a t e においてコンフルエントに増殖させた L L C - M K 2 細胞に、 1×10^7 C I U / m L 或いは 5×10^7 C I U / m L の各ウィルス溶液を 1 w e l l あたり 1 0 0 μ L を添加して (それぞれ、M O I 1 或いは M O I 5) 1 時間感染し、M E M で洗浄後、1 w e l l あたり 1 m L の血清を含まない M E M を添加して 3 7 ° C で培養した。1 日毎にサンプリングし、サンプリング後直ぐに血清を含まない新しい M E M 1 m L を添加して経時的に培養・サンプリングを行った。

H A 活性の測定は K a t o らの方法 (K a t o , A . e t a l . , G e n e s C e l l 1 , 5 6 9 - 5 7 9 (1 9 9 6)) に倣って行った。即ち、丸底の 9 6 穴プレートを使用し、ウィルス液を段階的に P B S で希釈し各 w e l l 5 0 μ L の 2 倍希釈系列を作製した。その 5 0 μ L に 1 % 濃度に P B S で希釈したニワトリ保存血 (コスモバイオ , T o k y o , J a p a n) 5 0 μ L を混合し、4 ° C で 1 時間放置し赤血球の凝集を観察し、凝集したもののうち最もウィルス希釈率の高いものの希釈率を H A 活性として判定した。

M O I 1 で感染した場合も M O I 5 で感染した場合も、P 及び L へ持続感染 S e V の配列を導入したベクターの感染細胞では 2 次放出粒子量が僅かに減少していた (図 1 8) 。則ち、P 及び L への変異導入によって、2 次放出粒子形成を僅かながら減少できたと判断される。但し、抑制の程度はそれ程大きくはない。特徴的なのは感染後期において、S e V 1 8 + / Δ F - G F P 感染細胞では徐々に 2 次放出粒子量は減少しているのに対して、S e V 1 8 + / P 8 6 L m u t . Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t . Δ F - G F P 感染細胞では、その減少がほとんど無いことである。この点は P 及び L への変異導入によって、細胞傷害性が減弱化し、感染後期においても S e V ベクターの転写・複製が維持され、2 次放出粒子形成の維持が観察されていると予想された。

[実施例 1 2] 持続感染 S e V の配列を P / L へ導入した F 欠失型 S e V の細胞傷害性細胞傷害性に関しては、C V - 1 細胞において S e V 感染依存的な顕著な細胞傷害性が観察できることから、この C V - 1 細胞を利用して評価した。またコントロールとして、P / L への変異導入のない F 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ F - G F P) を使用した。実験方法の詳細は実施例 6 に記載している。簡単に記すと、C V - 1 細胞を 2.5×10^4 c e l l s / w e l l (1 0 0 μ L / w e l l) で 9 6 w e l l p l a t e に播き培養した。培養には 1 0 % F B S を含む M E M を使用した。2 4 時間培養後、1 % B S A を含む M E M で希釈した S e V 1 8 + / Δ F - G F P , S e V 1 8 + / P 8 6 L m u t . Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t . Δ F - G F P 溶液を 5 μ L / w e l l で添加し感染させ、6 時間後ウィルス液を含む培地を除き、F B S を含まない M E M 培地に置き換えた。感染 3 日後に培養上清をサンプリングし、C y t o t o x i c i t y D e t e c t i o n K i t (R o c h e , B a s e l , S w i t z e r l a n d) を利用して K i t に記載の方法に従って細胞傷害性の定量を行った。S e V 1 8 + / P 8 6 L m u t . Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t . Δ F - G F P において S e V 1 8 + / Δ F - G F P よりも明らかな細胞傷害性の減弱が観察された (図 1 9) 。

同実験時における、G F P 陽性細胞を経時的にカウントした。P 及び L へ持続感染 S e V の配列を導入した二種のベクターの感染 C V - 1 細胞で G F P 陽性細胞の数が維持されていた (図 2 0) 。C V - 1 細胞は S e V 感染依存的な細胞傷害を受け易く、感染細胞は容易に剥がれてしまう。P 及び L へ持続感染 S e V の配列を導入したベクターの感染細胞が良く維持されていることは、これらのベクターで細胞傷害性が減弱していることを強く支持している。

同感染 (M O I 1 0) C V - 1 細胞の感染 3 日後及び 6 日後の蛍光顕微鏡写真を図 2 1 に示した。同様に P 及び L へ持続感染 S e V の配列を導入したベクターの感染細胞の数も多く、状態も良いことが視覚的にも確認された。特に、S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t

・ ΔF -GFP感染CV-1細胞は増殖しているようにも見える。則ち、これらの結果は、P及びLへ持続感染SeVの配列を導入することで、SeV感染依存的な細胞傷害性を減弱化可能であることを示している。

[実施例13] 持続感染SeVの配列をP/Lへ導入したF欠失型SeVの搭載遺伝子発現量定量

SeV18+/P86Lmut・ ΔF -GFP及びSeV18+/P511Lmut・ ΔF -GFPの2次放出粒子減少及び細胞傷害性減弱の性質は、初めに同定された変異株における、転写・複製の減弱(それぞれ1/4-1/8及び1/2~1/3と報告:Boscow, S. et al., Negative Strand Viruses 2000 P157)に起因する可能性がある。その時、転写・複製の減弱によって、搭載遺伝子の発現量も抑制し、その低下が大きい場合はSeVベクターの利点の一つを消失することになる。そこで、持続感染SeVの配列をP/Lへ導入したSeVベクターについても+18位にSEAP遺伝子を挿入したものを作製し、感染細胞からのSEAP発現量を経時的に測定した。

実験方法の詳細は実施例5に記載している。簡単に記すと、SeV18+/SEAP/ ΔF -GFP, SeV18+/SEAP/P86Lmut・ ΔF -GFP及びSeV18+/SEAP/P511Lmut・ ΔF -GFPをLLC-MK2細胞にm.o.i.10で感染後、経時的に(24時間毎に)培養上清を回収し、上清中のSEAP活性をReporter Assay Kit-SEAP(TOYOBO, Osaka, Japan)を利用してKitに記載の方法に従って行った。SEAP活性値は全てのベクター間でほとんど同じだった(図22)。則ち、持続感染SeVの配列をP/Lへ導入したベクターでも発現量の低下はほとんどないと判断された。

また、SEAP遺伝子を搭載した各ベクターについても、感染細胞からの2次放出粒子量及び細胞傷害性の指標として感染細胞培養上清中のLDH量を定量した。2次放出粒子量ではSEAP遺伝子の搭載の影響が大きく反映されて、持続感染SeVの配列をP/Lへ導入した2種のベクターともに、2次放出粒子量が約1/10に減少した(図23)。P/Lへの変異導入の効果がより反映されていると判断される。また、細胞傷害性に関しては、SEAP遺伝子の搭載のないベクターの場合と同様に、持続感染SeVの配列をP/Lへ導入したことで細胞傷害の減弱が観察された(図24)。

[実施例14] 温度感受性変異及びP/L変異の両者を有するF欠失型SeVゲノムcDNAの構築

M蛋白及びHN蛋白への温度感受性変異の導入とP蛋白及びL蛋白への持続感染SeV由来配列の導入を組み合わせることによって、それぞれの変異単独の場合よりも更に二次放出粒子抑制(及び細胞障害性減弱)の効果が得られる可能性がある。そこで、温度感受性変異である6種類の変異(M:G69E, T116A, A183S, HN:A262T, G264R, K461G)及び持続感染SeV由来の変異(P:E86K或いはL511F, L:N1197S, K1795E)の合計9種類の変異を有する2種類のF欠失型SeVベクター(図25:SeV18+/MtsHNtsP86Lmut・ ΔF -GFP, SeV18+/MtsHNtsP511Lmut・ ΔF -GFP)の構築を行った。

変異導入のスキームを図26に示した。温度感受性変異を有するF欠失型セグダイウィルスベクターゲノムcDNA(pSeV18+/MtsHNts・ ΔF -GFP:実施例1参照)をSalI及びNheIで消化しP遺伝子を含むフラグメント(8931bp)をLitmus38の同サイトヘライゼーションして得られるLitmusSalI/NheIfrg MtsHNts・ ΔF -GFPを用いて行った。実施例1に記載の方法で行い、P遺伝子のE86Kの変異導入には(5'-caagataaatcgaatcaggtaAaAgagagtagaggtctctgggag-3'/配列番号:23, 5'-ctcccaagagactctactctctTtTaccctgatcgaattatctttg-3'/配列番号:24)の配列の合成オリゴを使用し、L511Fの変異導入には(5'-ctcaaacgcatacacgtctctTtTccctcccaagagagagc-3'/配列番号:25, 5'-gcttctcttttggagggaAaAgagagacgt

g a t g c g t t t g a g - 3 ' / 配列番号 : 2 6) の配列の合成オリゴを使用した。変異導入後、P 遺伝子にそれぞれ一ヶ所の変異を有するプラスミド (L i t m u s S a l I / N h e I f r g M t s H N t s Δ F - G F P) を S a l I / N h e I で消化して回収したフラグメント (8 2 9 4 b p) と、また、実施例 1 で構築した、L 遺伝子に二ヶ所の変異を有するプラスミド (p S e V / Δ S a l I N h e I f r g - M C S) を S a l I / N h e I で消化して回収した L 遺伝子を含むフラグメント (8 9 3 1 b p) をライゲーションして、p S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t · Δ F - G F P (温度感受性変異及び P (E 8 6 K) , L (N 1 1 9 7 S / K 1 7 9 5 E) の変異を有する) 及び p S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t · Δ F - G F P (温度感受性変異及び P (L 5 1 1 F) , L (N 1 1 9 7 S / K 1 7 9 5 E) の変異を有する) を構築した (p S e V 1 8 + / M t s H N t s P L m u t Δ F - G F P と総称する) 。 10

更に、搭載遺伝子発現量の定量を行う為に、分泌型アルカリホスファターゼ (S E A P) 遺伝子を搭載した c D N A の構築も行った。即ち、S E A P 遺伝子の下流に終止シグナル - 介在配列 - 開始シグナルを有する S E A P 断片 (W O 0 0 / 7 0 0 7 0) を N o t I で切り出し (1 6 3 8 b p) 、p S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t · Δ F - G F P 及び p S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t · Δ F - G F P の + 1 8 位の N o t I サイトに組み込んだ。それぞれ、p S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 8 6 L m u t · Δ F - G F P , 及び p S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t · Δ F - G F P とした。 20

[実施例 15] 温度感受性変異及び P / L 変異の両者を有する F 欠失型 S e V の再構成と増幅 20

ウィルスの再構成は L i らの報告 (L i , H . - O . e t a l . , J . V i r o l o g y 7 4 . 6 5 6 4 - 6 5 6 9 (2 0 0 0) , W O 0 0 / 7 0 0 7 0) に従って行った。詳細は本明細書の実施例 2 に記載の方法で行った。同方法で調整した各ウィルス溶液のタイトルは S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t · Δ F - G F P , S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t · Δ F - G F P , S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 8 6 L m u t · Δ F - C F P 及び S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t · Δ F - G F P でそれぞれ、 8.6×10^8 , 4.2×10^8 , 1.7×10^8 及び 1.7×10^8 G F P - C I U / m L (G F P - C I U の定義は W O 0 0 / 7 0 0 7 0 に記載) であった。 30

[実施例 16] 温度感受性変異及び P / L 変異の両者を有する F 欠失型 S e V の 2 次放出粒子定量

2 次放出粒子の定量は感染細胞の培養上清を用いた H A 活性の測定により行った。この時、S e V 1 8 + / Δ F - G F P との比較を行った。実験方法の詳細は実施例 4 及び実施例 1 1 に記載しているが、簡単に記すと、6 w e l l p l a t e においてコンフルエントに増殖させた L L C - M K 2 細胞に、 1×10^7 C I U / m L 或いは 3×10^7 C I U / m L の各ウィルス溶液を 1 w e l l あたり 1 0 0 μ L を添加して (それぞれ、M O I 1 或いは M O I 3) 1 時間感染し、M E M で洗浄後、1 w e l l あたり 1 m L の血清を含まない M E M を添加して 3 7 ° で培養した。1 日毎にサンプリングし、サンプリング後直ぐに血清を含まない新しい M E M 1 m L を添加して経時的に培養・サンプリングを行った。 40

H A 活性の測定は K a t o らの方法 (K a t o , A . e t a l . , G e n e s C e l l 1 , 5 6 9 - 5 7 9 (1 9 9 6)) に倣って行った。即ち、丸底の 9 6 穴プレートを使用し、ウィルス液を段階的に P B S で希釈し各 w e l l 5 0 μ L の 2 倍希釈系列を作製した。その 5 0 μ L に 1 % 濃度に P B S で希釈したニワトリ保存血 (コスモバイオ , T o k y o , J a p a n) 5 0 μ L を混合し、4 ° で 1 時間放置し赤血球の凝集を観察し、凝集したもののうち最もウィルス希釈率の高いものの希釈率を H A 活性として判定した。

M O I 1 で感染した場合も M O I 3 で感染した場合も、温度感受性変異及び P / L 変異の両者を有する F 欠失型 S e V ベクターの感染細胞では変異のない F 欠失型 S e V (S 50

e V 1 8 + / Δ F - G F P) の感染細胞よりも 2 次放出粒子量が減少していた (図 2 7) 。特に、S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P においては、P / L 変異のない S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P よりもさらに 2 次放出粒子が減少し、P / L 変異導入による相加的な効果が確認された。但し、S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P においては S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P よりも 2 次放出粒子量が増加し、この場合は相加的な効果が観察されなかった。2 次放出粒子の抑制という観点に絞れば、S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P は非常に優れていると判断された。

[実施例 1 7] 温度感受性変異及び P / L 変異の両者を有する F 欠失型 S e V の細胞傷害性

細胞傷害性に関しては、C V - 1 細胞を利用して評価した。またコントロールとして、P / L への変異導入のない F 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ F - G F P) 、温度感受性変異のみを有する S e V (S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P) 及び P / L 変異のみを有する 2 種の S e V (S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P 、 S e V 1 8 + / P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P) を使用した。実験方法の詳細は実施例 6 及び実施例 1 2 に記載している。簡単に記すと、C V - 1 細胞を 2.5×10^4 c e l l s / w e l l (1 0 0 μ L / w e l l) で 9 6 w e l l p l a t e に播き培養した。培養には 1 0 % F B S を含む M E M を使用した。2 4 時間培養後、1 % B S A を含む M E M で希釈した S e V 1 8 + / Δ F - G F P , S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P 溶液を 5 μ L / w e l l で添加し感染させ、6 時間後ウィルス液を含む培地を除き、F B S を含まない M E M 培地に置き換えた。感染 3 日後に培養上清をサンプリングし、C y t o t o x i c i t y D e t e c t i o n K i t (R o c h e , B a s e l , S w i t z e r l a n d) を利用して K i t に記載の方法に従って細胞傷害性の定量を行った。温度感受性変異を導入することで (S e V 1 8 + / M t s H N t s ・ Δ F - G F P において) 、ある程度の細胞傷害性の減弱があり、P / L 変異を導入することで (S e V 1 8 + / P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + / P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P において) 同様に細胞傷害性の減弱が観察されているが、この両者を組み合わせることで (S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P において) 相加的に作用し顕著な細胞傷害性の減弱が達成された (図 2 8) 。

[実施例 1 8] 温度感受性変異及び P / L 変異の両者を有する F 欠失型 S e V の搭載遺伝子発現量定量

S e V 1 8 + / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P についても、+ 1 8 位に S E A P 遺伝子を挿入したものを作製し、感染細胞からの S E A P 発現量を経時的に測定した。

実験方法の詳細は実施例 5 及び実施例 1 3 に記載している。簡単に記すと、S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P , S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P 及び S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F P を L L C - M K 2 細胞に M O I 1 或いは M O I 3 で感染後、経時的に (2 4 時間毎に) 培養上清を回収し、上清中の S E A P 活性を R e p o r t e r A s s a y K i t - S E A P (T O Y O B O , O s a k a , J a p a n) を利用して K i t に記載の方法に従って測定した。感染初期において発現量の低下が僅かに観察されるものの、S E A P 活性値は全てのベクター間でほとんど同じだった (図 2 9) 。則ち、温度感受性変異及び P / L 変異の両者を導入したベクターでも発現量の低下はほとんどないと判断された。

また、S E A P 遺伝子を搭載した各ベクターについても、細胞傷害性の指標として感染細胞培養上清中の L D H 量を定量した。S E A P 遺伝子の搭載のないベクターの場合と同様に、温度感受性変異及び P / L 変異の両者を導入したことによる、細胞傷害性の顕著な減弱が観察された (図 3 0) 。

[実施例 1 9] E G F P 遺伝子を有する M 欠失型 S e V ゲノム c D N A の構築 構築には

M遺伝子を欠失したM欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+ / ΔM : WO00 / 09700) を利用した。構築のスキームを図31に表した。pSeV18+ / ΔMのM欠失部位を含むBstEII断片(2098bp)を、予めSalI/XhoIで消化後ライゲーションしてEcoRV認識部位を欠失したpSE280 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) のBstEIIサイトにサブクローニングした(pSE-BstEIIfrgの構築)。GFP遺伝子を有するpEGFP (TOYOBO, Osaka, Japan) をAcc65I及びEcoRIで消化しDNA bluntting Kit (Takara, Kyoto, Japan) での5'末端のfill inにより末端の平滑化を行い、EcoRVで消化後BAP (TOYOBO, Osaka, Japan) 処理を行ったpSE-BstEIIfrgにサブクローニングした。このEGFP遺伝子を含むBstEIIフラグメントをもとのpSeV18+ / ΔMに戻し、M欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したM欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18+ / ΔM-GFP) を構築した。

