

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 4 月 6 日 (06.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/035829 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/867 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

Ikunoshin) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/017875

(74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区域見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2005 年 9 月 28 日 (28.09.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-283918 2004 年 9 月 29 日 (29.09.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蝶野 英人 (CHONO, Hideto) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 奥山 洋美 (OKUYAMA, Hiromi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 江頭 知恵 (EGASHIRA, Tomoe) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 小山 信人 (KOYAMA, Nobuto) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一 (MINENO, Junichi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO,

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL FOR PRODUCING RETROVIRUS VECTOR

(54) 発明の名称: レトロウイルスベクター産生用細胞

(57) Abstract: The N-acetylglucosaminyltransferase III activity is enhanced in a cell carrying retrovirus-origin gag-pol gene and env gene. By constructing a retrovirus vector with the use of the above cell, a retrovirus vector having a modified sugar chain structure can be obtained. The retrovirus vector constructed by this method shows a high infection efficiency particularly in the presence of a functional substance.

(57) 要約: レトロウイルス由来の gag-pol 遺伝子、env 遺伝子を保持する細胞において N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III 活性を増強させる。前記細胞を使用してレトロウイルスベクターを製造することにより、糖鎖構造が修飾されたレトロウイルスベクターを得ることができる。前記方法で製造されたレトロウイルスベクターは、特に機能性物質の存在下で高い感染効率を示す。

明 細 書

レトロウイルスベクター産生用細胞

技術分野

- [0001] 本発明は医学、薬学、農林水産学、食品学の分野において、細胞に遺伝子導入して形質転換するために用いるレトロウイルスベクター、前記ベクターを産生するための細胞、ならびに前記ベクターを使用する細胞への遺伝子導入方法に関する。

背景技術

- [0002] 真核生物への遺伝子導入法としては、ウイルスベクターを用いる方法、裸のDNAをエンドサイトーシスや電気穿孔法、遺伝子銃によって導入する技術などが知られている。ウイルスベクターは、遺伝子治療の分野で基礎から臨床まで幅広く利用されている技術であり、例えばアデノウイルスベクターは標的細胞で目的遺伝子を一過性に大量発現させるのに適しており、レトロウイルスベクターは、宿主染色体への安定な組み込み機能により長期安定発現が可能であり、遺伝病の遺伝子治療の分野で期待されているベクターであり、また、トランスジェニック動物作成の分野でも期待されている技術である。しかし、ウイルスベクターは、ウイルス感染を介して遺伝子導入されることからウイルスの指向性が問題となり、レセプターを細胞表面に発現していない細胞には遺伝子導入されない。このような問題を克服するため、レトロウイルスベクターのエンベロープを改変し、シュードタイプ化することによって宿主域を改変する、あるいは力価を上げる努力がなされている。レトロウイルスベクターのシュードタイプ化は、主に従来のレトロウイルスベクター、例えばマウス白血病ウイルス由来のベクターのエンベロープタンパク質を他のウイルス種のエンベロープタンパク質に置き換えることによってなされている。例えば、水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)の外皮糖タンパク質VSV-Gを利用した広範な宿主域に感染可能なレトロウイルスベクター[特許文献1、非特許文献1]や、テナガザル白血病ウイルス(Gibbon ape leukemia virus; GaLV)のエンベロープを利用してヒト造血幹細胞への導入効率を向上させたベクター[特許文献2、非特許文献2]が開発されている。

- [0003] 一方、エンベロープタンパク質のアミノ酸配列を変えることなく、糖タンパク質である

エンベロープの糖鎖修飾のみを改変する試みとして、体液成分によるレトロウイルスベクターの不活化を防止するためにレトロウイルス表面の α (1, 3)ガラクトシルエピトープ (galactosyl epitope)を減少させる技術が検討されている[特許文献3]。ここでは、レトロウイルス産生細胞のガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の破壊、糖鎖合成阻害剤の利用、糖鎖分解酵素の利用等が提案されている。しかしながら、遺伝子破壊は煩雑な作業であり、糖鎖合成阻害剤、糖鎖分解酵素の使用については適切な使用条件の設定が必要である。

- [0004] N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (N-acetylglucosaminyltransferase III; GnT-III) は、糖タンパク質のN-結合型糖鎖にバイセクティング-N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基を転移する酵素である。GnT-IIIをコードするラットおよびヒトの遺伝子はすでにクローニングされている[非特許文献3、非特許文献4]。
- [0005] B型肝炎ウイルスに感染した細胞にGnT-III遺伝子を導入すると前記ウイルスの遺伝子の発現の抑制により、ウイルスの産生が阻害されることが報告されている[非特許文献5]。レトロウイルスに関して、GnT-IIIのウイルス産生への影響、産生されたウイルスの感染効率についての知見はない。
- [0006] 特許文献1: 国際公開第94/29440号パンフレット
特許文献2: 国際公開第94/23048号パンフレット
特許文献3: 国際公開第96/03520号パンフレット
非特許文献1: J. C. Burns、外4名、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第90巻、第8033～8037頁(1993)
非特許文献2: A. D. Miller、外5名、J. Virol.、第65巻、第2220～2224頁(1991)
非特許文献3: A. Nishikawa、外4名、J. Biol. Chem.、第267巻、第18199～18204頁(1992)
非特許文献4: Y. Ihara、外5名、J. Biochem.、第113巻、第692～698頁(1993)
非特許文献5: E. Miyoshi、外5名、J. Biol. Chem.、第270巻、第28311～28315頁(1995)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] レトロウイルスのエンベロープの改変によるシュードタイピングは宿主域の改変や、感染効率の向上、ウイルス粒子の安定性の向上などの効果が期待できるものの、感染効率を向上させうるエンベロープの取得は容易ではない。そこで、我々は、レトロウイルスのエンベロープを改変するのではなく、産生細胞の細胞膜の糖鎖構造を修飾することによるウイルスの感染効率の向上を目指した。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは鋭意研究の結果、N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強された細胞を用いてレトロウイルスベクターを調製した場合に、この細胞から産生されるレトロウイルスベクターはフィブロネクチンのフラグメントのようなレトロウイルス結合活性を有する機能性物質の共存下での遺伝子導入効率が有意に向上することを見出し、本発明を完成させた。
- [0009] 本発明の第1の発明はレトロウイルス由来のgag－pol遺伝子、env遺伝子を有し、かつN－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強された細胞に関する。
- [0010] 第1の発明の細胞としては、レトロウイルス由来のgag－pol遺伝子、env遺伝子が染色体上に組み込まれている細胞、またはレトロウイルス由来のgag－pol遺伝子、env遺伝子を含有するプラスミドで形質転換されている細胞が例示される。
- [0011] 第1の発明において、前記細胞にはN－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子が人為的に導入されていてもよく、例えば、N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子が染色体上に組み込まれている細胞、前記遺伝子を含有するプラスミドで形質転換されている細胞が例示される。ここで、N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子は異種のプロモーターの制御下にあってもよい。
- [0012] さらに、第1の発明の細胞は、例えば293細胞および293T細胞より選択される細胞に由来するものであってもよい。
- [0013] 本発明の第2の発明は、第1の発明の細胞が組換えレトロウイルスベクターで形質転換されてなる、レトロウイルス産生細胞に関する。

- [0014] 本発明の第3の発明は、第2の発明のレトロウイルス産生細胞を培養し、その培養液上清を回収することを特徴とするレトロウイルスベクターの製造方法に関する。
- [0015] 本発明の第4の発明は、第3の発明のレトロウイルスベクターの製造方法により製造されたレトロウイルスベクターに関する。
- [0016] 本発明の第5の発明は、第4の発明のレトロウイルスベクターをレトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下に標的細胞に感染させる工程を包含する、標的細胞への遺伝子導入方法に関する。
- [0017] 第5の発明において、レトロウイルス結合活性を有する機能性物質としてはフィブロネクチンもしくはそのフラグメントが例示される。

発明の効果

- [0018] 本発明によれば、レトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下で高い遺伝子導入効率を示す組換えレトロウイルスベクターが提供される。前記ベクターを使用することにより、標的細胞に高い効率で目的の遺伝子を安定に導入することができる。レトロウイルスベクターは、遺伝病に限らない種々の疾患の治療に使用することができることから、本願発明は広く医療分野において有用である。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図2]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図3]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図4]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図5]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図6]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図7]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図8]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図9]各種クローン由来ウイルスによる遺伝子導入効率を示す図である。
- [図10]293Tおよび293T/hG3-1株由来アンフォトロピックレトロウイルスによる各種感染方法における遺伝子導入効率を示す図である。
- [図11]293Tおよび293T/hG3-1株由来アンフォトロピックレトロウイルスによる各