10

20

30

40

[実施例20] M及びF欠失型SeVゲノムcDNAの構築

下記記載の構築のスキームを図32に表した。F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+ / ΔF-GFP : Li, H. - O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000), WO00 / 70070) のNaeI断片(4922bp)をpBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) のEcoRVサイトにサブクローニングして構築したpBlueNaeIfrg-ΔFGFPを用いてM遺伝子の欠失を行った。M遺伝子直後のApaLIサイトを利用してM遺伝子を切り出すようにデザインした。即ち、切り出すfragmentが6nとなるようにP遺伝子直後にApaLI認識配列を導入した。変異導入はQuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を利用してKitに記載の方法に従って行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は5'-agagtcactgacccaactagatcgtgcacgaggcatccataccatcctca-3' / 配列番号: 27, 5'-tgaggatggtaggatgccctcgtgcacgatctagttgggtcagtgactctt-3' / 配列番号: 28) である。変異導入後、ApaLIで部分消化し(37, 5分)、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Bothell, WA) で回収した後そのままライゲーションを行った。再度、QIAquick PCR Purification KitでDNAを回収し、BsmI及びStuIで消化後DH5αへ形質転換してM遺伝子(及びF遺伝子)を欠失したDNA (pBlueNaeIfrg-ΔMΔFGFP) を調製した。

M(及びF遺伝子)を欠失したpBlueNaeIfrg-ΔMΔFGFPをSalI及びApaLIで消化を行い、M欠失部位を含むフラグメント(1480bp)を回収した。一方でpSeV18+ / ΔF-GFPをApaLI/NheIで消化してHN遺伝子を含む断片(6287bp)を回収し、この2種の断片をLitmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) のSalI/NheIサイトにサブクローニングした(LitmusSalI/NheIfrg-ΔMΔFGFPの構築)。LitmusSalI/NheIfrg-ΔMΔFGFPをSalI/NheIで消化して回収したフラグメント(7767bp)と、またpSeV18+ / ΔF-GFPをSalI/NheIで消化して回収したM及びHN等遺伝子を含まないフラグメント(8294bp)をライゲーションして、M及びF遺伝子を欠失しその欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したM及びF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+ / ΔMΔF-GFP) を構築した。構築したM欠失型(及びM及びF欠失型)ウィルスの構造を図33に表した。

[実施例21] SeV-F及びM蛋白を発現するヘルパー細胞の作製

M蛋白(及びF蛋白)を発現するヘルパー細胞作製の為にCre/loxP発現誘導システムを利用した。当該システムはCre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導

50

発現するように設計されたプラスミド pC A L N d L w (A r a i , T . e t a l . , J . V i r o l . 7 2 : 1 1 1 5 - 1 1 2 1 (1 9 8 8)) を利用したものであり、F 蛋白のヘルパー細胞 (L L C - M K 2 / F 7 細胞) 作製の時にも同システムを利用している (L i , H . - O . e t a l . , J . V i r o l o g y 7 4 , 6 5 6 4 - 6 5 6 9 (2 0 0 0) , W O 0 0 / 7 0 0 7 0) 。

1 M 発現プラスミドの構築

F 及び M 蛋白を同時発現誘導するヘルパー細胞の作出の為には、既に作製している上記 L L C - M K 2 / F 7 細胞を利用し、この細胞に同システムでの M 遺伝子導入を行うこととした。但し、F 遺伝子導入時に使用した p C A L N d L w / F は n e o m y c i n 耐性遺伝子を有している為、同細胞を利用する為には別の耐性遺伝子の導入が必須であり、まず図 3 4 に記載のスキームで M 遺伝子搭載プラスミド (p C A L N d L w / M : p C A L N d L w の S w a I サイトに M 遺伝子導入) の n e o m y c i n 耐性遺伝子を h y g r o m y c i n 耐性遺伝子に置き換えた。即ち、p C A L N d L w / M を H i n c I I 及び E c o T 2 2 I で消化し M 遺伝子を含む断片 (4 7 3 7 b p) をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、Q I A E X I I G e l E x t r a c t i o n S y s t e m で回収した。同時に、同 p C A L N d L w / M を X h o I で切断、n e o m y c i n 耐性遺伝子を含まない断片 (5 9 4 1 b p) を回収後、更に H i n c I I で切断し 1 7 7 9 b p の断片を回収した。H y g r o m y c i n 耐性遺伝子は p c D N A 3 . 1 h y g r o (+) (I n v i t r o g e n , G r o n i n g e n , N e t h e r l a n d s) をテンプレートに h y g r o - 5 ' (5 ' - t c t c g a g t c g c t c g g t a c g a t g a a a a g c c t g a a c t c a c c g c g a c g t c t g t c g a g - 3 ' / 配列番号 : 2 9) 及び h y g r o - 3 ' (5 ' - a a t g c a t g a t c a g t a a a t t a c a a t g a a c a t c g a a c c c c a g a g t c c c g c c t a t t c c t t t t g c c c t c g g a c g a g t g c t g g g g c g t c - 3 ' / 配列番号 : 3 0) の 2 種のプライマーを用いて P C R を行い、Q I A q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t で回収した後 X h o I 及び E c o T 2 2 I で消化して調製した。これら 3 種の断片をライゲーションし p C A L N d L w - h y g r o M を作製した。

2 S e V - M (及び F) 蛋白を誘導発現するヘルパー細胞のクローニング

トランスフェクションには S u p e r f e c t T r a n s f e c t i o n R e a g e n t を用いプロトコールに記載の方法で行った。即ち以下の方法をとった。L L C - M K 2 / F 7 細胞を 5×10^5 c e l l s / d i s h で 6 0 m m シャーレに播き、1 0 % F B S を含む D - M E M で 2 4 時間培養した。p C A L N d L w - h y g r o M の 5 μ g を F B S 及び抗生物質を含まない D - M E M に希釈し (総量で 1 5 0 μ L) 、攪拌後 S u p e r f e c t T r a n s f e c t i o n R e a g e n t 3 0 μ L を添加、再度攪拌し室温で 1 0 分間放置した。放置後、1 0 % F B S を含む D - M E M を 1 m L 添加し攪拌後、P B S で 1 回洗浄した L L C - M K 2 / F 7 細胞へこのトランスフェクション混合液を添加した。3 7 $^{\circ}$ C , 5 % C O ₂ インキュベーターで 3 時間培養後、トランスフェクション混合液を除去し、P B S で 3 回洗浄、1 0 % F B S を含む D - M E M を 5 m L 添加し 2 4 時間培養した。培養後、トリプシンで細胞を剥がし、9 6 w e l l プレートに約 5 c e l l s / w e l l の割り合いで希釈し、1 5 0 μ g / m L の h y g r o m y c i n (G i b c o - B R L , R o c k v i l l e , M D) を含む 1 0 % F B S 入りの D - M E M で約 2 週間培養した。単一の細胞から広がったクローンを 6 w e l l プレートまで拡大培養した。このようにして調製した合計 1 3 0 クローンについて以下解析を行った。

3 S e V - M (及び F) 蛋白を誘導発現するヘルパー細胞クローンの解析

得られた 1 3 0 種のクローンについて、M 蛋白の発現量を W e s t e r n - b l o t t i n g で半定量的に解析した。各クローンを 6 w e l l プレートに播き、ほぼコンフルエントの状態、5 % F B S を含む M E M で希釈した C r e D N A リコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルス (A x C A N C r e) を S a i t o らの方法 (S a i t o , I . e t a l . , N u c l . A c i d . R e s . 2 3 , 3 8 1 6 - 3 8 2 1 (1 9 9 5) , A r a i , T . e t a l . , J . V i r o l . 7 2 , 1 1 1 5 - 1 1 2 1 (1 9 9

10

20

30

40

50

8) で $m.o.i. 5$ で感染させた。32 で2日間培養後、培養上清を除去しPBSで1回洗浄し、セルスクレーパーで細胞を剥がして細胞を回収した。1 laneあたりこの1/10量をアプライしてSDS-PAGEを行った後、抗M抗体を利用して実施例3及び4に記載の方法でWestern-blottingを行った。130クローンの中で比較的M蛋白の発現量の多かったものに関して、抗F抗体(f236: Segawa, H. et al., J. Biochem. 123, 1064-1072 (1998))を利用したWestern-blottingの結果と併せて図35に記載した。

[実施例22] M欠失型SeVのウィルス再構成

M欠失型SeV (SeV18+/ΔM-GFP)の再構成は、実施例21記載のクローンの評価を絡めて実施した。即ち、SeV18+/ΔM-GFPのP0 lysateを各クローンに添加し、GFP蛋白の広がり観測されるか(M蛋白のトランス供給が達成されるか)否かについて検証した。P0 lysateの調製は実施例2に記載の方法に倣い以下のように行った。LLC-MK2細胞を 5×10^6 cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、PLWUV-VacT7を室温で1時間感染させた($m.o.i. 2$)。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミドpSeV18+/ΔM-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/F-HN及びpGEM/Mをそれぞれ12 μg, 4 μg, 2 μg, 4 μg, 4 μg及び4 μg/dishの量比でOpti-MEMに懸濁し、1 μg DNA/5 μL相当のSuperFect transfection reagentを入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3 mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40 μg/mLのAraC及び7.5 μg/mLのTrypsinを含むMEMで培養した。24時間培養後、 8.5×10^6 cells/dishあたりにLLC-MK2/F7/Aを重ねし、40 μg/mLのAraC及び7.5 μg/mLのTrypsinを含むMEMで更に2日間37 で培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを2 mL/dishあたりのOpti-MEMに懸濁、凍結融解を3回繰り返してP0 lysateを調製した。一方で10種のクローンを24 wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの時にAxCANCreを $m.o.i. 5$ で感染し、感染後32 で2日間培養した細胞を準備した。この細胞にSeV18+/ΔM-GFPのP0 lysateを各200 μL/wellでトランスフェクションし、40 μg/mLのAraC及び7.5 μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32 で培養した。#18及び#62のクローンでSeV18+/ΔM-GFPによるGFP蛋白の広がり観測された(図36)。特に、#62の方で広がり早く、以下の実験にはこの#62を使用した。当該細胞についてAxCANCre誘導前のものをLLC-MK2/F7/M62と記載し、誘導後のものでF及びM蛋白を持続発現しているものをLLC-MK2/F7/M62/Aと記載することにする。LLC-MK2/F7/M62/Aを利用してSeV18+/ΔM-GFPの調製を継続し、P2の感染6日後に 9.5×10^7 , P4の感染5日後に 3.7×10^7 GFP-CIUのウィルスを調製した。

本実験においても、実施例3に示した「P1以降を32 で培養する」という改善点があったからこそSeV18+/ΔM-GFPのウィルス回収が可能になったと考えられる。SeV18+/ΔM-GFPにおいてM蛋白を発現細胞(LLC-MK2/F7/M62/A)からトランスに供給していることが原因と考えられるが、広がりが非常に遅くP1の感染7日後でようやく広がりが見られている(図36)。即ち、当該ウィルスの再構成実験においても、「P1以降を32 で培養する」ことが転写複製効率の良くない或いは感染性ビリオン形成効率の良くないSeVを再構成する場合に非常に有効であることを支持している。

[実施例23] M欠失型ウィルスの生産性

このウィルスの生産性の面での検討も行った。LLC-MK2/F7/M62/Aを6 well plateに播き37 で培養した。ほぼコンフルエントの状態に32 に移行させ、1日後にSeV18+/ΔM-GFPを $m.o.i. 0.5$ で感染し、経時的に培

養上清を回収し新たな培地を添加した。回収した上清についてC I UとH A Uを求めた。感染4～6日後で最も多くのウィルスが回収された(図37)。H A Uは感染6日後以降も維持されているが、この時点では細胞障害性が強く出ており、ウィルスパーティクル由来では無く、細胞断片に結合している或いは遊離しているH A蛋白による活性が出ているものと予想された。即ち、ウィルスを回収するには感染5日後までの培養上清を回収すべきであると考えられる。

[実施例24] M欠失型S e Vのウィルスの構造確認

S e V 1 8 + / Δ M - G F Pのウィルス遺伝子をR T - P C Rで、ウィルス蛋白をW e s t e r n - b l o t t i n gで確認した。R T - P C RはP 2の感染6日後のウィルスを利用した。ウィルス溶液からのR N Aの回収はQ I A a m p V i r a l R N A M i n i K i t (Q I A G E N , B o t h e l l , W A)を利用し、またc D N A調製はT h e r m o s c r i p t R T - P C R S y s t e m (G i b c o - B R L , R o c k v i l l e , M D)を利用して、両システムともに添付のプロトコールに記載の方法で行った。c D N A調製時のプライマーにはキットに添付のr a n d o m h e x a m e rを使用した。また、R N Aからの産物であることの確認として、r e v e r s e t r a n s c r i p t a s eの有無で同反応を行った。調製したc D N AをテンプレートとしてP 遺伝子上のF 3 5 9 3 (5 ' - c c a a t c t a c c a t c a g c a t c a g c - 3 ' / 配列番号: 3 1)とF 遺伝子上のR 4 9 9 3 (5 ' - t t c c c t t c a t c g a c t a t g a c c - 3 ' / 配列番号: 3 2)の組み合わせと、同じくP 遺伝子上のF 3 2 0 8 (5 ' - a g a g a a c a a g a c t a a g g c t a c c - 3 ' / 配列番号: 3 3)とR 4 9 9 3の組み合わせの2種でP C Rを行った。S e V 1 8 + / Δ M - G F Pの遺伝子構造から予想されたように、前者及び後者からそれぞれ1 0 7 3 b p及び1 4 5 8 b pの増幅が観察された(図38)。r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e無し(R T -)の場合は当該遺伝子の増幅はなく、またG F P遺伝子ではなくM遺伝子が挿入している場合(p S e V 1 8 + G F P)はそれぞれ1 4 0 0 b p及び1 7 8 5 b pなので明らかに大きさが異なり、本ウィルスはM欠失型の遺伝子構造であることを支持した。

W e s t e r n - b l o t t i n gにより蛋白側からの確認を行った。S e V 1 8 + / Δ M - G F P, S e V 1 8 + / Δ F - G F P及びS e V 1 8 + G F Pをm . o . i . 3でL L C - M K 2に感染し、感染3日後に培養上清と細胞を回収し、培養上清は4 8 , 0 0 0 gで4 5分間遠心しウィルス蛋白を回収した。S D S - P A G E後、W e s t e r n - B l o t t i n gを行い、抗M抗体、抗F抗体及び主にNP蛋白を認識するDN - 1抗体(ラビットポリクローナル)で検出した。実施例3及び実施例4に記載の方法で行った。S e V 1 8 + / Δ M - G F P感染細胞ではM蛋白が観測されずF或いはNPは観測されたことから、蛋白側からもS e V 1 8 + / Δ M - G F Pの構造であることが確認された(図39)。この時、S e V 1 8 + / Δ F - G F P感染細胞ではF蛋白が観測されず、S e V 1 8 + G F Pでは調べた全てのウィルス蛋白質が観測された。また、培養上清のウィルス蛋白に関しては、S e V 1 8 + / Δ M - G F PにおいてはNPの観測量が非常に少なく、二次放出粒子が無い或いは非常に少ないと予想された。

[実施例25] M欠失型S e Vの2次放出粒子の有無に関する定量的解析

実施例24記載のようにS e V 1 8 + / Δ M - G F Pをm . o . i . 3でL L C - M K 2に感染し、感染3日後に培養上清を回収し、0 . 4 5 μ m径のフィルターを通した後4 8 , 0 0 0 gで4 5分間遠心し、回収したウィルス蛋白を用いてW e s t e r n - b l o t t i n gを行い、半定量的に培養上清中のウィルス蛋白を検出した。対照としてS e V 1 8 + / Δ F - G F Pを同様に感染して調製したサンプルを使用した。それぞれの希釈系列を作製しW e s t e r n - b l o t t i n gを行いDN - 1抗体(主にNP蛋白認識)で検出した。S e V 1 8 + / Δ M - G F P感染細胞上清中のウィルス蛋白はS e V 1 8 + / Δ F - G F P感染細胞のものの約1 / 1 0 0であると判断された(図40)。また、同サンプルのH A活性はS e V 1 8 + / Δ F - G F P (6 4 H A U)なのに対しS e V 1 8 + / Δ M - G F P (< 2 H A U)であった。

同実験を再度経時的に行った。即ち、S e V 1 8 + / Δ M - G F Pをm . o . i . 3でL

LC-MK2に感染し、経時的に（一日毎に）培養上清を回収し、HA活性を測定した（図41）。感染4日後以降に少ないながらもHA活性が観測された。但し、同サンプルについて細胞障害性の指標となるLDH活性を測定した所、SeV18+/ΔM-GFP感染細胞では感染4日後以降明らかな細胞障害性が惹起しており（図42）、HA活性の上昇はウイルス様パーティクルに起因するのでは無く、細胞断片に結合している或いは遊離しているHA蛋白による活性が出ている可能性が高いと予想された。更に、感染5日後の培養上清について、カチオニックリポソームであるDospers Liposomal Transfection Reagent（Roche, Basel, Switzerland）を用いて検証した。即ち、培養上清100μLとDospers 12.5μLを混合し室温で10分放置後、6wellプレートにコンフルエントに培養したLLC-MK2細胞にトランスフェクションした。2日後に蛍光顕微鏡下で観察した所、二次放出粒子の存在するSeV18+/ΔF-GFP感染細胞の培養上清では、多くのGFP陽性細胞が観察されるのに対し、SeV18+/ΔM-GFP感染細胞の培養上清ではGFP陽性細胞は僅かには存在したが殆ど観察されなかった（図43）。以上の結果より、M蛋白を欠失することで、二次放出粒子はほとんど抑制可能であると結論できた。

10

20

30

40

〔実施例26〕F及びM両欠失型SeVのウイルス再構成

F及びM欠失型SeV（SeV18+/ΔMΔF-GFP）の再構成は、実施例22記載のSeV18+/ΔM-GFPの再構成と同様の方法で行った。即ち、LLC-MK2細胞を 5×10^6 cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、PLWUV-VacT7を室温で1時間感染させた（m.o.i.2）。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミドpSeV18+/ΔMΔF-GFP、pGEM/NP、pGEM/P、pGEM/L、pGEM/F-HN及びpGEM/Mをそれぞれ12μg、4μg、2μg、4μg、4μg及び4μg/dishの量比でOpti-MEMに懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSuperfect transfection reagentを入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで培養した。24時間培養後、 8.5×10^6 cells/dishあたりにLLC-MK2/F7/M62/Aを重層し、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで更に2日間37℃で培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dishあたりのOpti-MEMに懸濁、凍結融解を3回繰り返してP0 lysateを調製した。一方でLLC-MK2/F7/M62/Aを24wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの時に32℃に移し1日間培養した細胞を準備した。この細胞にSeV18+/ΔMΔF-GFPのP0 lysateを各200μL/wellでトランスフェクションし、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養した。P0では良く広がったGFP陽性細胞が観察された。また、P1でも非常に弱いながら広がりが観察された（図44）。しかし、検出可能な力価を含むウイルス溶液としては回収できなかった。LLC-MK2/F7/M62/AにSeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/ΔM-GFPを感染させた場合、両ウイルスの場合でGFP陽性細胞の順調な広がりが観察された（図45）。F/M両発現細胞（LLC-MK2/F7/M62/A）を用い、SeV18+/ΔF-GFPまたはSeV18+/ΔM-GFPをm.o.i.0.5で感染後、3日後及び6日後にサンプリングし、1/6.5容の7.5% BSAを混合し（終濃度1%）、保存したサンプルについてタイターを測定することによってベクターの生産性を調べたところ、SeV18+/ΔF-GFPで 10^8 GFP-CIU/mL以上、SeV18+/ΔM-GFPで 10^7 GFP-CIU/mL以上のウイルス溶液として回収可能であった（表1）。即ち、M及びF蛋白質は、両方ともトランス供給が成功していることが示された。

表1

	感染3日後	感染6日後	
SeV18+/ΔF-GFP	1.0×10^8	1.7×10^8	
SeV18+/ΔM-GFP	1.0×10^7	3.6×10^7	GFP-CIU/mL

10

[実施例 27] SeV - F 及び M 蛋白を発現するヘルパー細胞の改良

LLC - MK2 / F7 / M62 / A の M / F 発現ヘルパー細胞を利用した場合、M / F 両欠失型 SeV (SeV18+ / ΔMΔF - GFP) のウィルス粒子は回収出来なかった。しかし、F 欠失型 SeV (SeV18+ / ΔF - GFP) 及び M 欠失型 SeV (SeV18+ / ΔM - GFP) の両者の再構成・生産が可能であったことから、同ヘルパー細胞に利用した Cre / loxP 発現誘導システムの基本的な能力として、M 及び F 両蛋白質のトランス供給は十分可能であると考えられた。則ち、Cre / loxP 発現誘導システムの利用は効果的であり、M / F 両欠失型 SeV の再構成を可能にするには、同システムを用いて発現する M 及び F 蛋白量を更に増やす必要があると判断した。

20

1 M 及び F 発現プラスミドの構築

M 及び F 蛋白を同時に発現誘導するヘルパー細胞の改良の為に、既に作製している上記 LLC - MK2 / F7 / M62 細胞を利用し、この細胞に同システムでの M 及び F 遺伝子の再導入を行うこととした。但し、F 遺伝子導入時に使用した pCALNDLw / F は neomycin 耐性遺伝子を有し、M 遺伝子導入時に使用した pCALNDLw / hygromycin は hygromycin 耐性遺伝子を有している為、同細胞を利用する為には別の耐性遺伝子の導入が必須であり、まず図 46 に記載のスキームで F 遺伝子搭載プラスミド (pCALNDLw / F : pCALNDLw の SwaI サイトに M 遺伝子導入) の neomycin 耐性遺伝子を zeocin 耐性遺伝子に置き換えた。即ち、pCALNDLw / F を SpeI 及び EcoT22I で消化し F 遺伝子を含む断片 (5477 bp) をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System で回収した。同時に、同 pCALNDLw / F を XhoI で切断、neomycin 耐性遺伝子を含まない断片 (6663 bp) を回収後、更に SpeI で切断し 1761 bp の断片を回収した。Zeocin 耐性遺伝子は pCDNA3.1Zeo (+) (Invitrogen , Groningen , Netherlands) をテンプレートに zeo - 5' (5' - TCTCGAGGTCGCTCGGTACGatggccaagttagccagtgccggttccgggtgctcac - 3' / 配列番号 : 34) 及び zeo - 3' (5' - AATGCATGATCAGTAAATTAACAATGAACATCGAACCCAGAGTCCCGCtcagttcctgctcctc - 3' / 配列番号 : 35) の 2 種のプライマーを用いて PCR を行い、QIAquick PCR Purification Kit で回収した後 XhoI 及び EcoT22I で消化して調製した。これら 3 種の断片をライゲーションし pCALNDLw - zeoF を作製した。次に XhoI fragment で薬剤耐性遺伝子を含む断片を組み換えることで pCALNDLw - zeoM 遺伝子を構築した。

30

40

2 ヘルパー細胞のクローニング

トランスフェクションには LipofectAMINE PLUS reagent (Invitrogen , Groningen , Netherlands) を使いプロトコルに記載の方法で行った。即ち以下の方法をとった。LLC - MK2 / F7 / M62 細胞

50

を 5×10^5 cells / dish で 60 mm シャーレに播き、10% FBS を含む D-MEM で 24 時間培養した。pCALNDLw-zeoF 及び pCALNDLw-zeoM のそれぞれ $1 \mu\text{g}$ (計 $2 \mu\text{g}$) を FBS 及び抗生物質を含まない D-MEM に希釈し (総量で $242 \mu\text{L}$)、攪拌後 LipofectAMINE PLUS reagent $8 \mu\text{L}$ を添加、再度攪拌し室温で 15 分間放置した。放置後、予め LipofectAMINE reagent $12 \mu\text{L}$ を FBS 及び抗生物質を含まない D-MEM に希釈したものを (総量で $250 \mu\text{L}$) 添加し室温で 15 分間放置した。放置後、FBS 及び抗生物質を含まない D-MEM を 2 mL 添加し攪拌後、PBS で 1 回洗浄した LLC-MK2 / F7 / M62 細胞へこのトランスフェクション混合液を添加した。37, 5% CO_2 インキュベーターで 3 時間培養後、トランスフェクション混合液を除去することなく、20% FBS を含む D-MEM を 2.5 mL 添加し 24 時間培養した。培養後、トリプシンで細胞を剥がし、96 well プレートに約 5 cells / well 或いは 25 cells / well の割り合いで希釈し、 $500 \mu\text{g} / \text{mL}$ の zeocin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含む 10% FBS 入りの D-MEM で約 2 週間培養した。単一の細胞から広がったクローンを 6 well プレートまで拡大培養した。このようにして調整した合計 98 クローンについて解析を行った。

得られた 98 クローンについて、M 蛋白及び F 蛋白の発現量を Western-blotting で半定量的に解析した。各クローンを 12 well プレートに播き、ほぼコンフルエントの状態、5% FBS を含む MEM で希釈した Cre DNA リコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルス (AxCANCre) を Saito らの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) で MOI 5 で感染させた。32 で 2 日間培養後、培養上清を除去し PBS で 1 回洗浄し、セルスクレーパーで細胞を剥がして細胞を回収した。1 lane あたりこの 1 / 5 量をアプライして SDS-PAGE を行った後、抗 M 抗体及び抗 F 抗体 (f236: Segawa, H. et al., J. Biochem. 123, 1064-1072 (1998)) を利用して Western-blotting を行った。評価した約 98 クローンの中の 9 クローンについての結果を図 47 に示した。

[実施例 28] M / F 両欠失型 SeV のウイルス再構成 (2)

M / F 両欠失型 SeV (SeV18+ / Δ M Δ F - GFP) の再構成は、実施例 27 記載のクローンの評価を絡めて実施した。則ち、M / F 両欠失型 SeV 再構成の P0 lysate (トランスフェクションした細胞のライセート) を利用して、再構成が可能か否かの評価を行った。P0 lysate の調製は実施例 2 に記載の方法に倣い以下のように行った。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells / dish で 100 mm のシャーレに播き、24 時間培養後、PLWUV-VacT7 を室温で 1 時間感染させた (MOI 2)。細胞を血清を含まない MEM で洗浄した後、プラスミド pSeV18+ / Δ M Δ F - GFP, pGEM / NP, pGEM / P, pGEM / L, pGEM / F - HN 及び pGEM / M をそれぞれ $12 \mu\text{g}$, $4 \mu\text{g}$, $2 \mu\text{g}$, $4 \mu\text{g}$, $4 \mu\text{g}$ 及び $4 \mu\text{g} / \text{dish}$ の量比で Opti-MEM に懸濁し、 $1 \mu\text{g}$ DNA / $5 \mu\text{L}$ 相当の SuperFect transfection reagent を入れて混合し、室温で 15 分間放置後、最終的に 3% FBS を含む Opti-MEM 3 mL に入れ、細胞に添加して培養した。5 時間培養後血清を含まない MEM で 2 回洗浄し、 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ の AraC 及び $7.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の Trypsin を含む MEM で培養した。24 時間培養後、 8.5×10^6 cells / dish あたりに LLC-MK2 / F7 / A を重層し、 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ の AraC 及び $7.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の Trypsin を含む MEM で更に 2 日間 37 で培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを $2 \text{ mL} / \text{dish}$ あたりの Opti-MEM に懸濁、凍結融解を 3 回繰り返して P0 lysate を調製した。一方で新たにクローニングした細胞を 24 well プレートに播き、ほぼコンフルエントの時に AxCANCre を MOI 5 で感染し、感染後 32 で 2 日間培養した細胞を準備した。この細胞に SeV18+ / Δ M Δ F - GFP の P0 lysate を各 $200 \mu\text{L} / \text{well}$ でトラン

スフェクションし、 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ のAraC及び $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32で培養した。評価した中の20クローンについて、GFP蛋白の広がり観察され、M/F両欠失型SeVの回収に成功した。その中の数クローンでの再構成の様子を示したが(図48)、特に、クローン#33(LLC-MK2/F7/M62/#33)ではp3(継代3回目)の段階で 10^8 GFP-CIU/mL以上の感染ウイルス粒子が回収され、生産細胞として非常に有望な細胞であると認識される。LLC-MK2/F7/M62の細胞にM及びF両遺伝子を導入すると、高頻度でM/F両欠失型SeVの回収が可能な細胞が調整できたことになる。解釈として、LLC-MK2/F7/M62細胞の時点で、発現量としては非常に良い状態にあり、(M及びF両遺伝子を導入し)M/F両蛋白の発現を僅かに底上げすることによって、M/F両欠失型SeVの回収が可能になったと判断された。 10

[実施例29] M/F両欠失型SeVのウイルス生産性

このウイルスの生産性の面での検討も行った。LLC-MK2/F7/M62/#33を6well plateに播き37で培養した。ほぼコンフルエントの状態にACANCreをMOI 5で感染し(LLC-MK2/F7/M62/#33/A)、感染後32で2日間培養した。その後、SeV18+/ΔMΔF-GFPをMOI 0.5で感染し、経時的に培養上清を回収し新たな培地を添加した。回収した上清についてCIUとHAUを求めた。感染2日目以降、継続して 10^8 CIU/mL以上のウイルスが回収された(図49)。また、CIUとHAUの変化が平行であり、生産している多くのparticleは感染性を有しており、効率的に生産されていると考えられた。 20

[実施例30] M/F両欠失型SeVのウイルス構造確認

SeV18+/ΔMΔF-GFPのウイルス遺伝子をRT-PCRで、ウイルス蛋白をWestern-blottingで確認した。RT-PCRはP2の感染5日目(P2d5)のウイルスを利用した。ウイルス溶液からのRNAの回収はQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, Bothell, WA)を利用し、またcDNA調整からRT-PCRはSuperScript One-Step RT-PCR System(Gibco-BRL, Rockville, MD)を利用して、両システムともに添付のプロトコールに記載の方法で行った。cDNA調製及びRT-PCR用プライマーとして、P遺伝子上のF3208(5'-agagaaacaaagactaaggctacc-3'/配列番号:33)とGFP遺伝子上のGFP-RV(5'-cagatgaacttcagggtcagccttg-3'/配列番号:36)、及び同F3208とHN遺伝子上のR6823(5'-tggggtgaatgagagaatcagc-3'/配列番号:37)の組み合わせの2種でPCRを行った。SeV18+/ΔMΔF-GFPの遺伝子構造から予想されたように、前者及び後者からそれぞれ644bp及び1495bpの増幅が観察された(図50)。また、SeV18+/ΔM-GFP及びSeV18+/ΔF-GFPから調整したものでは、それぞれ予想される大きさの遺伝子の増幅が観察され、明らかにSeV18+/ΔMΔF-GFPからのものとは大きさが異なった。以上のことから、本ウイルスはM/F両欠失型の遺伝子構造であることを支持した。 30

Western-blottingにより蛋白側からの確認を行った。SeV18+/ΔMΔF-GFP, SeV18+/ΔM-GFP, SeV18+/ΔF-GFP及びSeV18+GFPをMOI 3でLLC-MK2に感染し、感染2日後に細胞を回収した。SDS-PAGE後、Western-blottingを行い、抗M抗体、抗F抗体及び主にNP蛋白を認識するDN-1抗体(ラビットポリクローナル)で検出した。実施例3及び実施例4に記載の方法で行った。SeV18+/ΔMΔF-GFP感染細胞ではM蛋白及びF蛋白ともに観測されずNPは観測されたことから、蛋白側からもSeV18+/ΔMΔF-GFPの構造であることが確認された(図51図)。この時、SeV18+/ΔF-GFP感染細胞ではF蛋白が観測されず、SeV18+/ΔM-GFP感染細胞ではM蛋白が観測されず、SeV18+GFPでは調べた全てのウイルス蛋白が観測された。 40

[実施例 3 1] M / F 両欠失型 S e V の 2 次放出粒子の有無に関する定量的解析

同実験を再度経時的に行った。即ち、S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P を M O I 3 で L L C - M K 2 に感染し、経時的に（一日毎に）培養上清を回収し、H A 活性を測定した（図 5 2）。感染 4 日後以降に少ないながらも H A 活性が観測された。但し、この H A 活性の上昇は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P の場合と同じく、ウィルス様パーティクルに起因するのでは無く細胞断片に結合している或いは遊離している H A 蛋白による活性が出ている可能性が高いと予想された。更に、感染 5 日後の培養上清について、カチオニックリポソームである D o s p e r L i p o s o m a l T r a n s f e c t i o n R e a g e n t (R o c h e , B a s e l , S w i t z e r l a n d) を用いて検証した。即ち、培養上清 1 0 0 μ L と D o s p e r 1 2 . 5 μ L を混合し室温で 1 0 分放置後、6 w e 1 1 プレートにコンフルエントに培養した L L C - M K 2 細胞にトランスフェクションした。2 日後に蛍光顕微鏡下で観察した所、二次放出粒子の存在する S e V 1 8 + / Δ F - G F P 感染細胞の培養上清からのものでは、多くの G F P 陽性細胞が観察されるのに対し、S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G P P 感染細胞の培養上清からのものでは G F P 陽性細胞は殆ど観察されなかった（図 5 3）。以上の結果より、S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P は、感染細胞からの二次放出粒子をほとんど消失していると結論できた。

[実施例 3 2] M / F 両欠失型 S e V 及び M 欠失型 S e V のウィルス感染能評価 (i n v i t r o)

非分裂細胞への導入及び発現効率については遺伝子導入ベクターの性能を評価する上で重要な項目であり、評価は必須である。そこで、胎生 1 7 日ラット脳より大脳皮質神経細胞を調整し初代培養を行い、非分裂細胞における感染能を調べた。

ラット大脳皮質初代培養神経細胞の調整は以下の方法で行った。妊娠 S D ラットを胎齢 1 7 日において、エーテル麻酔下断頭を行った。イソジン及び 8 0 % エタノールにより腹部を消毒後、子宮を 1 0 c m シャーレに取り出し、子宮より胎児を取り出す。次に、胎児の頭部の頭皮及び頭蓋骨を I N O X 5 ピンセットで裂き、脳を採取、3 5 m m シャーレに集めた。小脳及び脳幹の一部を眼科用ハサミで除き、大脳を半球に分け、脳幹の残りを除き、嗅球をピンセットでつまんで除き、髄膜をピンセットで除いた。最後に、間脳及び海馬を眼科用ハサミで取り除いた後に、皮質をシャーレに集め、手術用メス刃にて小片にし、1 5 m m 遠心管に集めた。0 . 3 m g p a p a i n / m L にて 3 7 で 1 0 分間処理、5 m L の血清入り培地で処理、洗浄し、細胞を分散した。7 0 μ m s t r a i n e r を通し、遠心により細胞を集めた後、緩やかにピペティングし細胞を分散し、細胞の計数を行った。p o l y - L - l y s i n e (P L L) c o a t e d 2 4 w e l l p l a t e に 2×10^5 或いは 4×10^5 c e l l s / w e l l で細胞を播種し、2 日後に M / F 両欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P) 及び M 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M - G F P) を M O I 3 で感染した。感染 3 6 h r 後に神経細胞特異的のマーカーである M A P 2 で免疫染色を行い、G F P 発現細胞 (S e V 感染細胞) と重合せをして感染細胞の同定を行った。