種感染方法における遺伝子導入効率を示す図である。

[図12]293Tおよび293T/hG3-1株由来アンフトロピックレトロウイルスによる各種感染方法における遺伝子導入効率を示す図である。

[図13]293Tおよび293T/hG3-1株由来エクトロピックレトロウイルスによる各種感染方法における遺伝子導入効率を示す図である。

[図14]293Tおよび293T/hG3-1株由来エクトロピックレトロウイルスによる各種感染方法における遺伝子導入効率を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0020] 本発明には、通常、組換えレトロウイルスベクターが使用され、特に、複製能欠損組換えレトロウイルスベクターが好適である。該ベクターは感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させてあり、非病原性である。これらのベクターは脊椎動物細胞、特に、哺乳動物細胞のような宿主細胞に侵入し、その染色体DNA中に、ベクターに挿入された外来遺伝子を安定に組み込むことができる。
- [0021] 前記の外来遺伝子には特に限定はなく、目的の細胞で発現させることが望まれる任意の遺伝子を挿入することができ、ポリペプチド(酵素、成長因子、サイトカイン、レセプター、構造タンパク質等)、アンチセンスRNA、リボザイム、デコイ、RNA干渉を起こすRNA等をコードする遺伝子が例示される。本発明では、前記の外来遺伝子は適当なプロモーター、例えば、レトロウイルスベクター中に存在するLTRのプロモーターや外来プロモーターにより発現が制御されるよう、組換えレトロウイルスベクター内に挿入して使用することができる。また、外来遺伝子の転写を達成するためにはプロモーターおよび転写開始部位と共同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列がベクター内に存在していてもよい。さらに、好ましくは、導入された遺伝子はその下流にターミネーター配列を含有することができる。さらに、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子(例えば薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、 β -ガラクトシダーゼやルシフェラーゼのようなレポーターとして機能しうる酵素をコードする遺伝子等)を有していてもよい。
- [0022] 本発明に使用される組換えレトロウイルスベクター(組換えレトロウイルスベクター、本明細書では組換えレトロウイルスと記載することがある)にも限定はなく、公知のレト

ロウイルスベクター、例えばMFGベクターや α -SGCベクター(国際公開第92/07943号パンフレット)、pBabe[Nucleic Acids Research、第18巻、第3587～3596頁(1990)]、pLXIN(クロンテック社製)、pDON-AI(タカラバイオ社製)等のレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター[ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来ベクター、サル免疫不全ウイルス(SIV)由来ベクター等]あるいはこれらを改変したベクターを使用することができる。

[0023] 本発明のレトロウイルスベクターはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(以下、GnT-IIIと記載する)の作用によって糖鎖修飾を受けたレトロウイルスベクターである。レトロウイルス粒子表面の糖鎖修飾はレトロウイルス産生細胞において行われる。当該レトロウイルス産生細胞は、レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、かつN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子活性が增強された細胞をレトロウイルスベクター、または前記ベクターに対応するレトロウイルスベクタープラスミドで形質転換することにより作製される。

[0024] 一般的なレトロウイルスベクターの産生方法としては、あらかじめレトロウイルスの構造タンパク質をコードするgag-pol遺伝子とenv遺伝子を導入されたレトロウイルスパッケージング細胞に、外来遺伝子を搭載しパッケージングシグナルを有する組換えレトロウイルスベクタープラスミドを導入することによって産生させる方法と、レトロウイルスの構造タンパク質を有さない通常の細胞にgag-pol、env遺伝子の発現ベクタープラスミドと同時に、外来遺伝子を搭載しパッケージングシグナルを有する組換えレトロウイルスベクタープラスミドをトランスフェクションして産生させる方法とが挙げられる。本発明には前記のいずれの方法も使用することができる。

[0025] 前者の場合、効率の良い方法を選択して組換えレトロウイルスベクタープラスミドのトランスフェクションを行えば一過性にウイルスベクターを産生させることが可能であり、また長期安定発現株を樹立してレトロウイルス産生細胞株を取得することも可能である。この方法には、公知のパッケージング細胞株、例えばPG13(ATCC CRL-10686)、PA317(ATCC CRL-9078)、GP+E-86やGP+envAm-12(米国特許第5,278,056号)、Psi-Crip[Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第85巻、第6460～6464頁(1988)]等の細胞株を使用することができる。

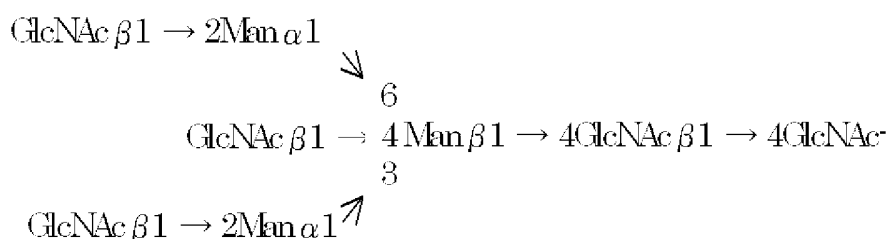
- [0026] 後者の場合、ほとんどの場合が一過性のウイルス産生を目的としており、力価の高いウイルスを得るには、より高いトランスフェクション効率が要求される。例えば、トランスフェクション効率の高い293細胞や293T細胞を宿主に用いることが多い。
- [0027] 自己複製可能レトロウイルス粒子の出現を防止する観点からは、本発明に使用される細胞ではgag-pol遺伝子とenv遺伝子は近接して存在しないことが好ましい。例えば、gag-pol遺伝子とenv遺伝子が染色体上の異なる位置に組み込まれた細胞や、gag-pol遺伝子を含有するプラスミドとenv遺伝子を含有する異なるプラスミドの両者が導入された細胞が本発明には好適である。
- [0028] また、env遺伝子は産生しようとするレトロウイルスベクターと同じウイルス由来のエンベロープタンパク質をコードするものに限定されるものではなく、異種ウイルス由来のenv遺伝子を有する、シュードタイプ (pseudotyped) パッケージングのための細胞も本発明に包含される。前記のenv遺伝子としては、例えばモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、ネコ内在性ウイルス (feline endogenous virus) 由来のenv遺伝子やenvとして機能するタンパク質をコードする遺伝子を使用することができる。
- [0029] なお、本発明はレトロウイルスベクターを産生する細胞に限定されるものではない。組換えレトロウイルスベクターのゲノムとなる、パッケージングシグナルを有するDNA (トランスファーベクター) を有していない細胞であっても、前記DNAを導入することによりレトロウイルスベクターを産生することができるものであれば本発明の細胞に包含される。
- [0030] 本願発明においては、レトロウイルスを産生する細胞においてGnT-III活性を増強させることにより、ウイルス表面タンパク質の糖鎖が修飾されたレトロウイルスベクターが作製される。
- [0031] ここで、GnT-III活性の増強とは、細胞におけるGnT-IIIの酵素活性がその通常の量に比較して増加していることを意味する。特に本発明を限定するものではないが、本発明にレトロウイルス産生細胞として使用される細胞のGnT-III活性は、当該細胞の本来のGnT-III活性に比較して5倍以上、好ましくは10倍以上高いGnT-III活性を有している。GnT-IIIの酵素活性の増加は、例えばGnT-III活性を測定す

るか、あるいはGnT-IIIをコードする遺伝子より転写されるmRNA量を公知の方法、例えばRT-PCR法やノーザンハイブリダイゼーション等によって測定することにより確認することができる。

- [0032] GnT-III活性の増強は、染色体上のGnT-IIIをコードする遺伝子の発現誘導の他、染色体上のGnT-III遺伝子の改変(コピー数の増加やプロモーター、エンハンサー等の挿入)、GnT-III遺伝子の細胞への導入、細胞の変異処理によるGnT-II I遺伝子高発現株の取得等、公知の手法により達成されうる。
- [0033] ヒトGnT-IIIをコードする遺伝子の構造は公知であり[J. Biochem.、第113巻、第692～698頁(1993)]、この情報をもとに染色体上のGnT-III遺伝子の改変を行うことができる。例えば、レトロウイルス産生細胞として使用される細胞における、GnT-IIIをコードする遺伝子の位置を決定し、該遺伝子の上流に天然において該遺伝子の上流に存在して該遺伝子の発現を制御しているものとは異なる異種のプロモーター、例えば強力なプロモーターや誘導可能なプロモーターを挿入し、当該遺伝子の発現量を増加させることができる。また、本願実施例に記載された、人為的にGnT-IIIをコードする遺伝子を細胞に導入する方法によれば、より簡便にGnT-III活性の増強された細胞を取得することができる。
- [0034] GnT-IIIをコードする遺伝子の細胞への導入は、前記遺伝子をベクターに挿入して宿主に導入し、実施することができる。ベクターは公知のものから適切なものを選択すればよく、例えばプラスミドベクター、ウイルスベクター等を使用することができる。プラスミドベクターを使用する場合、例えば通常のトランスフェクション法(リン酸カルシウム法やカチオニックリポソーム法など)で細胞への導入を実施することができる。さらに、導入されたGnT-IIIをコードする遺伝子が細胞の染色体DNA上に組み込まれるような手法を用いてもよい。なお、本発明において、レトロウイルス産生細胞におけるGnT-IIIの発現は一過性発現でも、安定発現でもよい。
- [0035] レトロウイルスエンベロープタンパク質のN末には膜移行シグナルがあり、エンベロープタンパク質は細胞内で糖鎖が付加された後、タンパク質分解酵素によってTMタンパク質とSUタンパク質に切断され、多量体を形成して細胞膜表面に発現されると考えられている。細胞膜直下ではgag-pol融合タンパク質やgagタンパク質がカプ