M A P 2 による免疫染色は以下のように行った。感染細胞を P B S で洗浄後、室温で 1 0 分間 4 % p a r a f o r m a l d e h y d e で細胞を固定し、P B S で洗浄後、2 % の n o r m a l g o a t s e r u m を含む P B S 溶液を用いて室温で 6 0 分間 B l o c k i n g を行った。1 / 2 0 0 に希釈した A n t i - M A P 2 抗体 (S i g m a , S t . L o u i s , M O) を 3 7 で 3 0 分間反応し、P B S で洗浄後、1 / 2 0 0 に希釈した二次抗体 (g o a t a n t i m o u s e I g G A l e x a 5 6 8 : M o l e c u l a r P r o b e s I n c . , E u g e n e , O R) を 3 7 で 3 0 分間反応した。P B S で洗浄後、蛍光顕微鏡 (D M I R B - S L R : L e i c a , W e t z l a r , G e r m a n y) 下、細胞の蛍光を観察した。

M / F 両欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P) 及び M 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M - G F P) の両者において、M A P 2 陽性細胞のほとんどが G F P に陽性であった（図 5 4）。則ち、調整した神経細胞のほとんどの細胞で効率的に S e V が感染しており、M / F 両欠失型 S e V 及び M 欠失型 S e V とともに非分裂細胞への導入及び発現効

10

20

30

40

50

率が良いことが確認された。

【実施例 33】M/F 両欠失型 SeV 及び M 欠失型 SeV のウィルス感染能評価 (in vivo)

in vivo での感染能を評価した。M/F 両欠失型 SeV (SeV 18 + / ΔMΔF - GFP) 及び M 欠失型 SeV (SeV 18 + / ΔM - GFP) 5 μL (1×10^9 p.f.u./ml) をスナネズミの左側能室にステレオ法により脳室内投与した。投与 2 日後に解剖し脳を摘出し、凍結切片を作製した。蛍光顕微鏡下で観察し、GFP の蛍光強度により感染の有無を調査した。M/F 両欠失型 SeV (SeV 18 + / ΔMΔF - GFP) 及び M 欠失型 SeV (SeV 18 + / ΔM - GFP) の両者において、左右側脳室の上衣細胞等において、多くの陽性細胞が観察された (図 55)。則ち、M/F 両欠失型 SeV 及び M 欠失型 SeV とともに in vivo において効率的な遺伝子導入及び発現が可能

10

【実施例 34】M/F 両欠失型 SeV 及び M 欠失型 SeV の細胞傷害性評価

細胞傷害性に関しては、SeV 感染依存的な細胞傷害性が観察できる、CV-1 細胞及び HeLa 細胞を利用して評価した。またコントロールとして、付加型 SeV (天然型: SeV 18 + GFP) (複製能を持つ) 及び F 欠失型 SeV (SeV 18 + / ΔF - GFP) について同時に測定した。実験方法の詳細は実施例 6、実施例 12 及び実施例 17 に記載している。簡単に記すと、CV-1 細胞或いは HeLa 細胞を 2.5×10^4 cells/well (100 μL/well) で 96 well plate に播き培養した。培養には両細胞ともに 10% FBS を含む MEM を使用した。24 時間培養後、1% BSA を含む MEM で希釈した SeV 18 + GFP, SeV 18 + / ΔF - GFP, SeV 18 + / ΔM - GFP 或いは SeV 18 + / ΔMΔF - GFP 溶液を 5 μL/well で添加し感染させ、6 時間後ウィルス液を含む培地を除き、FBS を含まない MEM 培地に置き換えた。感染 3 日後に培養上清をサンプリングし、Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland) を利用して Kit に記載の方法に従って細胞傷害性の定量を行った。付加型 SeV と比較すると、M 或いは F 遺伝子を欠失することで (SeV 18 + / ΔF - GFP 及び SeV 18 + / ΔM - GFP において) 細胞傷害性の減弱があり、この両欠失を組み合わせることで (SeV 18 + / ΔMΔF - GFP において) 相加的に作用しより細胞傷害性が減弱した (図 56)。

20

30

以上のように、本明細書において初めて再構成に成功した「M/F 両欠失型 SeV ベクター」は、非分裂細胞を含む多くの細胞への感染能を有し、2 次放出粒子をほとんど消失し、更に細胞傷害性の減弱した汎用性の高い遺伝子導入ベクターであると考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明により、粒子形成能が低下または消失した (-) 鎖 RNA ウィルスの検査方法、スクリーニング方法、および製造方法が提供された。本発明により製造されるウィルスは、遺伝子導入細胞から 2 次放出 (VLP 放出) による細胞障害や免疫誘導が低減されるため、宿主に対して副作用の少ない遺伝子導入ベクターとして有用である。特に本発明により提供されるベクターは、in vivo および ex vivo における遺伝子治療用ベクターとして様々な適用が期待される。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Methods for testing and producing negative-sense RNA virus
vectors with attenuated capability for particle-formation

10

<130> D3-A0105Y1P

<140>

<141>

20

<150> JP 2001-283451

<151> 2001-09-18

<150> JP 2001-356336

<151> 2001-11-21

30

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

40

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 1

cttteaccct

10

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 2

ttttlcttac tacgg

15

30

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

10

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 4

gaaacaaaca accaatctag agagcgtatc tgacttgac

39

30

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 5

gtcaagtcag atacgctctc tagattgggt gtttgtttc

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

20

<400> 6

attacggtag ggagggctgt tcgagcagga g

31

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

40

<400> 7

ctcctgctcg aacagccctc ctcaccgtaa t

31

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 8

20

ggggcaatca ccataatccaa gatcccaaag acc

33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 9

40

ggctctttggg atcttggata tggtgattgc ccc

33

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 10

catgctctgt ggtgacaacc cggactaggg gttatca

37

20

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 11

tgataacccc tagtcgggt tgaccacca gagcatg

37

40

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

10

<400> 12

cttgtctaga ccaggaaatg aagagtgc aa itggtacaat a

41

<210> 13

<211> 41

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

30

<400> 13

tattgtacca attgcactct tcatttcttg gtctagacaa g

41

<210> 14

40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 14

Met Ala Asp Ile Tyr Arg Phe Pro Lys Phe Ser Tyr Glu

10

1

5

10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

30

<400> 15

Leu Arg Thr Gly Pro Asp Lys Lys Ala Ile Pro His

1

5

10

40

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

10

<400> 16

Asn Val Val Ala Lys Asn Ile Gly Arg Ile Arg Lys Leu

1

5

10

20

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 17

tcgacaccag gtattttaa taattaatcg cgag

34

40

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

10

<400> 18

ctagctcgcg attaattaat tttaaatacct ggtg

34

<210> 19

<211> 39

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

30

<400> 19

gttctatctt cctgactcta tagacctgga cacgcttac

39

<210> 20

40

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 20

gtaagcgtgt ccaggcttat agagtcagga agatagaac

39

10

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 21

ctacctattg agcccccttag ttgacgaaga taaagatagg cta

43

30

<210> 22

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 22

tagcctatct ttatcttcgt caactaagg gctcaatagg tag 43

10

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 23

caagataatc gatcaggtaa agagagtaga gtctctggga g 41

30

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 24

ctcccagaga ctctactctc ttaccctgat cgattatctt g

41

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

20

<400> 25

ctcaaacgca tcaagtcctt ttccctccaa agagaagc

38

<210> 26

<211> 38

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

40

<400> 26

gcttctcttt ggagggaaag agacgtgatg cgtttgag

38

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 27

20

agagtcactg accaactaga tcgtgcacga ggcatacctac catcctca

48

<210> 28

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 28

40

tgaggatggt aggatgcctc gtgcacgac tagttggta gtgactct

48

<210> 29

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 29

tctcgagtcg ctcggtaaga tgaataagcc tgaactcacc ggcagctctg tcgag 55

20

<210> 30

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 30

aatgcatgat cagtaaatta caatgaacat cgaaccccag agtcccgctt attccttgc 60
cctcggacga gtgctggggc gtc 83

40

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

10

<400> 31

ccaatctacc atcagcatca gc

22

<210> 32

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

30

<400> 32

ttcccttcat cgactatgac c

21

<210> 33

40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

10

<400> 33

agagaacaag actaaggcta cc

22

<210> 34

<211> 54

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

30

<400> 34

tctcgagtcg ctcggtagca tggccaagtt gaccagtgcc gtcccggtgc tcac

54

<210> 35

<211> 85

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 35

aatgcatgat cagtaaatta caatgaacat cgaaccccag agtcccgctc agtcctgctc 60
ctcggccacg aagtgcacgc agttg 85

10

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 36

cagaatgaact tcagggtcag cttg 24

30

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 37

tgggtgaatg agagaatcag c

21

10

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Sendai virus

<400> 38

20

Lys Ala Cys Thr Asp Leu Arg Ile Thr Val Arg Arg Thr Val Arg Ala

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

図1は、M遺伝子に温度感受性変異を導入したF欠失型SeVゲノムcDNAの構築スキームを示す図である。

図2は、M遺伝子への温度感受性変異導入による2次放出粒子抑制を目的として構築したウィルス遺伝子及びその変異導入の効果を比較検討する為に構築した或いは使用したウィルス遺伝子の構造を示す図である。 30

図3は、SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNtsΔF-GFPをF蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/A)に感染し、32及び37で6日間培養後のGFP発現を示す顕微鏡像を示す写真である。

図4は、SeV-F蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/A)について、32或いは37でtrypsin及び血清を含まないMEMで培養し経時的にF蛋白の発現量をWestern-blottingで半定量的に観測した結果を示す写真である。

図5は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNtsΔF-GFPをm.o.i.3で感染し32, 37或いは38で培養し3日後のGFP発現を示す顕微鏡像を示す写真である。 40

図6は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNtsΔF-GFPをm.o.i.3で感染し32, 37或いは38で培養し経時的にサンプリング(同時に新しい培地に交換)した培養上清の赤血球凝集活性(HA活性)を示す図である。

図7は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNtsΔF-GFPをm.o.i.3で感染し、37で培養2日後の培養上清及び細胞を回収して、1lane当り6well plate培養1well分の1/10相当量を用いて、抗M抗体を利用したWestern-blottingにより求めた、細胞内とウィルス様パーティクル(VLP)間のM蛋白の存在比率を示 50

す写真である。

図 8 は、L L C - M K 2 細胞に S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 3 で感染し、培養 1 2 , 1 8 , 2 4 , 5 0 , 1 2 0 時間後にサンプリングした培養上清を用いて測定した S E A P 活性を示す図である。

図 9 は、L L C - M K 2 細胞に S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 3 で感染し、培養 2 4 , 5 0 , 1 2 0 時間後にサンプリングした培養上清の H A 活性を示す図である。

図 1 0 は、L L C - M K 2 細胞に S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 3 で感染し、培養 5 日後にサンプリングした培養上清について遠心後ウィルス回収し、1 l a n e 当り 6 w e l l p l a t e 培養 1 w e l l 分の 1 / 1 0 相当量を用いて、抗 M 抗体を利用した W e s t e r n - b l o t t i n g により求めたウィルス様パーティクル量を示す写真である。

図 1 1 は、L L C - M K 2 , B E A S - 2 B 或いは C V - 1 細胞に S e V 1 8 + / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 0 . 0 1 , 0 . 0 3 , 0 . 1 , 0 . 3 , 1 , 3 , 1 0 で感染し、血清を含まない或いは 1 0 % F B S を含む培地で培養し、血清を含まない培地の場合は感染 3 日後に、1 0 % F B S を含む培地の場合は感染 6 日後に、培地中に放出された L D H 量から見積った細胞障害性を示す図である。

図 1 2 は、L L C - M K 2 細胞に S e V 1 8 + G F P , S e V 1 8 + / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 1 で感染し、3 2 , 3 7 或いは 3 8 で培養し、培養 2 日後に抗 M 抗体を利用して免疫染色を行うことにより求めた M 蛋白の細胞内局在を示す写真である。

図 1 3 は、A - 1 0 細胞に S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 1 で感染し、3 2 或いは 3 7 で培養し、培養 1 日後に抗 M 抗体および抗 H N 抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察した M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在を示す写真である。ステレオ立体画像で示した。

図 1 4 は、A - 1 0 細胞に S e V 1 8 + S E A P / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 1 で感染し、3 2 或いは 3 7 で培養し、培養 2 日後に抗 M 抗体および抗 H N 抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察した M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在を示す写真である。ステレオ立体画像で示した。

図 1 5 は、M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在に及ぼす微小管脱重合試薬の効果を示す写真である。A - 1 0 細胞に S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 1 で感染し、直後に微小管の脱重合試薬であるコルヒチン (c o l c h i c i n e) 或いはコルセミド (c o l c e m i d e) を終濃度 1 μ M になるように添加し、3 2 で培養した。培養 2 日後に抗 M 抗体及び抗 H N 抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察した M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在を観察した。ステレオ立体画像で示した。

図 1 6 は、M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在に及ぼす微小管脱重合試薬の効果を示す写真である。A - 1 0 細胞に S e V 1 8 + / Δ F - G F P 或いは S e V 1 8 + / M t s H N t s Δ F - G F P を m . o . i . 1 で感染し、直後に微小管の脱重合試薬である c o l c h i c i n e を終濃度 1 μ M になるように添加し、3 2 或いは 3 7 で培養した。培養 2 日後に抗 M 抗体及び抗 H N 抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察した M 蛋白及び H N 蛋白の細胞内局在を観察した。ステレオ立体画像で示した。

図 1 7 は、P および L 遺伝子に変異を有する F 欠失型 S e V ゲノム c D N A の構築スキームを示す図である。

図 1 8 は、P および L 遺伝子に変異を有する F 欠失型 S e V を感染させた細胞からのウィルス 2 次放出を調べた結果を示す図である。「d F」は S e V 1 8 + / Δ F - G F P、「

「P86」はSeV18+/P86Lmut・ΔF-GFP、「P511」はSeV18+/P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

図19は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeVの細胞障害性を調べた結果を示す図である。「P86」はSeV18+/P86Lmut・ΔF-GFP、「P511」はSeV18+/P511Lmut・ΔF-GFP、「dF」はSeV18+/ΔF-GFPを表す。

図20は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeVを導入したCV-1細胞における導入遺伝子(GFP)を発現する細胞数の変化を示す図である。「P86」はSeV18+/P86Lmut・ΔF-GFP、「P511」はSeV18+/P511Lmut・ΔF-GFP、「dF」はSeV18+/ΔF-GFPを表す。

10

図21は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeVを導入したCV-1細胞における導入遺伝子(GFP)の発現を示す写真である。「P86」はSeV18+/P86Lmut・ΔF-GFP、「P511」はSeV18+/P511Lmut・ΔF-GFP、「ΔF」はSeV18+/ΔF-GFPを表す。

図22は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeVを導入した細胞における導入遺伝子(SEAP)の発現レベルの持続性を示す図である。「NC」はベクター導入を行わない陰性対照、「dF」はSeV18+/SEAP/ΔF-GFP、「p86」はSeV18+/SEAP/P86Lmut・ΔF-GFP、「p511」はSeV18+/SEAP/P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

図23は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeV(SEAP遺伝子搭載型)のウイルス2次放出を調べた結果を示す図である。「dF」はSeV18+/SEAP/ΔF-GFP、「p86」はSeV18+/SEAP/P86Lmut・ΔF-GFP、「p511」はSeV18+/SEAP/P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

20

図24は、PおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeV(SEAP遺伝子搭載型)の細胞障害性を調べた結果を示す図である。「dF+SEAP」はSeV18+/SEAP/ΔF-GFP、「p86+SEAP」はSeV18+/SEAP/P86Lmut・ΔF-GFP、「p511+SEAP」はSeV18+/SEAP/P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

図25は、MおよびHN遺伝子に温度感受性変異を有し、さらにPおよびL遺伝子に変異を有するF欠失型SeVのゲノム構造を示す図である。

30

図26は、M/HN遺伝子に温度感受性変異、P/L遺伝子に変異を有するF欠失型SeVのゲノムcDNAの構築スキームを示す図である。

図27は、M/HN遺伝子に温度感受性変異、P/L遺伝子に変異を有するF欠失型SeVのウイルス2次放出を調べた結果を示す図である。「dF」はSeV18+/ΔF-GFP、「ts」はSeV18+/MtsHNts・ΔF-GFP、「ts+86」はSeV18+/MtsHNts・P86Lmut・ΔF-GFP、「ts+511」はSeV18+/MtsHNts・P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

図28は、M/HN遺伝子に温度感受性変異、P/L遺伝子に変異を有するF欠失型SeVの細胞障害性を調べた結果を示す図である。「dF」はSeV18+/ΔF-GFP、「ts」はSeV18+/MtsHNts・ΔF-GFP、「ts+86」はSeV18+/MtsHNts・P86Lmut・ΔF-GFP、「ts+511」はSeV18+/MtsHNts・P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

40

図29は、M/HN遺伝子に温度感受性変異、P/L遺伝子に変異を有するF欠失型SeV(外来遺伝子搭載型)の外来遺伝子発現レベルを経時的に調べた結果を示す図である。「dF」はSeV18+/SEAP/ΔF-GFP、「ts+86」はSeV18+/SEAP/MtsHNts・P86Lmut・ΔF-GFP、「ts+511」はSeV18+/SEAP/MtsHNts・P511Lmut・ΔF-GFPを表す。

図30は、M/HN遺伝子に温度感受性変異、P/L遺伝子に変異を有するF欠失型SeV(外来遺伝子搭載型)の細胞障害性を経時的に調べた結果を示す図である。「dF」はSeV18+/SEAP/ΔF-GFP、「dF/ts+P86L」はSeV18+/SEAP/MtsHNts・P86Lmut・ΔF-GFPを表す。

50

P / M t s H N t s P 8 6 L m u t ・ Δ F - G F P、「d F / t s + P 5 1 1 L」は S e V 1 8 + S E A P / M t s H N t s P 5 1 1 L m u t ・ Δ F - G F Pを表す。

図 3 1 は、E G F P 遺伝子を有する M 欠失型 S e V ゲノム c D N A の構築スキームを示す図である。

図 3 2 は、F 及び両欠失型 S e V ゲノム c D N A の構築スキームを示す図である。

図 3 3 は、構築した F および / または M 欠失型 S e V 遺伝子の構造を示す図である。

図 3 4 は、h y g r o m y c i n 耐性遺伝子を有する M 遺伝子発現プラスミドの構築スキームを示す図である。

図 3 5 は、クローニングした M (及び F) 蛋白を誘導発現する細胞について、C r e D N A リコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィルス (A c C A N C r e) を感染後、W e s t e r n - b l o t t i n g による M 及び F 蛋白の半定量的な発現比較を示す写真である。 10

図 3 6 は、ヘルパー細胞 (L L C - M K 2 / F 7 / M) クローン # 1 8 及び # 6 2 を用いた M 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M - G F P) のウィルス再構成を示す写真である。

図 3 7 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P のウィルス生産性 (C I U と H A U の経時変化) を示す図である。

図 3 8 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P のビリオン中の遺伝子構造確認の為に R T - P C R の結果を示す写真および図である。

図 3 9 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P のウィルス構造を蛋白の視点から確認する為に、L L C - M K 2 細胞に感染後の細胞及び培養上清中のウィルス蛋白について W e s t e r n - b l o t t i n g を行い、S e V 1 8 + G F P 及び S e V 1 8 + / Δ F - G F P との比較結果を示す写真である。 20

図 4 0 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P 及び S e V 1 8 + / Δ F - G F P 感染 L L C - M K 2 細胞培養上清中のウィルス由来蛋白の定量比較 (希釈系列を作製して W e s t e r n - b l o t t i n g) を示す写真である。抗 S e V 抗体 (D N - 1) を用いた。

図 4 1 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P 或いは S e V 1 8 + / Δ F - G F P を L L C - M K 2 に m . o . i . 3 で感染し、経時的に回収した培養上清中の H A 活性を示す図である。

図 4 2 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P 或いは S e V 1 8 + / Δ F - G F P を L L C - M K 2 に m . o . i . 3 で感染し、感染 5 日後の蛍光顕微鏡像を示す写真である。 30

図 4 3 は、S e V 1 8 + / Δ M - G F P 或いは S e V 1 8 + / Δ F - G F P を L L C - M K 2 に m . o . i . 3 で感染し、感染 5 日後に回収した培養上清について、カチオニックリボソーム (D o s p e r) を用いて L L C - M K 2 にトランスフェクションした 2 日後の蛍光顕微鏡像を示す写真である。

図 4 4 は、F 及び M 欠失型 S e V (S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P) のウィルス再構成を示す写真である。

図 4 5 は、M 及び F 両発現細胞 (L L C - M K 2 / F 7 / M 6 2 / A) に S e V 1 8 + / Δ M - G F P 或いは S e V 1 8 + / Δ F - G F P を感染し、感染 3 日後及び 5 日後の蛍光顕微鏡像を示す写真である。

図 4 6 は、z e o c i n 選択マーカを持つ、M または F 遺伝子の誘導発現ベクターの構築スキームを示す図である。 40

図 4 7 は、M / F 発現ヘルパー細胞における M 蛋白質および F 蛋白質の発現を調べた結果を示す写真である。

図 4 8 は、G F P 遺伝子を持つ M / F 欠失型 S e V を導入した細胞における G F P の発現を示す写真である。

図 4 9 は、G F P 遺伝子を持つ M / F 欠失型 S e V の産生細胞からのウィルスの産生を調べた結果を示す図である。

図 5 0 は、M / F 欠失型 S e V のゲノム構造を R T - P C R により確認した結果を示す写真である。「d F」は S e V 1 8 + / Δ F - G F P、「d M」は S e V 1 8 + / Δ M - G F P、「d M d F」は S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P を表す。 50

図 5 1 は、M / F 欠失型 S e V を導入した細胞における M 蛋白質および F 蛋白質の発現の欠失を確認した結果を示す写真である。

図 5 2 は、M / F 欠失型 S e V を導入した細胞からのウィルス 2 次放出の有無を H A 活性により調べた結果を示す図である。

図 5 3 は、M / F 欠失型 S e V を導入した細胞からのウィルス 2 次放出の有無を、培養上清のトランスフェクションにより調べた結果を示す写真である。

図 5 4 は、M / F 欠失型 S e V および M 欠失型 S e V の大脳皮質神経細胞への感染能を調べた結果を示す写真である。

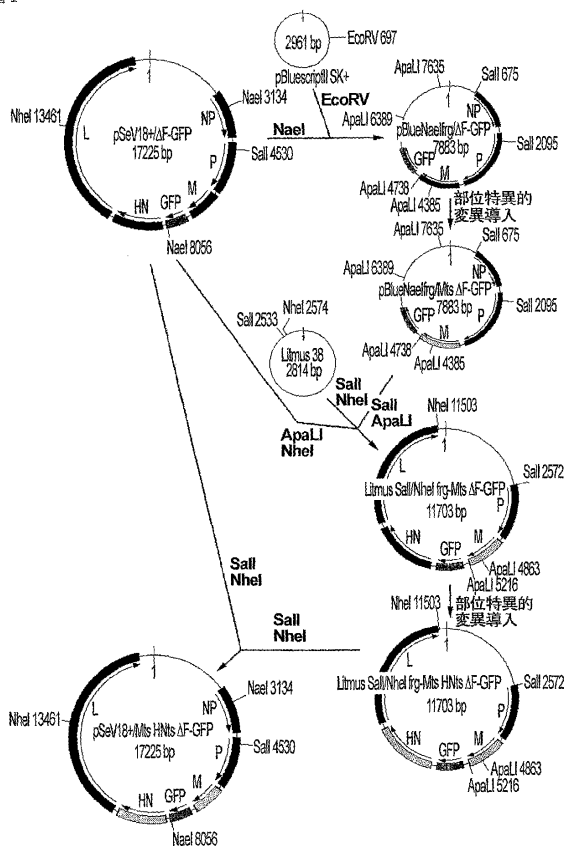
図 5 5 は、M / F 欠失型 S e V および M 欠失型 S e V のスナネズミ脳へのインピボ投与後の導入遺伝子の発現を示す写真である。

図 5 6 は、M / F 欠失型 S e V および M 欠失型 S e V の感染価依存的な細胞障害性を調べた結果を示す図である。「付加」は複製能を持った S e V (S e V 1 8 + G F P)、「d F」は S e V 1 8 + / Δ F - G F P、「d M」は S e V 1 8 + / Δ M - G F P、「d M d F」は S e V 1 8 + / Δ M Δ F - G F P を表す。

10

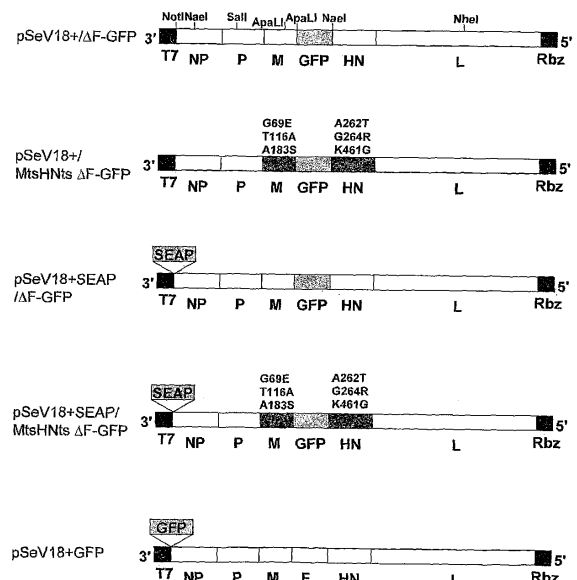
【 図 1 】

図 1



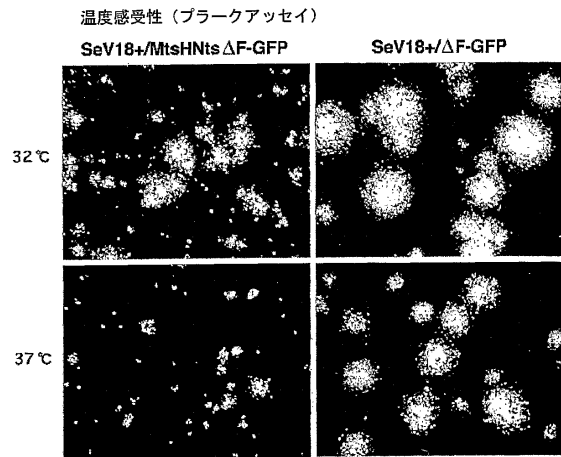
【 図 2 】

図 2



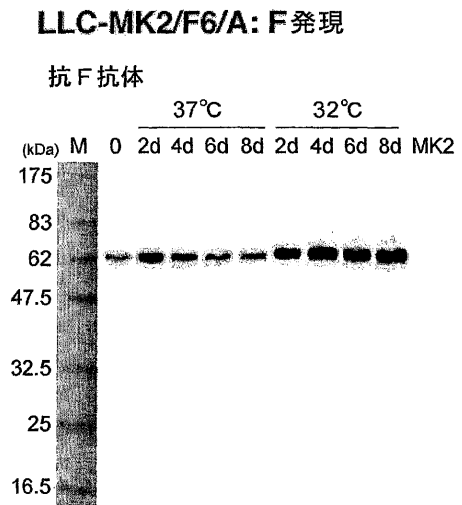
【 図 3 】

図 3



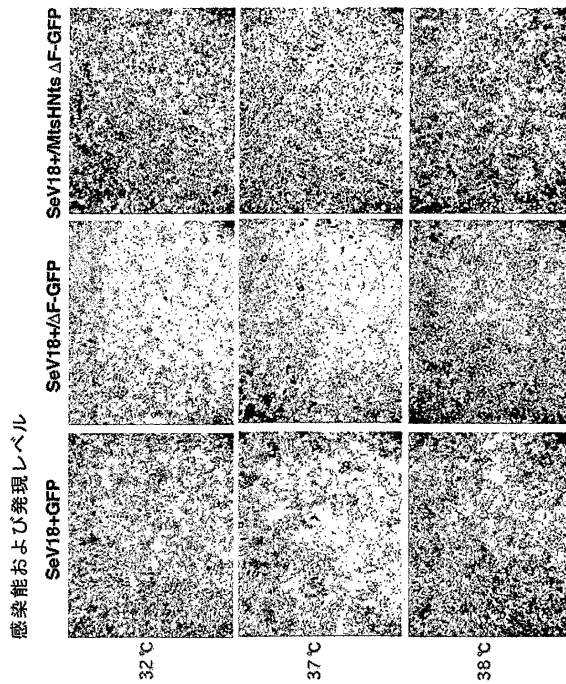
【 図 4 】

図 4



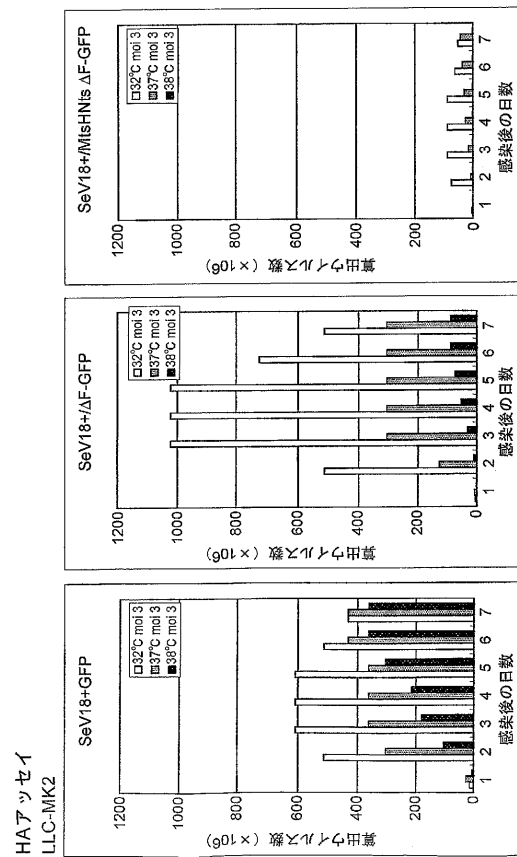
【 図 5 】

図 5



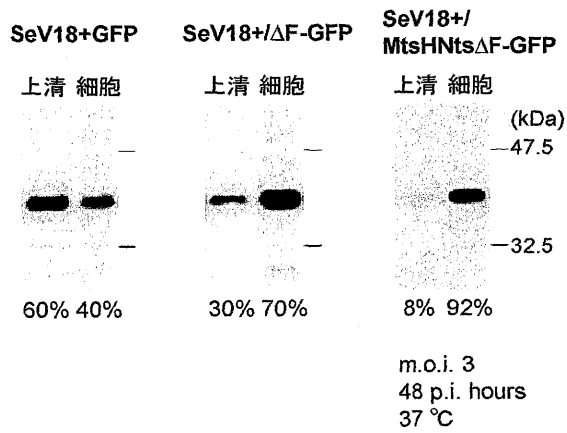
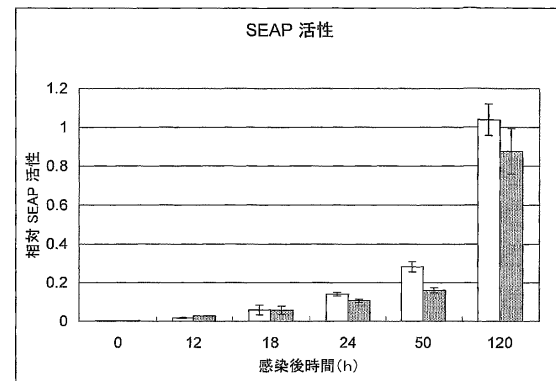
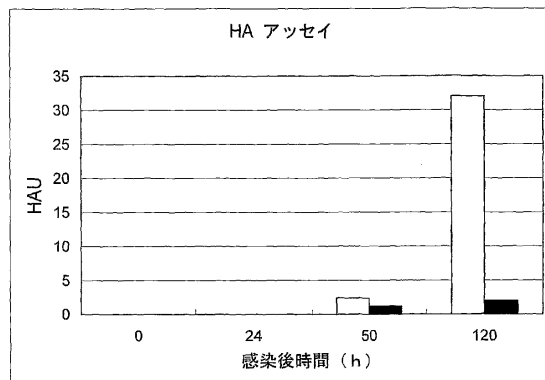
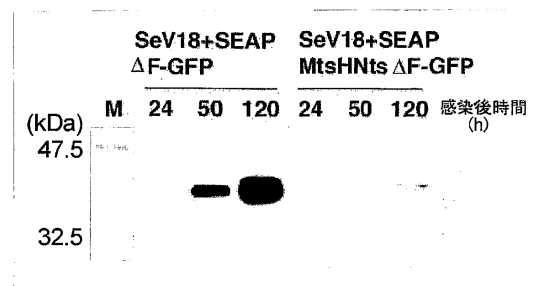
【 図 6 】