シドを形成し、ゲノムRNAを取り込んでアッセンブリーを完了し、細胞から出芽する。このときレトロウイルスは宿主細胞の脂質二重膜を纏った形で出芽する。糖転移酵素を高発現する細胞から産生されるレトロウイルスは、ウイルス粒子の表面タンパク質が糖鎖修飾を受けていることが期待できる。従って、特に本発明の限定を意味するものではないが、ウイルス産生細胞のGnT-III活性が増強されている場合には細胞由来の膜タンパク質、ウイルスのエンベロープタンパク質にはGnT-IIIの作用によって生成する、下記式(化1)に示すバイセクティング-GlcNAc構造を有する糖鎖が付加されることが考えられる。あるいは、オリゴマンノース型やハイブリッド型の糖鎖修飾の割合が増加することも考えられる。

[0036] [化1]



[0037] GnT-IIIで糖鎖を修飾されたレトロウイルスは、例えばレトロウイルス産生細胞にGnT-III発現ベクタープラスミドを導入してGnT-III安定発現株を得、その培養上清から得ることが可能である。また、293細胞、293T細胞などにGnT-III発現ベクタープラスミドを導入してGnT-III安定発現株を得、このGnT-III導入293細胞、293T細胞などにgag-pol、env遺伝子の発現ベクタープラスミドと外来遺伝子を搭載しパッケージングシグナルを有する組換えレトロウイルスベクタープラスミドを同時にトランスフェクションし、GnT-III修飾レトロウイルスを得ることが可能である。あるいは、293細胞、293T細胞などにGnT-III発現ベクタープラスミドとgag-pol、env遺伝子の発現ベクタープラスミドと外来遺伝子を搭載しパッケージングシグナルを有する組換えレトロウイルスベクタープラスミドを同時にトランスフェクションし、GnT-III修飾レトロウイルスを得ることが可能である。このようにして得られたレトロウイルスベクターは0.45 μmフィルターでろ過して、使用するまで超低温フリーザーで保存が可能である。

- [0038] 本発明の方法により、GnT-III活性が増強された細胞から調製された組換えレトロウイルスは、特にレトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下に実施される遺伝子導入において優れた感染効率を示す。
- [0039] レトロウイルス結合活性を有する機能性物質を使用する遺伝子導入方法は、例えば国際公開第95/26200号パンフレット、国際公開第97/18318号パンフレット、Nature Medicine、第2巻、第876～882頁(1996)等に記載されている。当該方法には、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位の両方を同一分子上に有する機能性物質を使用する方法、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と標的細胞結合部位とを有する機能性物質との混合物を使用する方法とがあるが、本発明の方法により調製されたレトロウイルスはいずれの方法にも使用することができる。
- [0040] 上記の機能性物質は、レトロウイルス結合活性および／または標的細胞結合活性を有するものであれば特に限定はない。例えば、フィブロネクチン由来のヘパリン結合ドメイン(ヘパリン-IIドメイン)、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲンのフラグメント、前記のポリペプチドの誘導体や改変体、ポリリジン、DEAEデキストランなどがレトロウイルス結合活性を有する機能性物質として例示される。また、標的細胞結合活性を有する機能性物質には、所望の標的細胞に結合する能力を有する任意の物質を使用することができる。特に本発明を限定するものではないが、例えば、細胞結合活性を有するポリペプチド(細胞骨格タンパク質等)、細胞もしくは細胞表面の生体分子を認識する抗体、成長因子、サイトカイン、糖鎖等が標的細胞結合活性を有する機能性物質として例示される。
- [0041] 本発明の態様の1つとして、フィブロネクチン由来のヘパリン結合ドメインを含有する機能性物質の存在下に、前記のGnT-III活性が増強された細胞から調製された組換えレトロウイルスを標的細胞に感染させる、標的細胞への遺伝子導入方法が挙げられる。前記機能性物質は、好適には、細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインの両者を有するフィブロネクチンフラグメントが例示される。前記細胞接着ドメインとしては、VLA-5および／またはVLA-4に結合する細胞接着ドメインが特に好適である。前記のフィブロネクチンフラグメントは、生体より精製されたフィブロネクチンからプロテアーゼ消化などの手段で調製することができ、また、組換えDNA技術により作製

することができる。例えば、レトロネクチンとしてタカラバイオ社から発売されている組換えフィブロネクチンフラグメントは、ヘパリン結合ドメイン、VLA-5結合ドメイン、VLA-4結合ドメインを有しており、本発明に好適である。

実施例

[0042] 以下に実施例により、さらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲内に限定されるものではない。

[0043] 実施例1

ヒトGnT-III発現プラスミドベクターの構築

ヒトGnT-IIIをコードするDNA (GenBank E13194、配列番号1)を含むDNA断片を調製し、遺伝子発現用プラスミドベクターpTriEx-3 Hygro (ノヴァジェン社製)のNcoIサイト-Sse8387Iサイト間に挿入した組換えプラスミドを作製した。この組換えプラスミドをphG3-Hygroと命名した。

[0044] このプラスミドを用いて大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体1コロニーを5mlのLB培地中で37℃にて8時間振とう培養した。その後、80mlのLB培地で拡大培養し、QIA filter Plasmid Maxi Kit (キアゲン社製)を用いてプラスミドDNAを精製した。

[0045] 実施例2

1. 293T細胞導入クローンの単離

ヒト293T細胞[Mol. Cell Biol.、第7巻、第379～387頁(1987)]の培養は、10%ウシ胎仔血清(JRH社製)を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、シグマ社製)を増殖培地とし、37℃、5%CO₂の条件下で行った。組織培養用6cm径プレート(岩城硝子社製)に、1プレートあたり3×10⁶個のヒト293T細胞を播種して一晩培養した。翌日、ヒト293T細胞がセミコンフルエントであることを確認し、培地を吸引除去し、あらたに1プレートあたり3mlの増殖培地を添加した。

[0046] ポリスチレン製丸底チューブ(ファルコン社製)にphG3-Hygro 10 μgと2M CaCl₂ 62 μlを入れて滅菌蒸留水を加えて500 μlとし、さらにトランスフェクションバッファー(50mM HEPES、10mM KCl、12mM D-Glucose、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、pH 7.10)500 μlを添加後ただちに電動ピペッターの排

出を利用して20秒間バブリングした。こうして調製した溶液を上記の293T細胞のプレートに均一に滴下した。対照としてpTriEx-3 Hygro(Mock)を同様の操作で導入した293T細胞を調製した。これらの細胞を37℃、5%CO₂で9時間培養した後、培養上清を吸引除去し、あらたに1プレートあたり4mlの増殖培地を添加し、37℃、5%CO₂にて培養した。遺伝子導入操作より2日後、各ヒト293T細胞をトリプシン(ギブコ社製)処理でプレートから剥がし、10mlの増殖培地に懸濁後、細胞数を計数して組織培養用10cm径プレート(岩城硝子社製)に1プレートあたり 6×10^6 個、 4×10^6 個、 2×10^6 個で播種し、37℃、5%CO₂で培養した。翌日からハイグロマイシン(インビトロジェン社製)を0.3mg/ml含有する増殖培地で培養した。

[0047] ハイグロマイシン選択培地で3～4日毎に培地交換しながら16日間培養後、出現したハイグロマイシン耐性コロニーをクローニングリング(岩城硝子社製)でクローニングし、48ウェルの組織培養用プレート(岩城硝子社製)の1ウェルに播種した。クローン化した各ヒト293T細胞は、増殖速度に合わせて24ウェルの組織培養用プレート(岩城硝子社製)、6cm径プレート、10cm径プレートへと継代しながら培養を続け、最終的にMock導入(すなわち対照としてのpTriEx-3 Hygroを導入した)ヒト293T細胞(293T/M)を10クローン、pHG3-Hygroを導入したヒト293T細胞(293T/hG3)を20クローン得た。

[0048] 2. 発現確認

上記1にて得られた293T/hG3の各クローン 1×10^7 個よりTRIzol(インビトロジェン社製)を用いてtotal RNAを抽出した。これを鋳型として下記の操作によりcDNA合成反応を行った。5U/ μ l AMV Reverse Transcriptase XL(ライフサイエンス社製)1 μ l、10×RNA PCRバッファー(タカラバイオ社製)2 μ l、40U/ μ l RNase Inhibitor 0.5 μ l、50pmol/ μ l Random 9mers 1 μ l、各10mM dNTP混合液 2 μ l、25mM MgCl₂ 4 μ l、1 μ g相当の鋳型 1 μ lを混合し、RNase free蒸留水で20 μ lにメスアップして調製した反応液を30℃で10分、42℃で30分、99℃で5分、4℃で5分反応させた。反応後、この反応液1 μ lを鋳型としてヒトGnT-III遺伝子特異的プライマー対(hG3-F1、hG3-R4;配列番号2、3にそれぞれhG3-F1、hG3-R4の塩基配列を示す)を使用したPCR反応により、ヒトGnT-