図 6



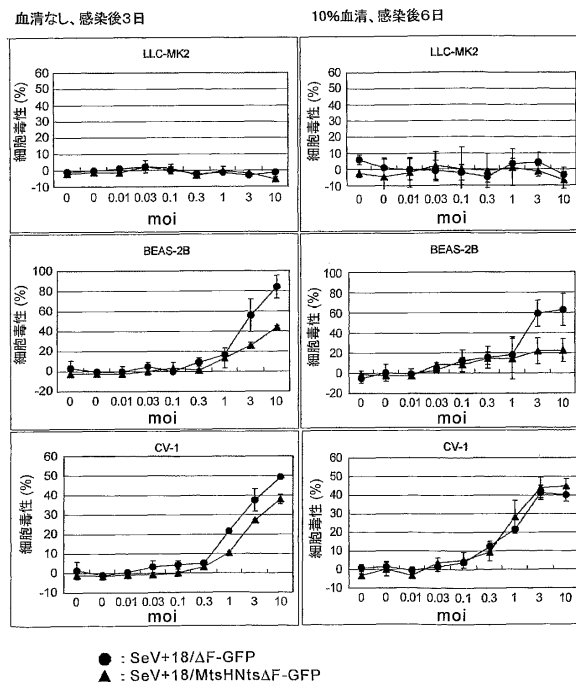
【 図 7 】
図 7

ウイルス様粒子(VLP) 産生の違い

【 図 8 】
図 8【 図 9 】
図 9【 図 10 】
図 10

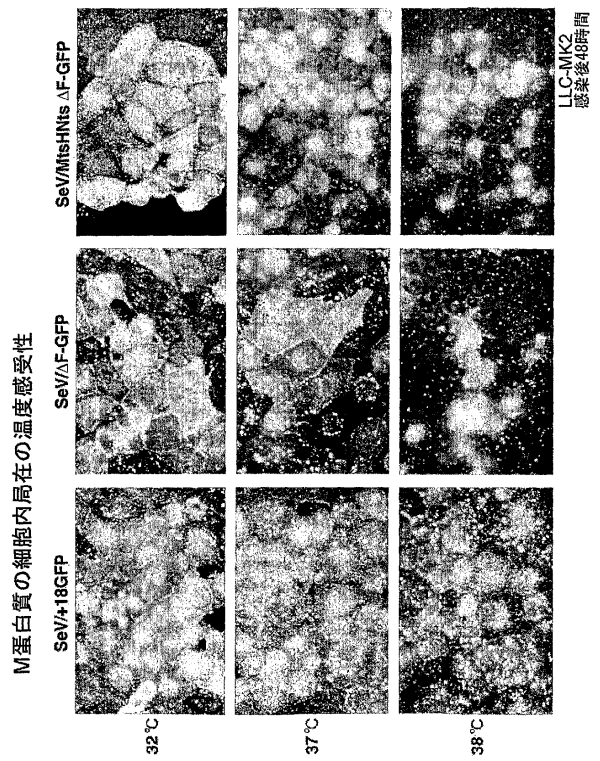
【図 1 1】

図 1 1



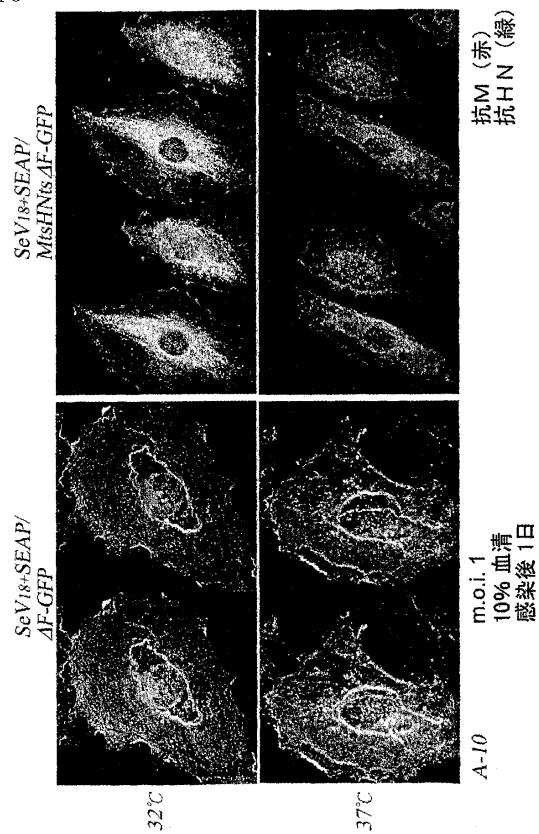
【図 1 2】

図 1 2



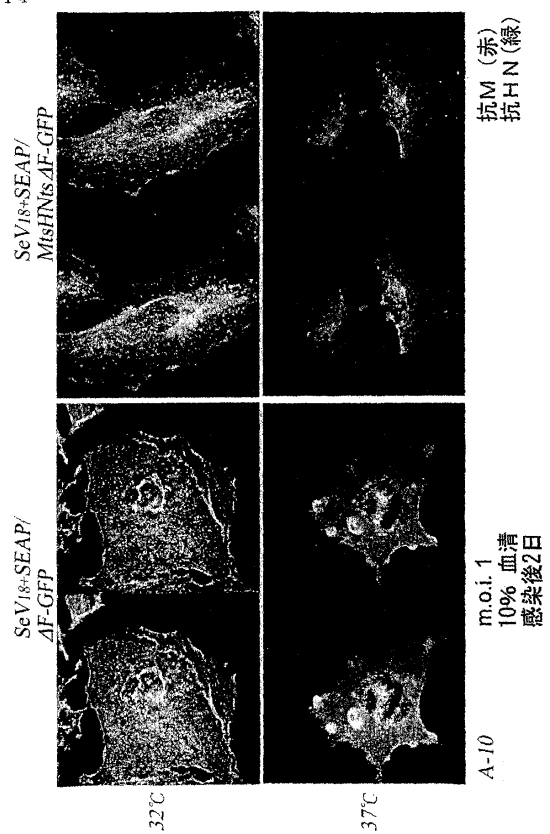
【図 1 3】

図 1 3



【図 1 4】

図 1 4

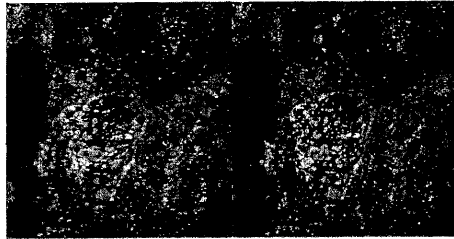


【図 15】

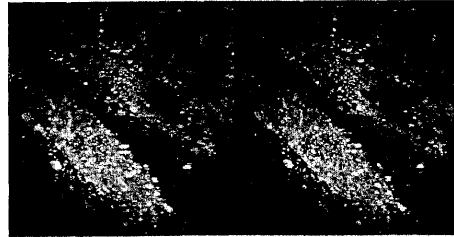
図 15

*SeV18+SEAP/
MtsHNtsΔF-GFP*

コルヒチン 1μM



コルセミド 1μM



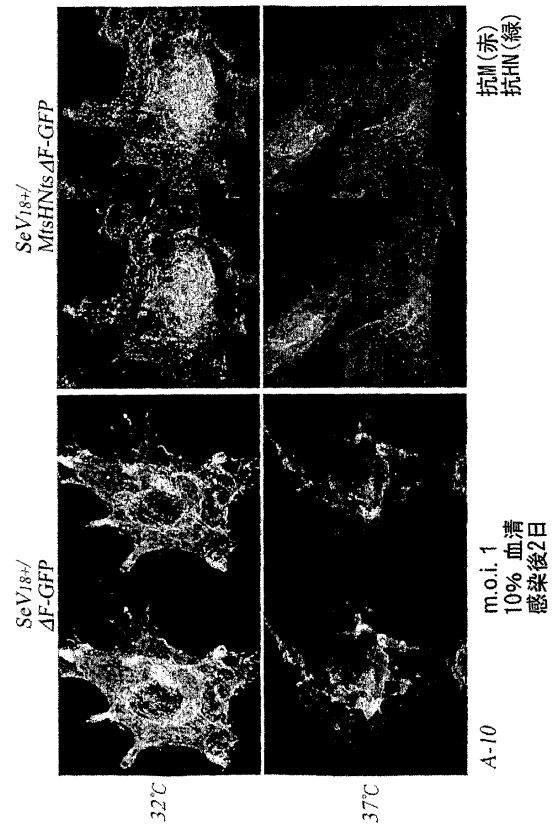
A-10

抗M(赤)
抗HN(緑)

m.o.i. 1
10%血清
32°Cインキュベーション
感染後2日

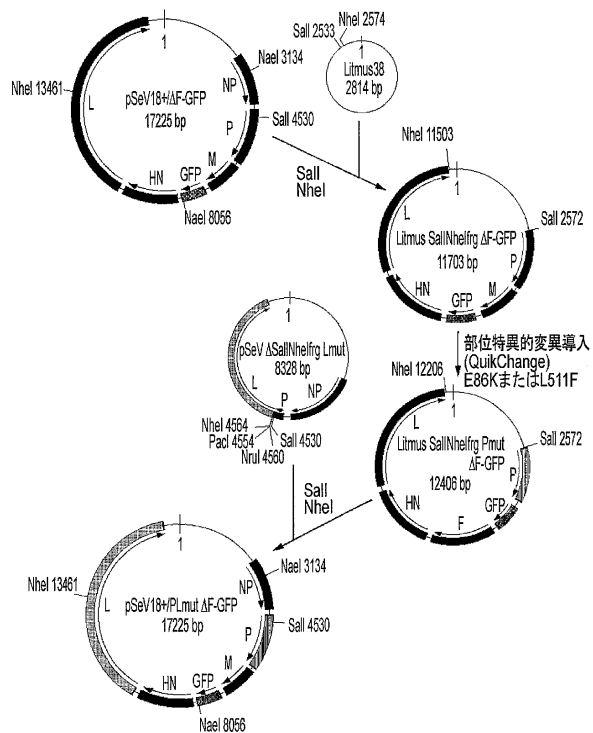
【図 16】

図 16



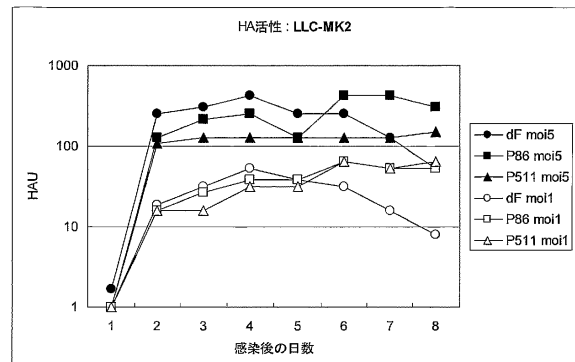
【図 17】

図 17



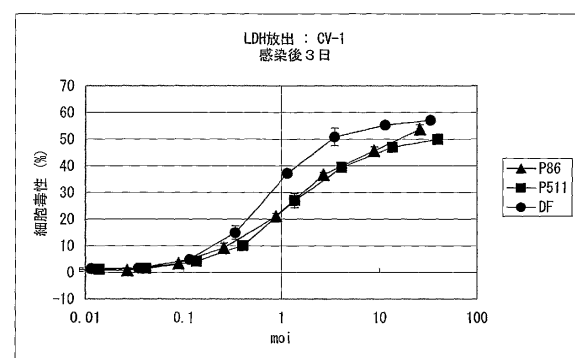
【図 18】

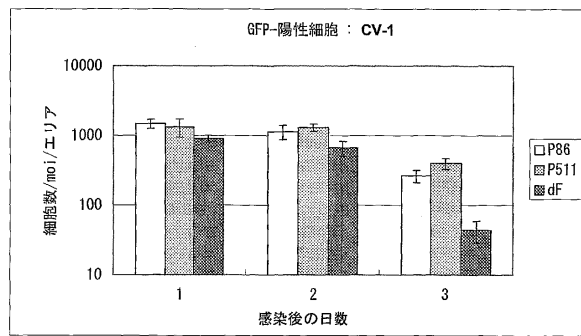
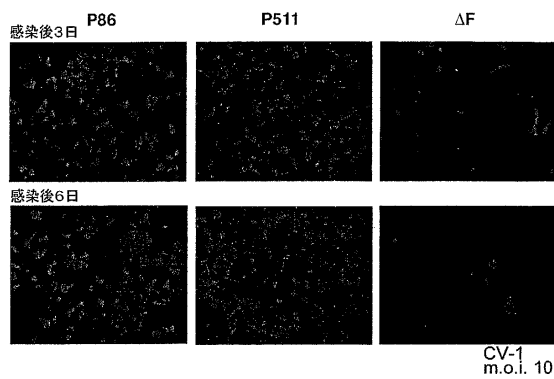
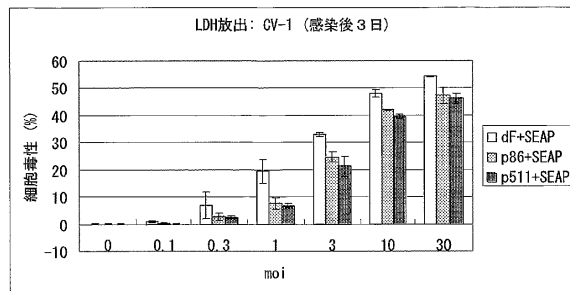
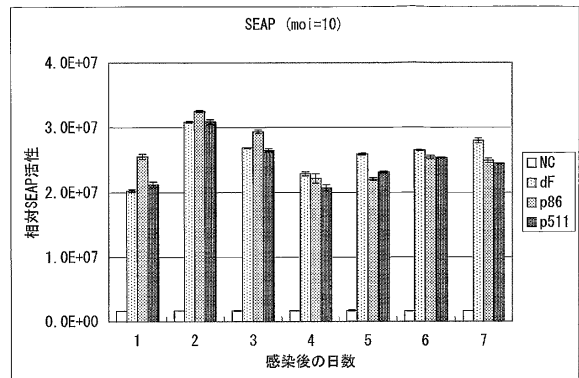
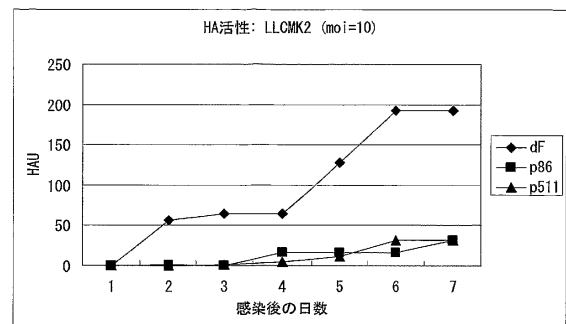
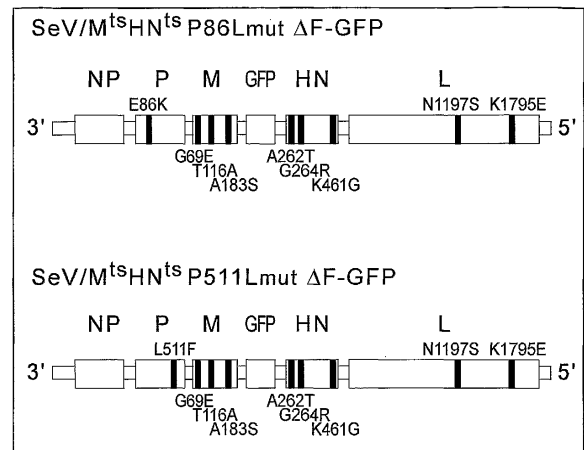
図 18



【図 19】

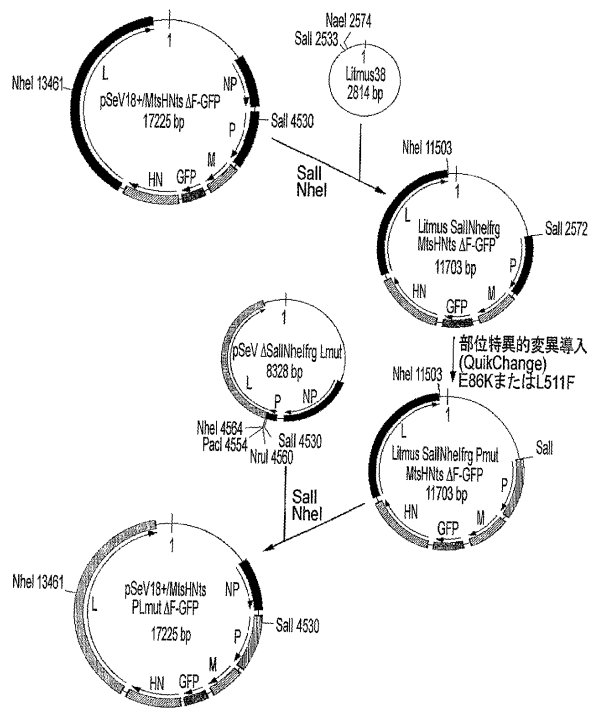
図 19



【図 20】
図 20【図 21】
図 21【図 24】
図 24【図 22】
図 22【図 23】
図 23【図 25】
図 25

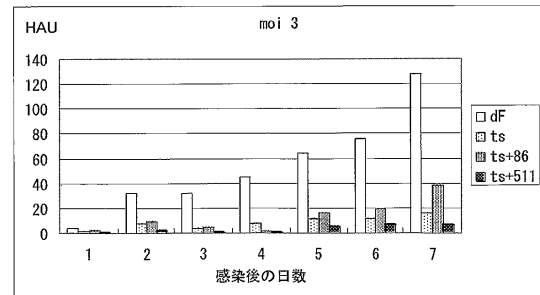
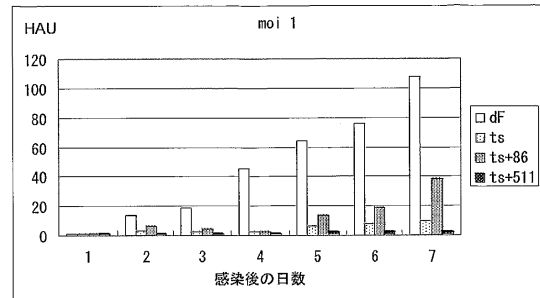
【図 26】

図 26



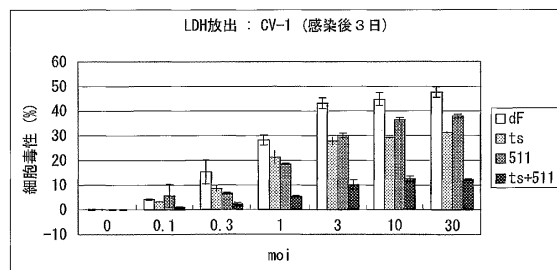
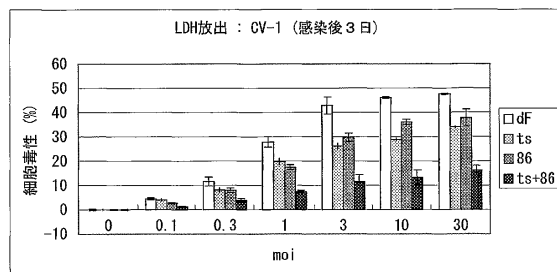
【図 27】

図 27



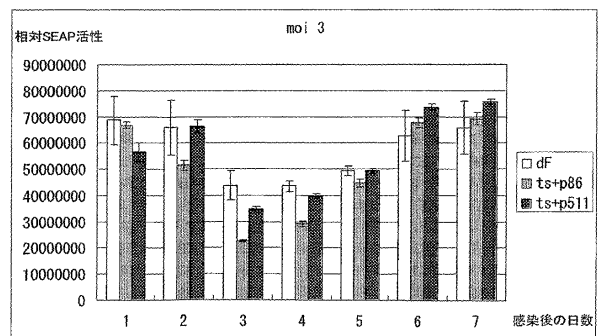
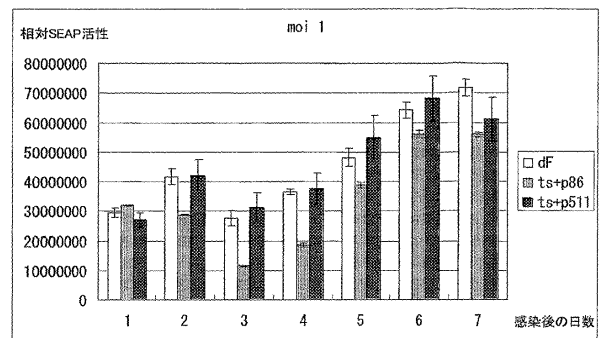
【図 28】

図 28



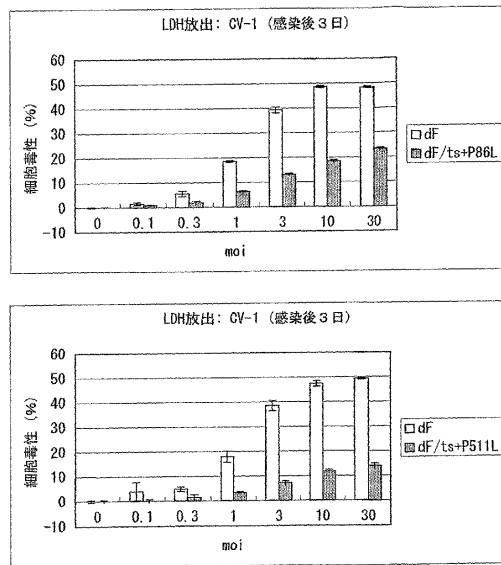
【図 29】

図 29



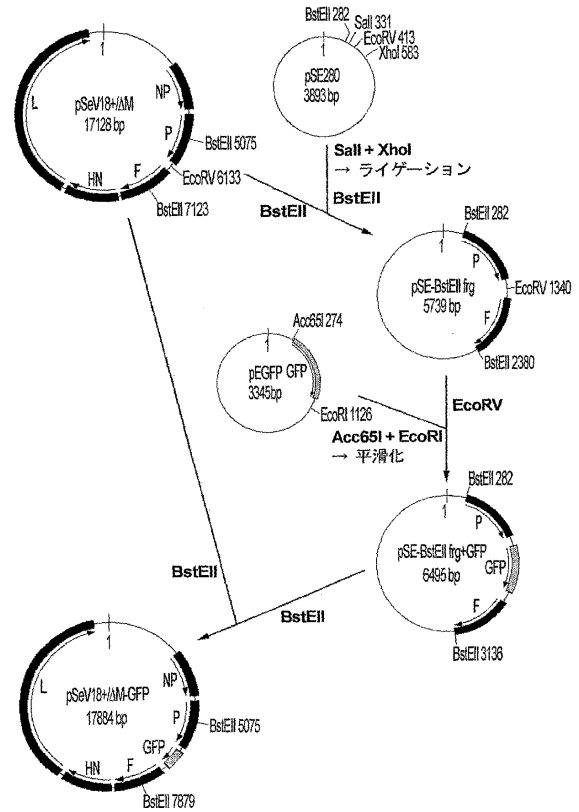
【 図 3 0 】

図 3 0



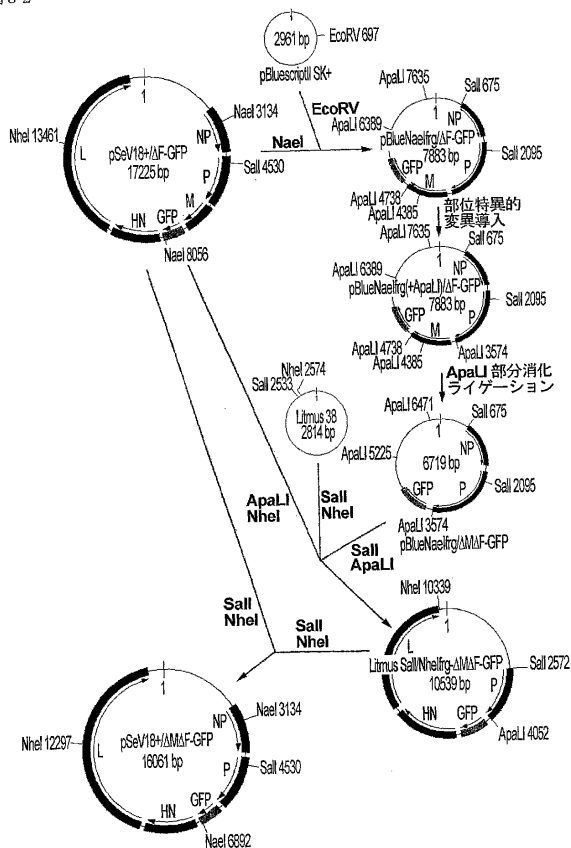
【 図 3 1 】

図 3 1



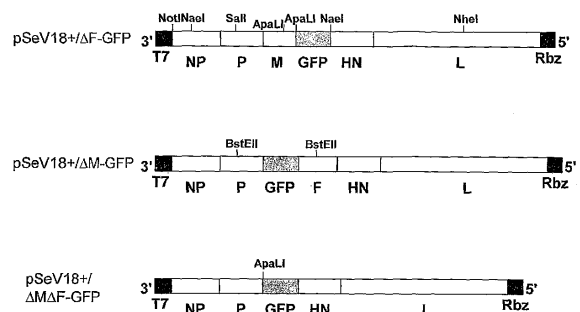
【 図 3 2 】

図 3 2



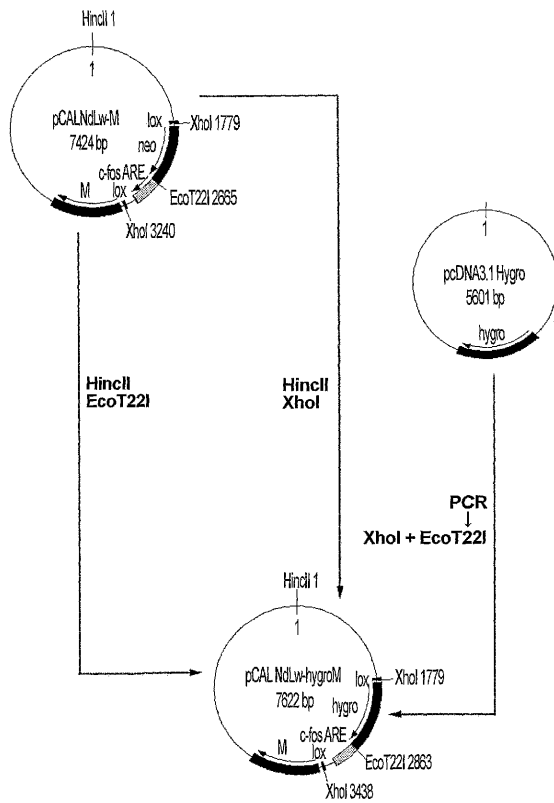
【 図 3 3 】

図 3 3



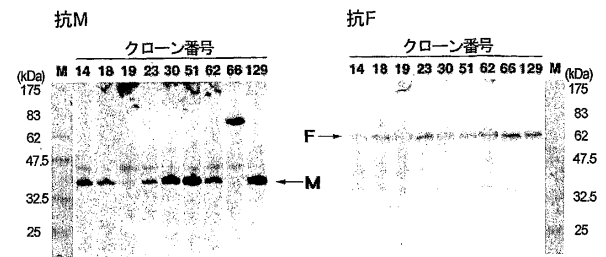
【 図 3 4 】

図 3 4



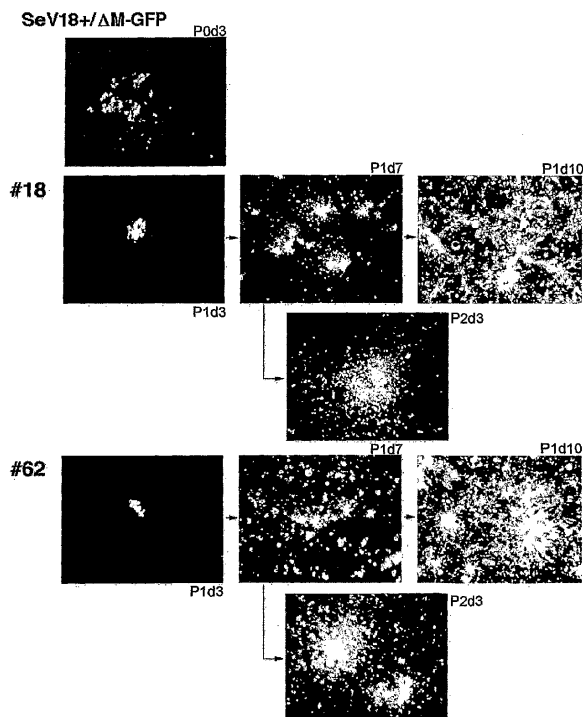
【 図 3 5 】

図 3 5



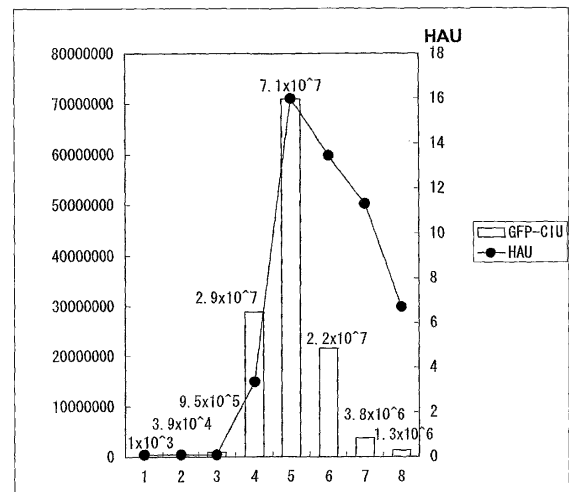
【 図 3 6 】

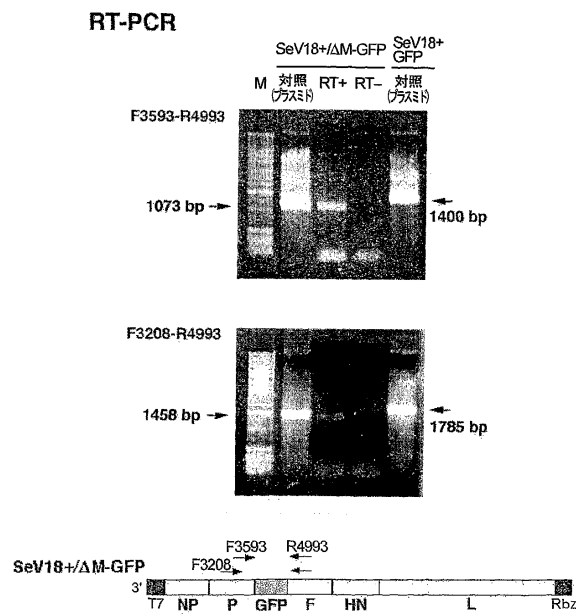
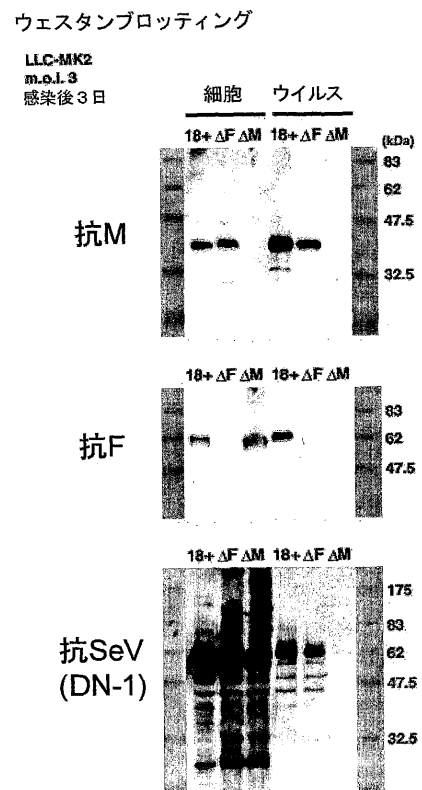
図 3 6



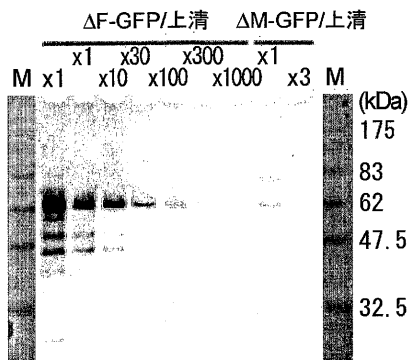
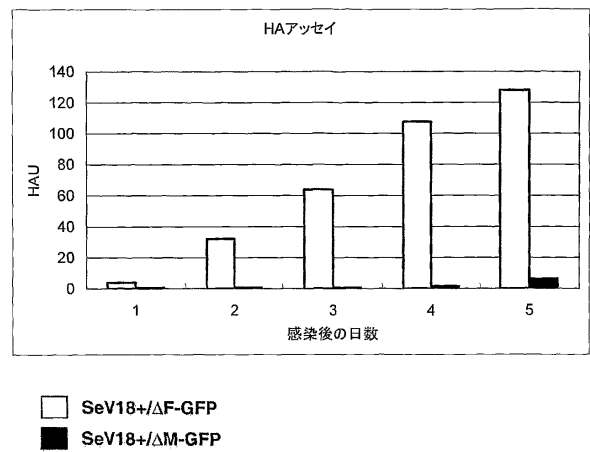
【 図 3 7 】

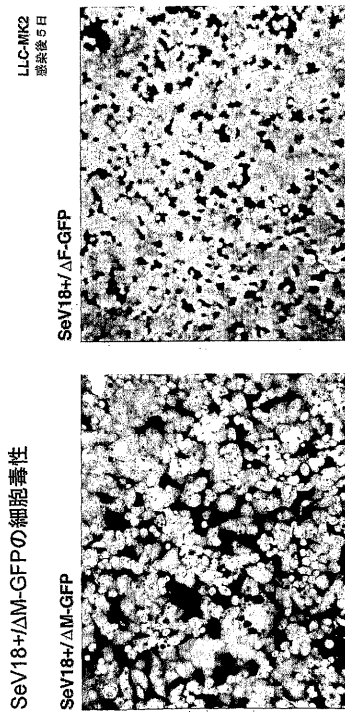
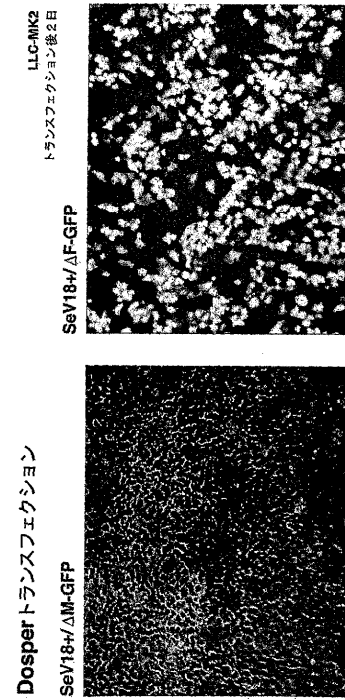
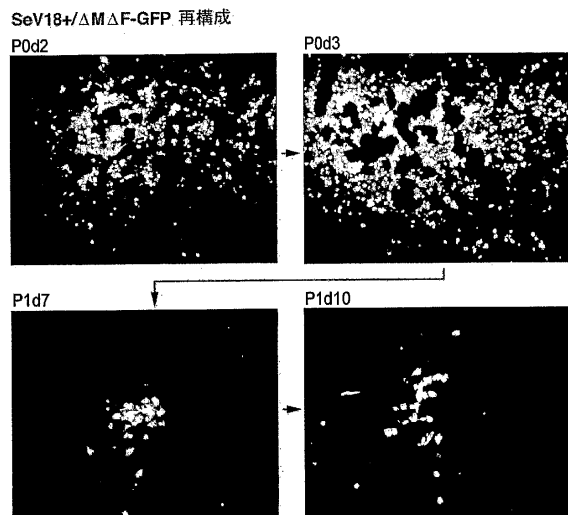
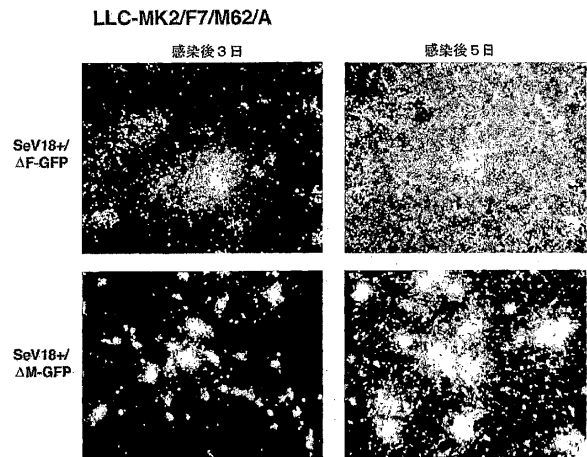
図 3 7