III遺伝子の検出を行った。反応は、94℃で5分間反応後、94℃で30秒間、56℃で30秒間、72℃で30秒間のサイクルを30サイクル行い、最後に72℃で7分間反応した。陽性コントロールとしてphG3-Hygroを用い、陰性コントロールには293T/Mクローンから上記と同様に調製したRT-PCR産物1 μ lを用いた。PCR反応後、反応液8 μ lを2%アガロースゲル電気泳動に供し、増幅断片を確認した。その結果、陰性コントロールでもヒトGnT-III遺伝子由来の断片の増幅が確認されたが、293T/hG3クローンから調製した鋳型を用いた場合、陰性コントロールよりも増幅産物量が増加しており、上記1で単離した293T/hG3クローンではphG3-Hygro由来のヒトGnT-IIIが発現されていることが示された。

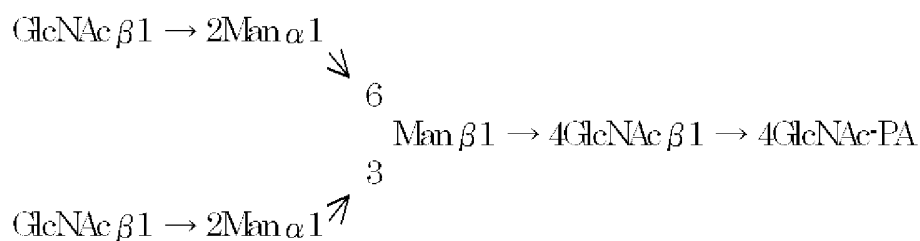
[0049] 3. GnT-III酵素活性の定量

上記1にて得られた293T/hG3の2クローン(293T/hG3-1株および293T/hG3-67株)、293T/Mの2クローン(293T/M2株および293T/M3株)、293T細胞をそれぞれ $10^6 \sim 10^7$ 個回収し、PBSにて洗浄後、遠心分離にて得た沈殿に100 μ lのCellLyticTM M Cell Lysis Reagent(シグマ社製)を加え、室温で15分間攪拌した。20400 $\times$ g、15分間の遠心分離後上清を回収してGnT-III粗酵素液とし、活性測定を行った。粗酵素液の一部は、BCA Protein Assay Reagent kit(ピアス社製)を用いてタンパク質定量を行った。

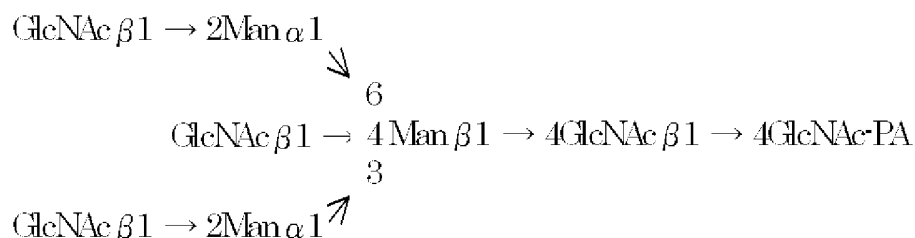
[0050] 3 μ lのGnT-III粗酵素液、5 μ lの2 $\times$ 緩衝液[250mM MES-NaOH (pH 6.25)、200mM MnCl_2 、400mM N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、1.0% Triton X-100]、1 μ lの0.2M UDP-GlcNAc、1 μ lの385pmol/ μ l Gn, Gn-bi-PA[タカラバイオ社製、PA-Sugar Chain O12、下記式(化2)にその構造を示す]を混合し、37℃で2時間反応させた。反応後、10 μ lの反応停止液[2% sodium tetraborate、250mM EDTA]を加え、98℃で5分間加熱して酵素を失活させ、20400 $\times$ g、3分間遠心分離して上清を得た。その上清10 μ lをHPLCにより分析した。カラムはPALPAK TypeR(CA8000:4.6mm ϕ $\times$ 250mm、タカラバイオ社製)、溶離液は0.5% 1-ブタノールを含有する100mM酢酸トリエチルアミン緩衝液(pH 4.0)を使用し、カラム温度は40℃、流速は1.0ml/分に設定した。検出には蛍光検出器を使用し、励起波長を320nm、検出波長を400nmに設定した。

。この条件でGn, Gn-bi-PA糖鎖は9.6分に、Gn(Gn)Gn-bi-PA糖鎖は18.1分に溶出された。GnT-IIIの活性はGn(Gn)Gn-bi-PA[下記式(化3)にその構造を示す]の生成量と先に定量した粗酵素液のタンパク量に基づいて算出したGnT-IIIの比活性から判定した。その結果、293T細胞の活性を1.0としたGnT-IIの活性は、293T/M2株で2.4、293T/M3株で1.0、293T/hG3-1株で32.2、293T/hG3-67株で59.3であった。このことから、293T/hG3クローンではphG3-Hygro由来のヒトGnT-III遺伝子のため、GnT-III酵素活性が増強されていることが示された。

[0051] [化2]



[0052] [化3]



[0053] 実施例3

293T/hG3クローンからのウイルス調製

1. ウイルス液の調製

上記実施例2で単離した293T/hG3クローンのうち、GnT-III遺伝子の発現が確認された7クローンを選択し、アンフォトロピックレトロウイルス液を調製した。対照実験として293T細胞と293T/Mの2クローンについても同様の操作を行った。6ウェルの組織培養用プレート(岩城硝子社製)の1ウェルあたり上記の各細胞クローンのそれぞれを 1.5×10^6 個ずつ播種し、2mlの10%ウシ胎仔血清を含有するDMEM中、37℃、5%CO₂にて一晩培養した。翌日、各細胞クローンがセミコンフルエントであ

ることを確認し、各ウェルの培地を吸引除去し、あらたに1ウェルあたり10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを1.5ml添加した。更にクロロキン(和光純薬社製)を終濃度 $25\mu\text{M}$ となるように各ウェルに加えた。ポリスチレン製丸底チューブ内にてレトロウイルスの構成タンパク質gag-polを発現させるベクター、pGP プラスミドベクター(タカラバイオ社製)を $27.5\mu\text{g}$ と、同じくアンフォトロピックenvを発現させるためのpE-amphoプラスミドベクター(タカラバイオ社製)を $27.5\mu\text{g}$ 、レトロウイルスベクタープラスミドpDON-AI(タカラバイオ社製)にプラスミドpQBI25(Quantum Biotechnologies Inc. 社製)に挿入されているクラゲ由来の蛍光タンパク質(Red-shift Green Fluorescent Protein:rsGFP)遺伝子を挿入したレトロウイルス産生用プラスミドベクターを $55\mu\text{g}$ 、 2M CaCl_2 $341\mu\text{l}$ をあわせて滅菌蒸留水で $2750\mu\text{l}$ に調製し、これを $1300\mu\text{l}$ ずつ2本に分けた。1本のチューブにつきトランスフェクションバッファ- $1300\mu\text{l}$ を添加後ただちに電動ピペッターの排出を利用して20秒間バブリングし、各ウェルに $500\mu\text{l}$ ずつ均一に滴下した。このプレートを 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ にて9時間培養した後、培養上清1.5mlを除去し、あらたに1ウェルあたり2mlの10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを添加して培養を続けた。遺伝子導入操作より24時間後、各ウェルの培地を新鮮な10%ウシ胎仔血清を含有するDMEM 2mlと交換し、更に24時間培養した後、培養上清を採取し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルター(ミリポア社製)でろ過してウイルス上清液ストックとし、使用するまでは -80°C で保存した。

[0054] 2. ウイルス上清液の力価の測定

ウイルス上清液の力価の測定はNIH/3T3細胞(ATCC CRL-1658)を使用して標準的な方法[J. Virol.、第62巻、第1120～1124頁(1988年)]に従って測定した。すなわち、6ウェルの組織培養用プレートに1ウェルあたり 5×10^4 個のNIH/3T3細胞を含む10%ウシ血清(ギブコ社製)を含有するDMEM 2mlを添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ にて一晩培養した後、培地を吸引除去し、各ウェルに系列希釈したウイルス上清液1mlを加え、更にヘキサジメトリン・ブロミド(ポリブレン:アルドリッチ社製)を終濃度 $8\mu\text{g/ml}$ となるように加えた。これを 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で4～6時間培養し、更に10%ウシ血清を含有するDMEMを1ml添加して72時間培養した。このプレートより回収した細胞をフローサイトメーターFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン

社製)による解析に供し、rsGFP発現NIH/3T3細胞の割合を測定した。ウェルあたりの仕込み細胞数にrsGFP発現細胞の割合とウイルス上清液の希釈倍率を乗じた値より、上清1mlあたりの感染性粒子数(I.V.P./ml)を算出し、ウイルス力価とした。ウイルス調製を数回行い、ウイルス力価を測定したところ、293T/hG3クローン由来のウイルス液の力価は 1.9×10^5 I.V.P./mlから 2.8×10^6 I.V.P./mlの範囲であり、対照実験として用いた293T細胞由来のウイルス液の力価は 9.4×10^5 I.V.P./mlから 1.6×10^6 I.V.P./ml、293T/Mクローン由来のウイルス液力価は 1.8×10^6 I.V.P./mlから 2.6×10^6 I.V.P./mlの範囲であった。

[0055] 実施例4

1. CH-296コートプレートの作製

表面未処理24ウェルプレート(ファルコン社製)に1ウェルあたり500 μ lの32 μ g/mlのフィブロネクチンフラグメントであるCH-296(レトロネクチン;タカラバイオ社製)を添加して4℃で一晩放置した後、2%BSA/PBSで室温にて30分間ブロッキングし、さらにPBSで洗浄した。このプレートをCH-296コートプレートとし、必要に応じて作製した。

[0056] 2. NIH/3T3細胞への遺伝子導入

NIH/3T3細胞への遺伝子導入に使用したウイルスは、実施例3で調製したウイルス液のうち、ヒトGnT-III修飾ウイルスとして293T/hG3-1株および293T/hG3-67株より調製したウイルスを選択した。対照として293T細胞より調製したウイルス、及びMockウイルスとして293T/M2株より調製したウイルス1種を選択した。これらウイルスを用いて、上記のCH-296コートプレートを用いてNIH/3T3細胞へ感染させ、ヒトGnT-III遺伝子が導入された細胞から調製されたレトロウイルスの感染性の変化を以下に示す操作によって調べた。

[0057] 10cm径プレートでセミコンフルエントに生育したNIH/3T3細胞を、トリプシン処理でプレートから剥がし、10mlの10%ウシ血清を含有するDMEMに懸濁後、190 $\times$ g、3分遠心して細胞を集め、生細胞数を計数して10%ウシ血清を含有するDMEMにて 2×10^5 個/mlに調製した。また、実施例3で得られた各ウイルス液を10%ウシ胎仔血清(JRH社製)含有のDMEMで希釈し、 2×10^4 I.V.P./mlに調製した。C

H-296コートプレートの1ウェルに上記のNIH/3T3細胞液 100 μ l、希釈ウイルス液 200 μ l、10%ウシ血清を含有するDMEM 200 μ lを添加し、3日間37℃、5%CO₂で培養した。3日後のNIH/3T3細胞をフローサイトメーターFACS Vantageによる解析に供し、rsGFP発現NIH/3T3細胞の割合を測定し遺伝子導入効率とした。CH-296コートプレートを用いた感染の対照実験として組織培養用24ウェルプレートに1ウェルあたり 2×10^4 個のNIH/3T3細胞を含む10%ウシ血清を含有するDMEM 500 μ lを添加し、37℃、5%CO₂にて一晩培養した後、培地を吸引除去し、各ウェルに上記で調製した 2×10^4 I.V.P./mlのウイルス液200 μ lと10%ウシ血清を含有するDMEM 300 μ lを加え、更にポリブレンを終濃度8 μ g/mlとなるように加えた。これを37℃、5%CO₂で3日間培養し、3日後のNIH/3T3細胞をフローサイトメーターFACS Vantageに供し、rsGFP発現NIH/3T3細胞の割合を測定した。

- [0058] 上記の実験の結果を図1に示す。図中、横軸にはウイルス液が調製された細胞が記載されており、(Pb)はポリブレン存在下に感染が実施された群を、(RN)はCH-296コートプレートで感染が実施された群をそれぞれ示す。縦軸は遺伝子導入効率(%)を示す。
- [0059] ポリブレンを用いて感染させた対照実験の場合、rsGFP発現NIH/3T3細胞の割合は各ウイルス間ではほぼ同等であったが、CH-296コートプレートを用いた場合、ヒトGnT-III修飾ウイルスを感染させたNIH/3T3細胞ではrsGFP発現細胞の割合が非修飾ウイルス感染NIH/3T3細胞に対して1.7~2.2倍に上昇した(図1)。これは、CH-296コートプレートを用いた場合、ヒトGnT-IIIによって膜表面が修飾されたレトロウイルスではその感染性が向上することを示すものである。

[0060] 3. 血球系細胞への遺伝子導入

ヒトK562細胞(ATCC CCL-243)は10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI-1640(シグマ社製)を増殖培地とし、37℃、5%CO₂の条件下で培養を行った。また、ヒトTF-1細胞(ATCC CRL-2003)は10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI-1640を増殖培地とし、終濃度2ng/mlの顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF:シェリング・プラウ社製)存在下のもと、37℃、5%CO₂の条件下で培養を

行った。実施例3で調製したウイルス液を上記2に記載の方法でCH-296コートプレートを用いてM.O.I. (multiplicity of infection) = 0.2の条件で感染させた。細胞の調製、ウイルスの希釈には各細胞の増殖培地を用いた。感染から3日後の各細胞をフローサイトメーターFACS Vantageに供し、rsGFP発現各細胞の割合を測定した。この結果を図2、3に示す。図2はK562細胞、図3はTF-1細胞についての結果を示しており、図中、横軸にはウイルス液が調製されたクローン名が記載されている。縦軸は遺伝子導入効率(%)を示す。

[0061] ヒトGnT-III修飾ウイルスを感染させたK562、及びTF-1細胞ではrsGFP発現細胞の割合が非修飾ウイルス感染K562、及びTF-1細胞に対して1.5～1.7倍に上昇した。

[0062] 4. 各種細胞への遺伝子導入

HT1080細胞(ATCC CCL-121)、293細胞(ATCC CRL-1573)、A375M細胞[Cancer Lett.、第38巻、第137～147頁(1987)]、KB細胞(ATCC CCL-17)、MDA-MB-435S細胞(ATCC HTB-129)は10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを増殖培地とし、MKN1細胞(BRC RCB1003)は10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI-1640を増殖培地として37℃、5%CO₂の条件下で培養を行った。実施例3で調製したウイルス液のうち、ヒトGnT-III修飾ウイルスとして293T/hG3-1より調製したウイルス、対照として293T及び293T/M2より調製したウイルスを用い、上記2と同様にM.O.I.=0.2の条件で、ポリブレンあるいはCH-296コートプレートを用いて各種細胞へ感染させた。感染から3日後の各細胞をフローサイトメーターFACS Vantageに供し、rsGFP発現各細胞の割合を測定した。この結果を図4～9に示す。図4～9にはそれぞれHT1080細胞、293細胞、A375M細胞、KB細胞、MDA-MB-435S細胞、MKN1細胞での結果が示されている。図中、横軸にはウイルス液が調製されたクローン名が記載されており、(Pb)はポリブレン存在下に感染が実施された群を、(RN)はCH-296コートプレートで感染が実施された群をそれぞれ示す。縦軸は遺伝子導入効率(%)を示す。

[0063] ヒトGnT-III修飾ウイルスを感染させた各細胞ではrsGFP発現細胞の割合が非修飾ウイルス感染各細胞に対して上昇した。

[0064] 実施例5

293T/hG3クローンからのウイルス調製と標的細胞への遺伝子導入

1. ウイルス液の調製

実施例2で単離した293T/hG3クローンのうち、発現の確認されたものから293T/hG3-1株を選択し、アンフォトロピックレトロウイルス液、およびエコトロピックレトロウイルス液を調製した。対照実験として293T細胞についても同様の操作を行った。組織培養用6センチ径プレート(岩城硝子社製)に 3×10^6 個の293Tあるいは293T/hG3クローンを播種し、4mlの10%ウシ胎仔血清を含有するDMEM中で、37℃、5%CO₂にて一晚培養した。翌日、293Tおよび293T/hG3クローンがセミコンフルエントであることを確認し、各プレートの10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを吸引除去し、あらたに1プレートあたり10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを3ml添加した。更にクロロキン(和光純薬社製)を終濃度25 μMとなるように各プレートに加えた。アンフォトロピックレトロウイルス調製用にポリスチレン製丸底チューブを2本用意し、各チューブ内にてpGPプラスミドベクター(タカラバイオ社製)を5 μgと、アンフォトロピックenvを発現させるためのpE-amphoプラスミドベクター(タカラバイオ社製)を5 μg、レトロウイルスベクタープラスミドpDON-AI(タカラバイオ社製)にrsgfp遺伝子を搭載したレトロウイルス産生用プラスミドベクターを10 μg、2M CaCl₂ 62 μlをあわせて滅菌蒸留水で500 μlに調製した。同様に、エコトロピックレトロウイルス調製用にポリスチレン製丸底チューブを2本用意し、各チューブ内にてpGPプラスミドベクターを5 μgと、エコトロピックenvを発現させるためのpE-ecoプラスミドベクター(タカラバイオ社製)を5 μg、レトロウイルスベクタープラスミドpDON-AIにrsgfp遺伝子を搭載したレトロウイルス産生用プラスミドベクターを10 μg、2M CaCl₂ 62 μlをあわせて滅菌蒸留水で500 μlに調製した。1本のチューブにつきトランスフェクションバッファー500 μlを添加後ただちに電動ピペッターの排出を利用して20秒間バブリングし、各プレートに1mlずつ均一に滴下した。これを37℃、5%CO₂にて9時間培養し、9時間後、培養上清3mlを除去し、あらたに1プレートあたり4mlの10%ウシ胎仔血清を含有するDMEMを添加し、37℃、5%CO₂にて培養した。遺伝子導入操作より24時間後、各プレートの培地を新鮮な10%ウシ胎仔血清を含有するDME