【図 38】
図 38【図 39】
図 39【図 40】
図 40

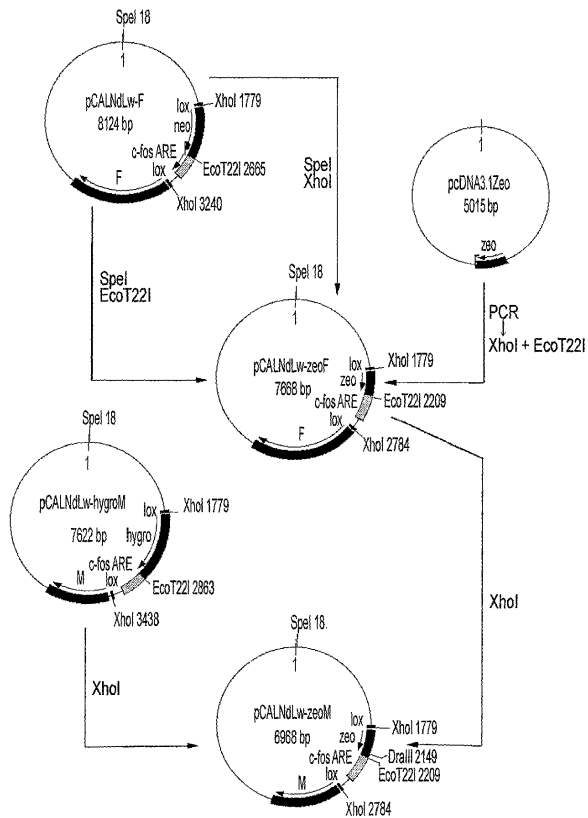
ウェスタンブロッティング: 抗SeV(DN-1)

【図 41】
図 41

【 図 4 2 】
図 4 2【 図 4 3 】
図 4 3【 図 4 4 】
図 4 4【 図 4 5 】
図 4 5

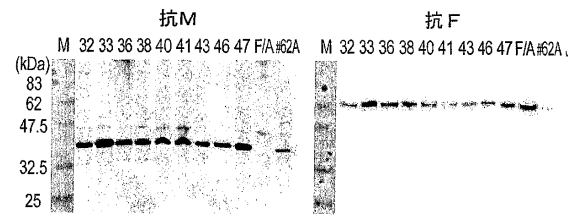
【 図 4 6 】

図 4 6



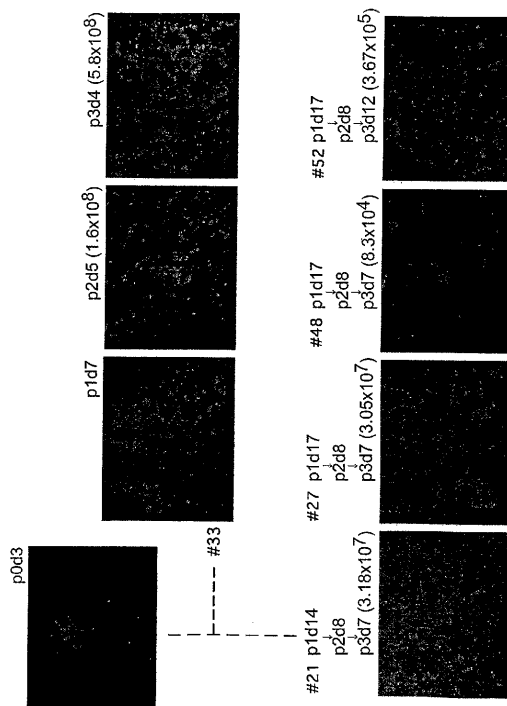
【 図 4 7 】

図 4 7



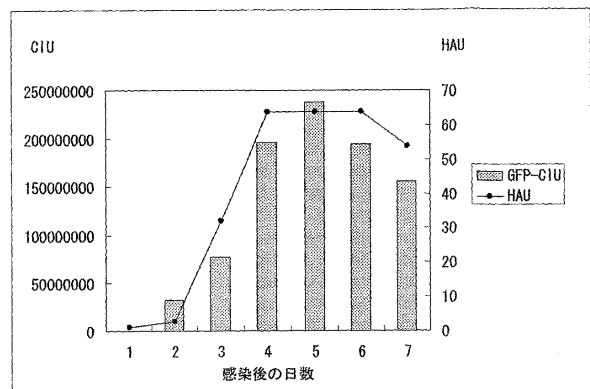
【 図 4 8 】

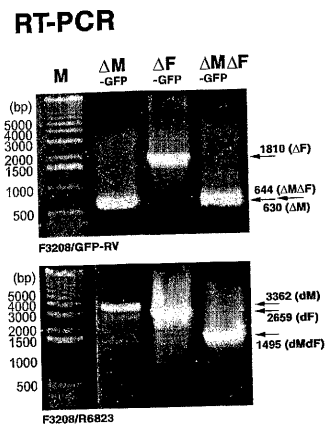
図 4 8



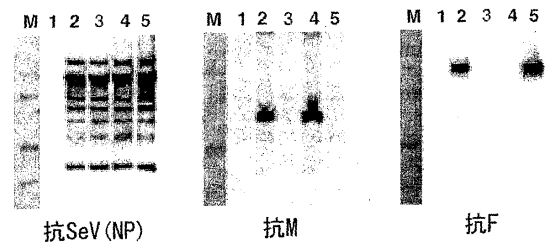
【 図 4 9 】

図 4 9

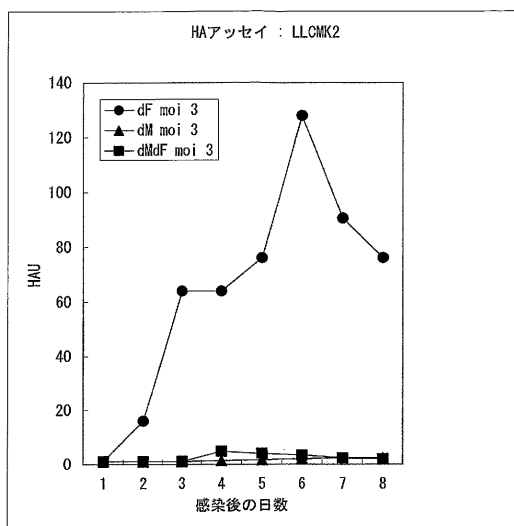
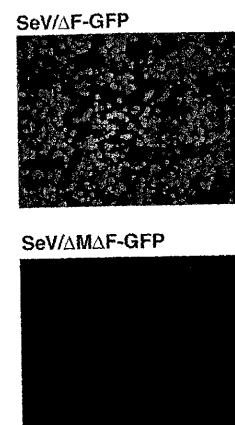


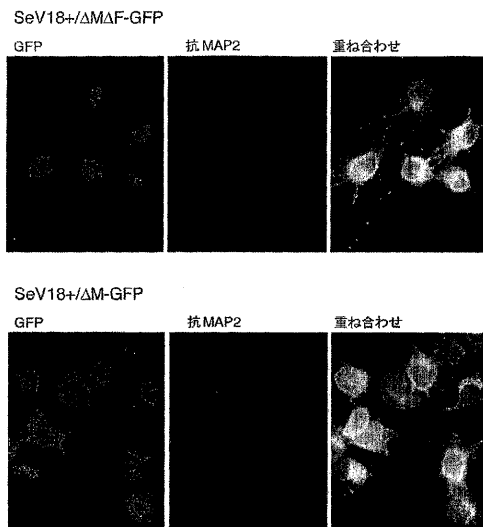
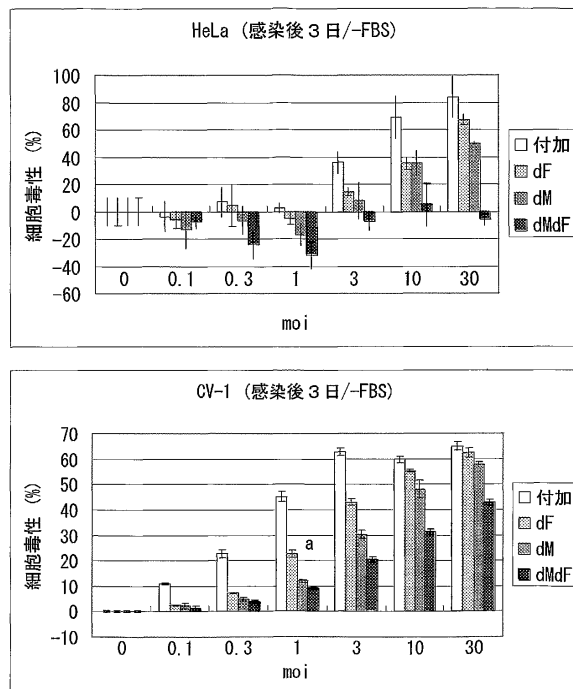
【図 5 0】
図 5 0【図 5 1】
図 5 1

ウェスタンブロッティング：感染後3日、LLC-MK2細胞ライセート



- 1 感染なし
- 2 SeV/GFP
- 3 SeV/ΔMΔF-GFP
- 4 SeV/ΔF-GFP
- 5 SeV/ΔM-GFP

【図 5 2】
図 5 2【図 5 3】
図 5 3

【図 5 4】
図 5 4【図 5 5】
図 5 5【図 5 6】
図 5 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/09558
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ G01N33/53, C12N15/86, C12N15/45, C12N7/01 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ G01N33/53, C12N15/86, C12N15/45, C12N7/01 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOTTET, G. et al., Characterization of Sendai virus M protein mutants that can partially interfere with virus particle production. J. Gen. Virol. 1999, Vol.80, Pt.11, pages 2977 to 2986	1-20
X	MOTTET, G. et al., A Sendai virus vector leading to the efficient expression of mutant M proteins interfering with virus particle budding. Virology 1996, Vol.221, No.1, pages 159 to 171	1-20
X	STRICKER, R. et al., The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. J. Gen. Virol. 1994, Vol.75, Pt.5, pages 1031 to 1042	1-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 December, 2002 (12.12.02)		Date of mailing of the international search report 14 January, 2003 (14.01.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/JP02/09558

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOMEZ-PUERTAS, P. et al., Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. J. Virol. 2000, Vol.74, No.24, pages 11538 to 11547	1-20
X Y	MEBATSON, T. et al., Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. J. Virol. 1999, Vol.73, No.1, pages 242 to 250	20 1-19
X Y	CATHOMEN, T. et al., A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. EMBO J. 1998, Vol.17, No.14, pages 3899 to 3908	20 1-19
X Y	KONDO, T. et al., Temperature-sensitive phenotype of a mutant Sendai virus strain is caused by its insufficient accumulation of the M protein. J. Biol. Chem. 1993, Vol.268, No.29, pages 21924 to 21930	20 1-19
Y	LI, H. O. et al., A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. J. Virol. 2000, Vol.74, No.14, pages 6564 to 6569	1-20
Y	WO 00/70070 A1 (DNAVEC Research Inc.), 23 November, 2000 (23.11.00), & AU 200046146 A & EP 1196667 A1 & KR 2002014786 A & CN 1355851 A	1-20
A	GAROFF, H. et al., Virus maturation by budding. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, Vol.62, No.4, pages 1171 to 1190	1-20
P, Y	TAKIMOTO, T. et al., Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. J. Virol. 2001. Dec., Vol.75, No.23, pages 11384 to 11391	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/09558

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention as set forth in claim 1 relates to a method of examining the ability to form grains of a (-) strand RNA virus vector involving the step of detecting the aggregation of M protein on cell surface in cells having the (-) strand RNA virus vector transferred therein. In contrast, the invention as set forth in claim 21 relates to a recombinant (-) strand RNA virus which has a functional M protein but lacks a sequence encoding the M protein in the genome thereof, while the invention as set forth in claim 22 relates to a recombinant (-) strand RNA virus wherein a specific amino acid in a specific protein encoded by the (-) strand RNA virus genome has been substituted by another amino acid. (Continued to extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 20

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09558

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Thus, these inventions cannot be considered as forming a single general inventive concept.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 33 are classified into 3 groups of inventions, i.e., the inventions as set forth in claims 1 to 20, the inventions as set forth in claim 21 and parts of claims 26 to 33, and the inventions as set forth in claims 22 to 25 and parts of claims 26 to 33. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/09558
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ G01N 33/53, C12N 15/86, C12N 15/45, C12N 7/01		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ G01N 33/53, C12N 15/86, C12N 15/45, C12N 7/01		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)		
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MOTTET, G. et al. Characterization of Sendai virus M protein mutants that can partially interfere with virus particle production. J. Gen. Virol. 1999, Vol. 80, Pt. 11, p. 2977-2986	1-20
X	MOTTET, G. et al. A Sendai virus vector leading to the efficient expression of mutant M proteins interfering with virus particle budding. Virology 1996, Vol. 221, No. 1, p. 159-171	1-20
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に基き提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	12. 12. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 9281 高橋 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/09558
C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	STRICKER, R. et al. The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. J. Gen. Virol. 1994, Vol. 75, Pt. 5, p. 1031-1042	1-20
X	GOMEZ-PUERTAS, P. et al. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. J. Virol. 2000, Vol. 74, No. 24, p. 11538-11547	1-20
X Y	MEBASTION, T. et al. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. J. Virol. 1999, Vol. 73, No. 1, p. 242-250	20 1-19
X Y	CATHOMEN, T. et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. EMBO J. 1998, Vol. 17, No. 14, p. 3899-3908	20 1-19
X Y	KONDO, T. et al. Temperature-sensitive phenotype of a mutant Sendai virus strain is caused by its insufficient accumulation of the M protein. J. Biol. Chem. 1993, Vol. 268, No. 29, p. 21924-21930	20 1-19
Y	LI, H. O. et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. J. Virol. 2000, Vol. 74, No. 14, p. 6564-6569	1-20
Y	WO 00/70070 A1 (株式会社ディナベック研究所) 2000.11.23 & AU 200046146 A & EP 1186667 A1 & KR 2002014786 A & CN 1355851 A	1-20
A	GAROFF, H. et al. Virus maturation by budding. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, Vol. 62, No. 4, p. 1171-1190	1-20
P, Y	TAKIMOTO, T. et al. Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. J. Virol. 2001. Dec., Vol. 75, No. 23, p. 11384-11391	1-20

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP02/09558
第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き） 法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。	
1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、	
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、	
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。	
第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き） 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。 請求の範囲1に記載された発明は、（一）銀RNAウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の細胞表面の凝集を検出する工程を含む（一）銀RNAウィルスベクターの粒子形成能を検査する方法に係る発明であるのに対し、請求の範囲2.1に記載された発明は、機能的M蛋白質を有するが、該ウィルスのゲノムにおいてM蛋白質をコードする配列が欠損している組換え（一）銀RNAウィルスに係る発明であり、請求の範囲2.2に記載された発明は、（一）銀RNAウィルスのゲノムによりコードされる特定の蛋白質において、特定のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている組換え（一）銀RNAウィルスに係る発明であるから、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成するものとは認められない。 したがって、請求の範囲1-3.3に記載された発明は、請求の範囲1-2.0に記載された発明、請求の範囲2.1及び2.6-3.3の一部に記載された発明、請求の範囲2.2-2.5及び2.6-3.3の一部に記載された発明の3つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。	
1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。	
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。	
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。	
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。 請求の範囲1-2.0	
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 R 1:93)

C 1 2 R 1:93

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 飯田 章博

茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社ディナベック研究所内

(72)発明者 長谷川 護

茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社ディナベック研究所内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	具有降低的颗粒形成能力的 (-) 链RNA病毒载体的检查方法和生产方法		
公开(公告)号	JPWO2003025570A1	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2003529148	申请日	2002-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社载体研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社ディナベック研究所		
[标]发明人	井上 誠 徳炭由美子 飯田章博 長谷川 護		
发明人	井上 誠 徳炭 由美子 飯田 章博 長谷川 護		
IPC分类号	C12N15/09 A61K48/00 C12N7/00 C12N7/01 C12N7/04 C12N15/45 C12N15/86 G01N33/53 G01N33/569 C12R1/93		
CPC分类号	C12N7/00 A61K48/00 C12N15/86 C12N2760/18843 C12N2760/18861 C12N2800/30		
FI分类号	C12N15/00.A C12N7/00 G01N33/53.M G01N33/569.ZNA.L C12R1/93		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001283451 2001-09-18 JP 2001356336 2001-11-21 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

检查 (M) 颗粒形成 (-) 链RNA病毒载体是通过检测载体转移细胞中的局部M蛋白来进行的。还包括以下方面的独立权利要求：(1) 筛选 (-) 具有降低的或缺乏形成粒的能力的链RNA病毒载体，包括：(a) 在载体转移的细胞中检测局部M蛋白；(b) 选择具有降低的或缺乏定位的载体；(2) 筛选具有降低的能力或缺乏形成 (-) 链RNA病毒载体颗粒的能力的基因，其包括：(a) 在用维持待检测基因的 (-) 链RNA病毒载体转移的细胞中检测局部M蛋白；(b) 选择一种具有这种降低或缺乏定位的基因；(3) 构建具有降低或缺乏形成粒的能力的重组 (-) 链RNA病毒载体，包括重建在互补条件下维持如此鉴定或分离的基因以维持降低或缺乏M的 (-) 链RNA病毒载体的构建 通过该基因进行蛋白质定位；(4) 构建重组 (-) 链RNA病毒载体，所述重组 (-) 链RNA病毒载体由于在维持功能性M蛋白的表达条件下M基因的缺失或突变而导致M蛋白表达产物的定位降低或缺乏定位。(5) 如此构建的重组 (-) 链RNA病毒载体；(6) 另一种重组 (-) 链RNA病毒载体，其在病毒基因组上缺失了编码M蛋白的序列，并具有功能性M蛋白。(7) 一种重组 (-) 链T117和A183中的一种或多种获得编码 (-) 链RNA病毒M蛋白的病毒基因组；(c) 通过用相同位置的其他氨基酸置换仙台病毒HN蛋白的A262，G264和K461的基因组；(d) 通过用其他氨基酸取代仙台病毒L蛋白或其他 (-) 链得编码 (-) 链RNA病毒L蛋白的病毒基因组。等值职位；(8) 含有不大