M 4mlと交換し、37℃、5%CO₂にて更に24時間培養した後、培養上清を0.45 μmのフィルター(ミリポア社製)でろ過してウイルス上清液ストックとし、使用するまでは-80℃で保存した。

[0065] 2. ウイルス上清液の力価の測定

ウイルス上清液の力価の測定はNIH/3T3細胞を使用し、実施例3の2. ウイルス上清液の力価の測定に準じて行った。アンフォトロピックレトロウイルスの力価は、293T/hG3クローン由来のウイルス液が 1.9×10^6 I.V.P./ml、対照実験として用いた293T細胞由来のウイルス液が 1.1×10^6 I.V.P./ml、エコトロピックレトロウイルスの力価は、293T/hG3クローン由来のウイルス液が 3.7×10^6 I.V.P./ml、対照実験として用いた293T細胞由来のウイルス液が 6.0×10^6 I.V.P./mlであった。

[0066] 3. ヒトGnT-III修飾アンフォトロピックレトロウイルスを利用した遺伝子導入

上記実施例5の1で調製したウイルス液のうち、293T/hG3-1株で調製されたヒトGnT-III修飾アンフォトロピックレトロウイルスと、対照として293T細胞より調製されたアンフォトロピックレトロウイルスを用い、NIH/3T3細胞への遺伝子導入をポリブレン(Pb)法及びCH-296コートプレートを用いたSupernatant (SN)法を用いてM.O.I.=0.2の条件で行った。また、HT1080細胞、K562細胞へは、同じくPb法及びSN法と、CH-296コートプレートを用いたBound virus (BV)法の3種で行った。HT1080細胞については各種方法でM.O.I.=0.2の条件で感染させ、K562細胞へはM.O.I.=2.0の条件で感染させた。Pb法、SN法は、それぞれ実施例4の2記載の方法に従って行った。BV法はウイルス液を10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI-1640を用いてHT1080細胞への感染用に 8×10^3 I.V.P./ml、K562細胞への感染用に 8×10^4 I.V.P./mlに調製し、CH-296コートプレートの1ウェルに500 μlずつ添加した後、そのプレートを37℃、5%CO₂インキュベーターにて4時間静置してCH-296へのウイルスの吸着を促し、4時間後、ウイルス上清を除去して1ウェル0.5mlずつの1×PBSで洗浄後、 4×10^4 /mlに調製した各細胞を1ウェルに500 μlずつ添加して感染させた。これを37℃、5%CO₂で3日間培養し、3日後の各細胞をフローサイトメーターFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)に供し、GFP発現各細胞の割合を測定した。この結果を図10~12に示す。図10~12はそれ

ぞれNIH/3T3細胞、HT1080細胞、K562細胞での結果が示されている。図中、横軸には感染方法が示されており、Pbはポリブレン存在下に感染が実施された群を、SNはCH-296コートプレートでSupernatant法を用いて感染が実施された群を示し、BVはCH-296コートプレートでBound virus法で感染が実施された群をそれぞれ示す。縦軸は遺伝子導入効率(%)を示す。

ヒトGnT-III修飾ウイルスを感染させた各細胞では、CH-296存在下でrsGFP発現細胞の割合が非修飾ウイルス感染各細胞に対して上昇した。

[0067] 4. ヒトGnT-III修飾エクトロピックレトロウイルスを利用した遺伝子導入

上記実施例5の1で調製したウイルス液のうち、293T/hG3-1株で調製されたヒトGnT-III修飾エクトロピックレトロウイルスと、対照として293T細胞より調製されたエクトロピックレトロウイルスを用い、NIH/3T3細胞への遺伝子導入をPb法及びCH-296コートプレートを用いたSN法を用いてM.O.I.=0.2の条件で行った。また、マウスL1210細胞(ATCC CCL-219)は10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI-1640を増殖培地とし、37℃、5%CO₂の条件下で培養を行い、Pb法及びSN法と、CH-296コートプレートを用いたBV法の3種で、M.O.I.=2.0の条件で感染を行った。Pb法、SN法は、それぞれ実施例4の2記載の方法に従って行い、BV法は上記3記載の方法に従って行った。これを37℃、5%CO₂で3日間培養し、3日後の各細胞をフローサイトメーターFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)に供し、GFP発現各細胞の割合を測定した。この結果を図13、14に示す。図13、14はそれぞれNIH/3T3細胞、L1210細胞での結果が示されている。図中、横軸には感染方法が示されており、Pbはポリブレン存在下に感染が実施された群を、SNはCH-296コートプレートでSupernatant法を用いて感染が実施された群を示し、BVはCH-296コートプレートでBound virus法で感染が実施された群をそれぞれ示す。縦軸は遺伝子導入効率(%)を示す。

ヒトGnT-III修飾ウイルスを感染させた各細胞では、CH-296存在下でrsGFP発現細胞の割合が非修飾ウイルス感染各細胞に対して上昇した。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明によれば、レトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下で高い遺

伝子導入効率を示す組換えレトロウイルスベクターが提供される。前記ベクターを使用することにより、標的細胞に高い効率で目的の遺伝子を安定に導入することができる。レトロウイルスベクターは、遺伝病に限らない種々の疾患の治療に使用することができることから、本願発明は広く医療分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0069] SEQ ID NO:2; Synthetic primer hG3-F1 to amplify a gene encoding GnT-III.

SEQ ID NO:3; Synthetic primer hG3-R4 to amplify a gene encoding GnT-III.

請求の範囲

- [1] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、かつN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強された細胞。
- [2] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子が染色体上に組み込まれていることを特徴とする請求項1記載の細胞。
- [3] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を含有するプラスミドで形質転換されていることを特徴とする請求項1記載の細胞。
- [4] N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性の増強がN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子の人為的導入によることを特徴とする請求項1記載の細胞。
- [5] N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性の増強がN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子の染色体上への組み込みによることを特徴とする請求項4記載の細胞。
- [6] N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性の増強がN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子を含有するプラスミドでの形質転換によることを特徴とする請求項4記載の細胞。
- [7] N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII遺伝子が異種のプロモーターの制御下にあることを特徴とする請求項1記載の細胞。
- [8] 293細胞および293T細胞より選択される細胞に由来する請求項1記載の細胞。
- [9] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強され、組換えレトロウイルスベクターまたは組換えレトロウイルスベクタープラスミドで形質転換されたレトロウイルス産生細胞。
- [10] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強され、組換えレトロウイルスベクターまたは組換えレトロウイルスベクタープラスミドで形質転換されたレトロウイルス産生細胞を培養する工程、および
培養液上清を回収する工程
を包含する、レトロウイルスベクターの製造方法。

- [11] 下記工程を包含するレトロウイルスベクターの製造方法により製造されたレトロウイルスベクター:

レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強され、組換えレトロウイルスベクターまたは組換えレトロウイルスベクタープラスミドで形質転換されたレトロウイルス産生細胞を培養する工程、および

培養液上清を回収する工程。

- [12] レトロウイルス由来のgag-pol遺伝子、env遺伝子を有し、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性が増強され、組換えレトロウイルスベクターまたは組換えレトロウイルスベクタープラスミドで形質転換されたレトロウイルス産生細胞を培養する工程、

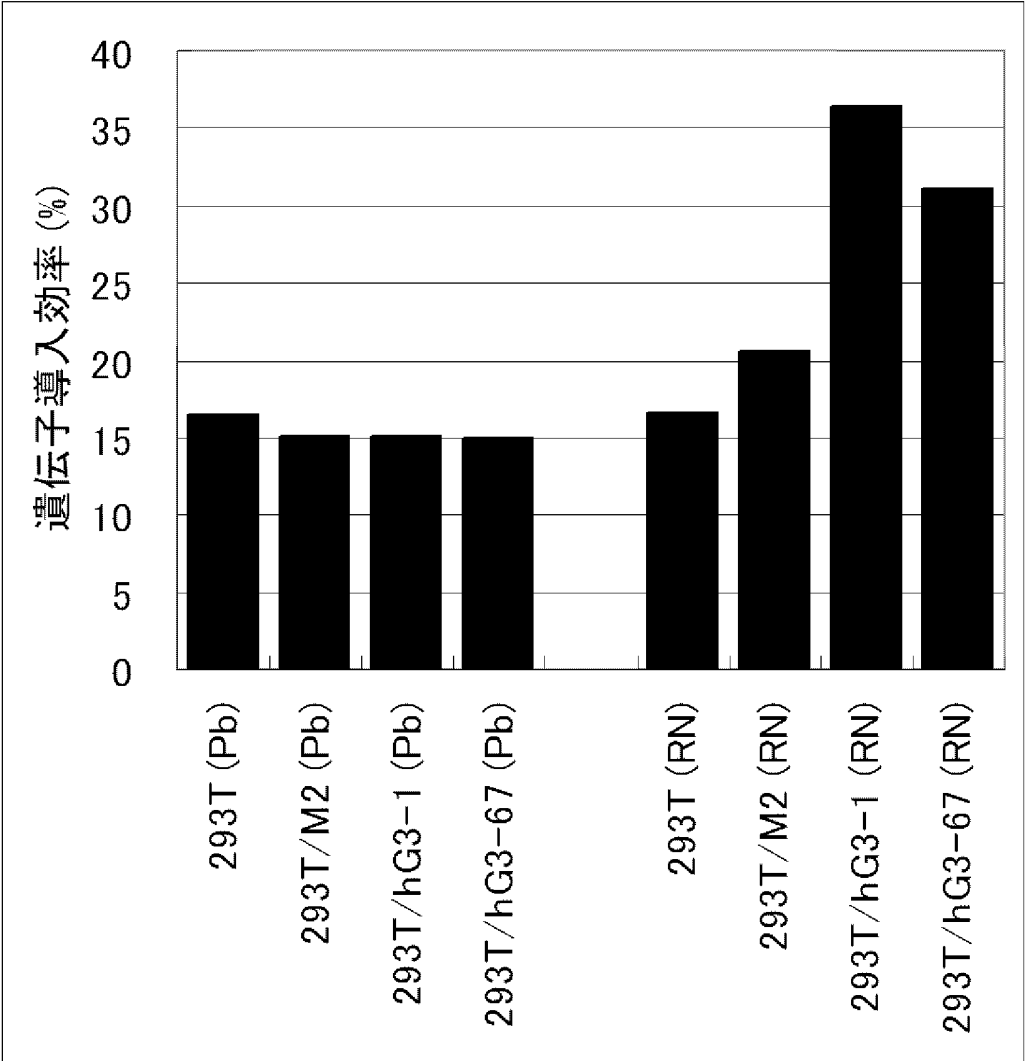
培養液上清を回収してレトロウイルスベクターを得る工程、および

該レトロウイルスベクターをレトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下に標的細胞に感染させる工程

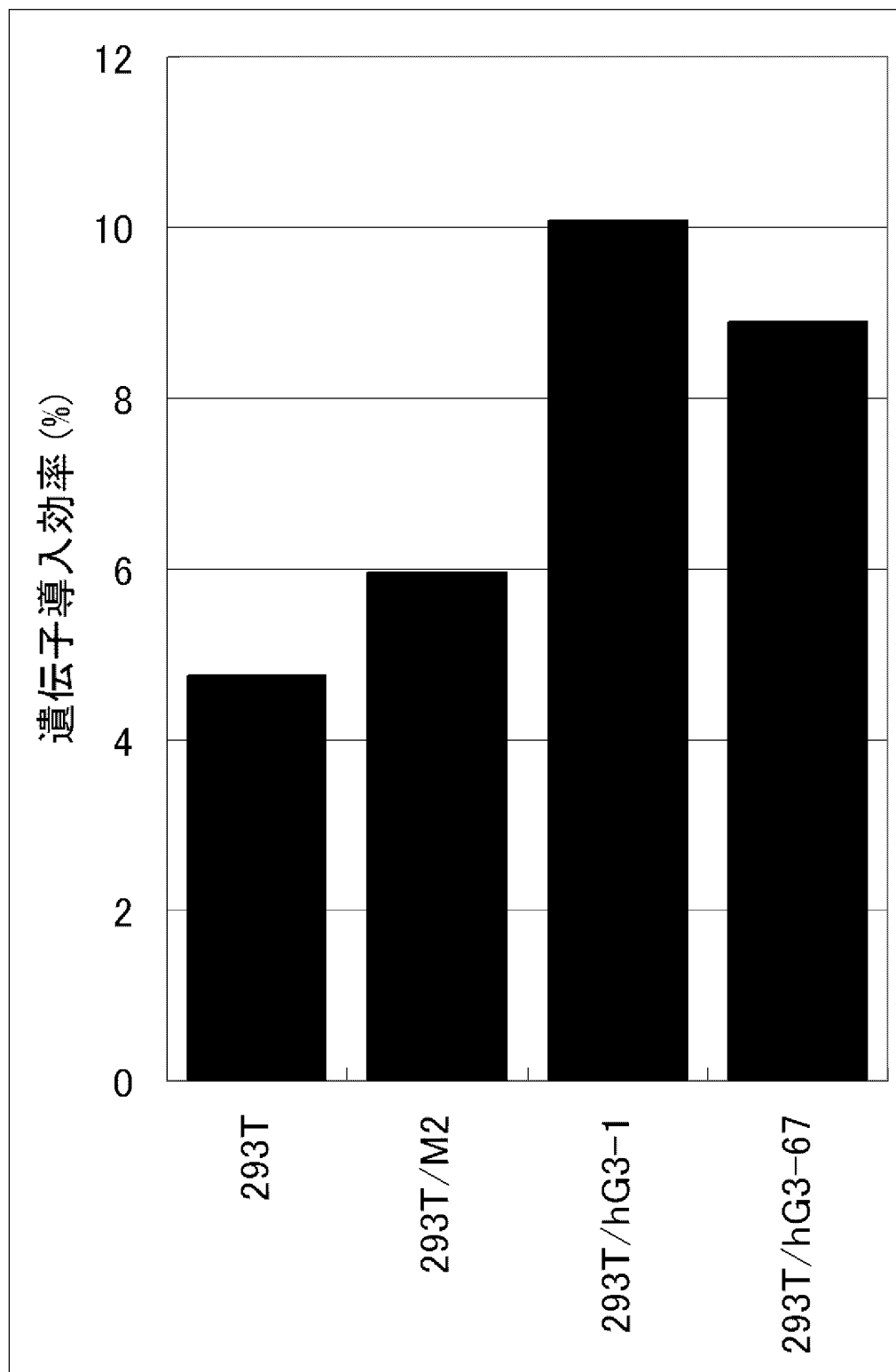
を包含する、標的細胞への遺伝子導入方法。

- [13] レトロウイルス結合活性を有する機能性物質がフィブロネクチンもしくはそのフラグメントである、請求項12記載の標的細胞への遺伝子導入方法。

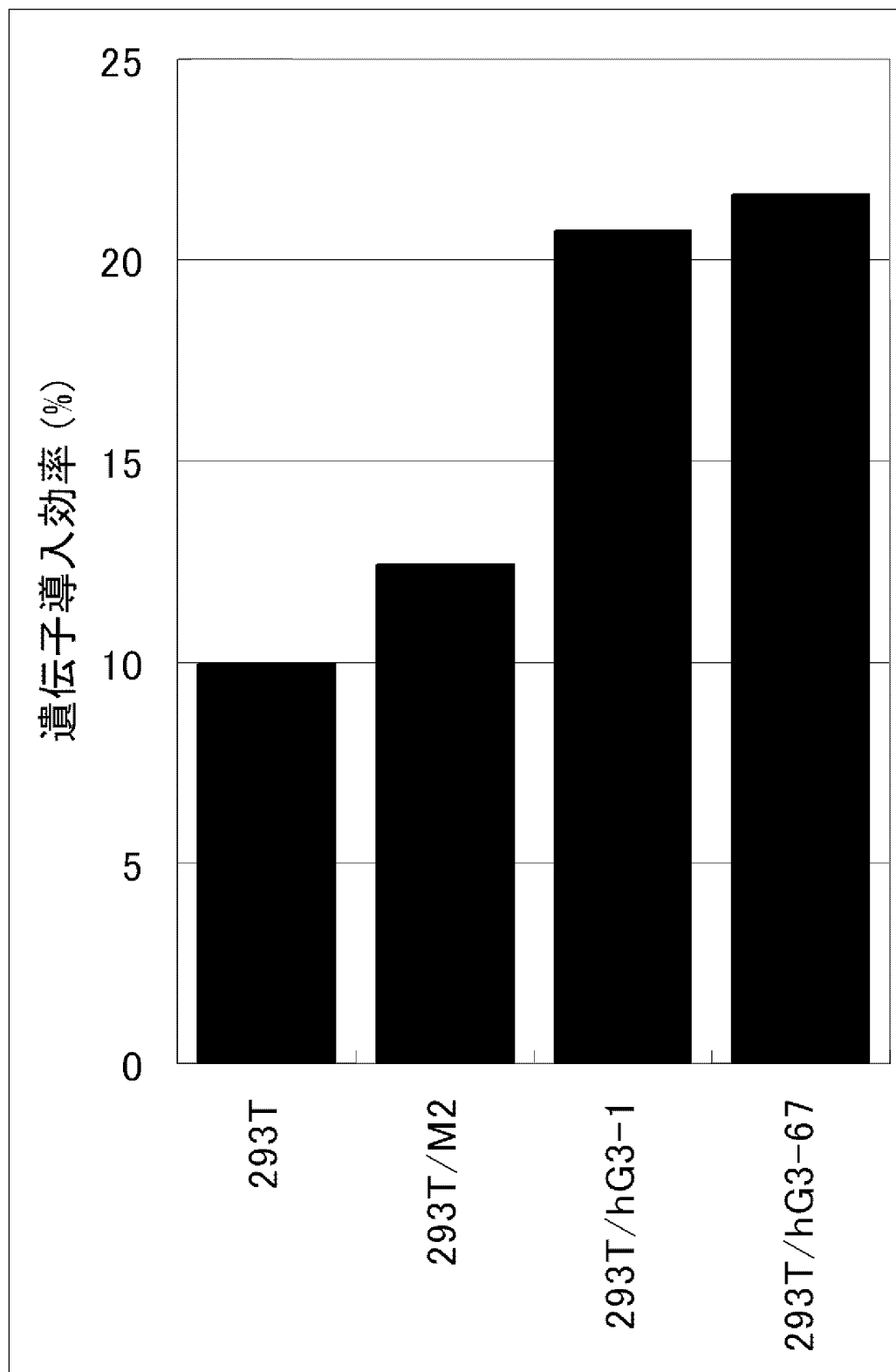
[図1]



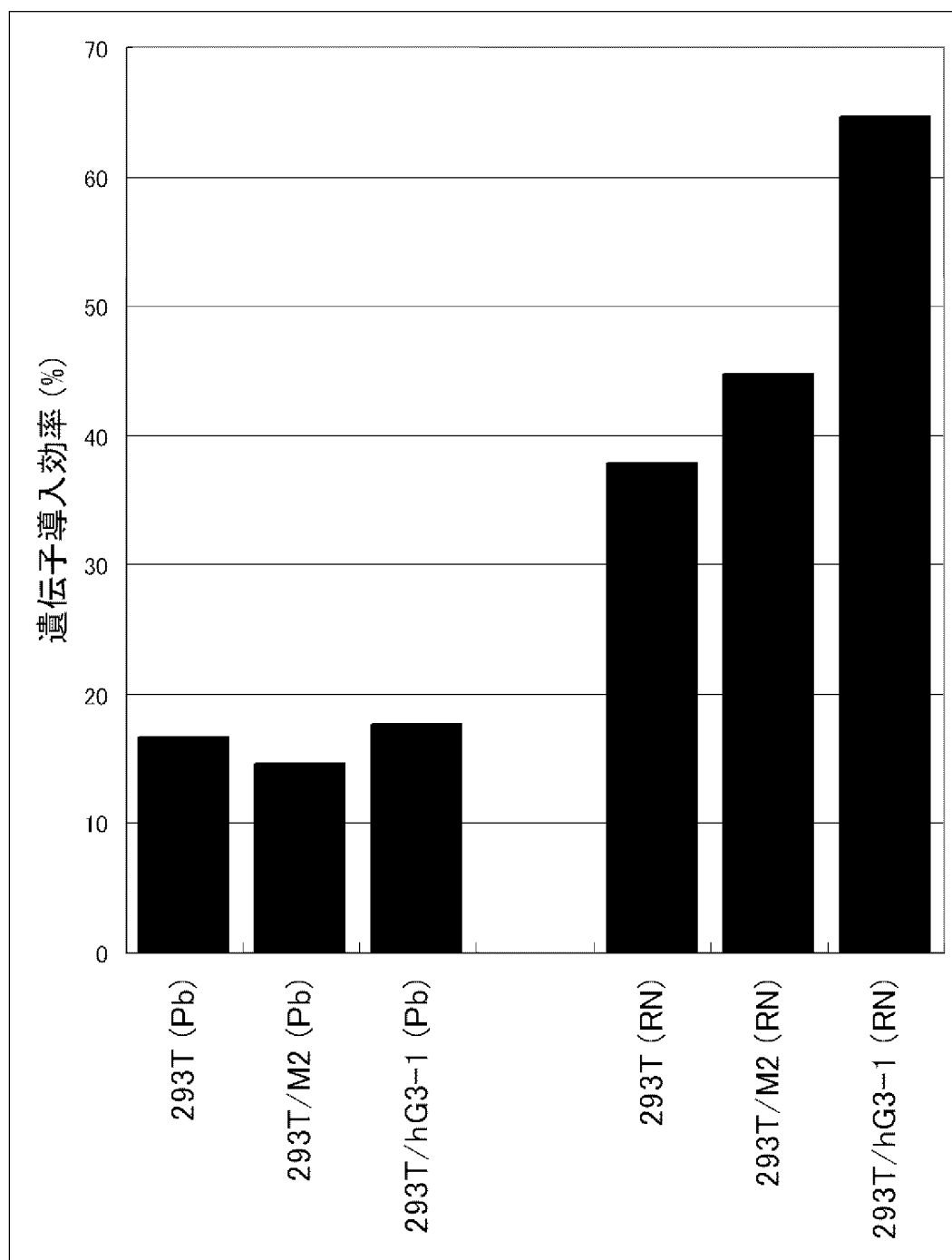
[図2]



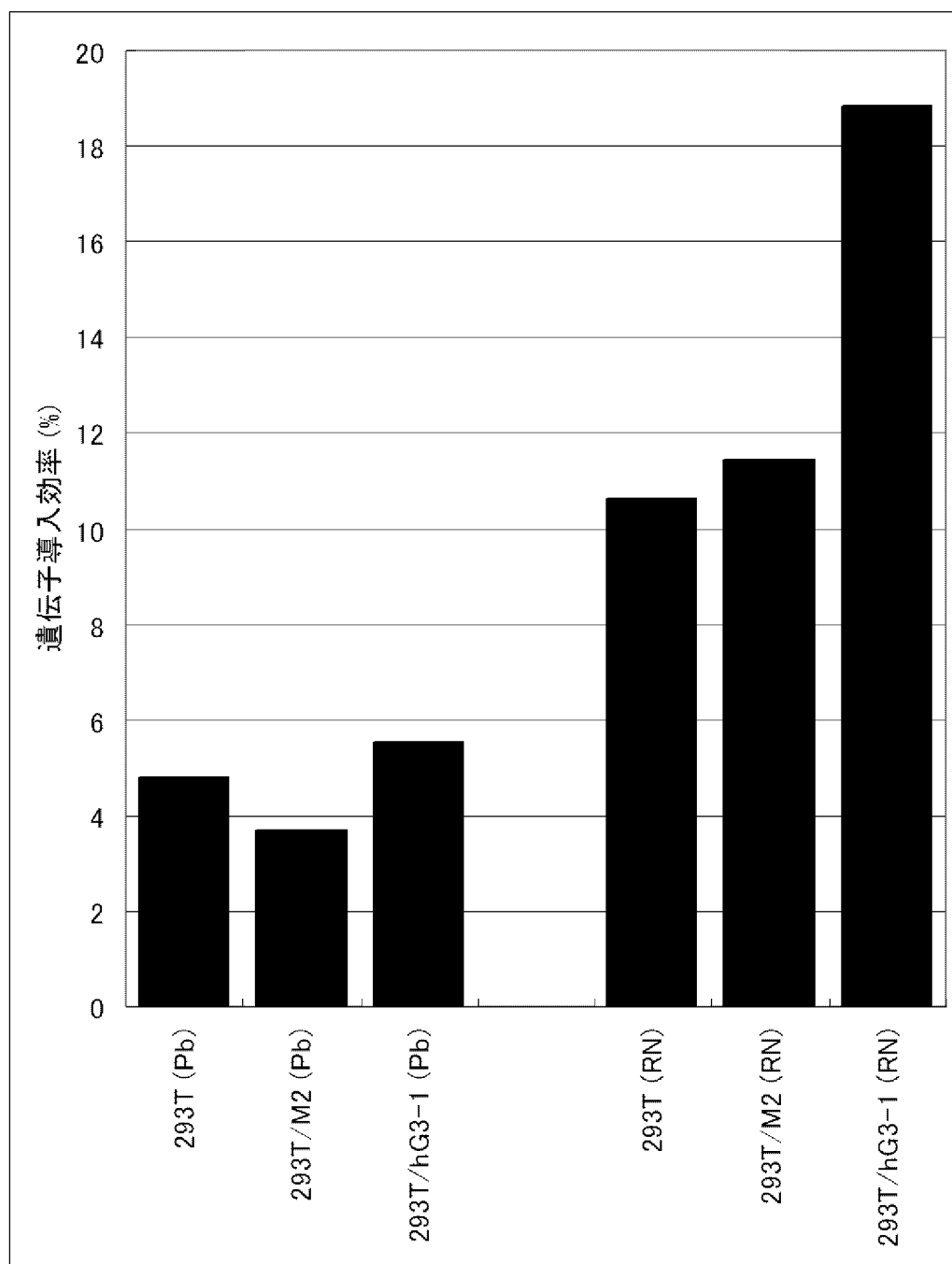
[図3]



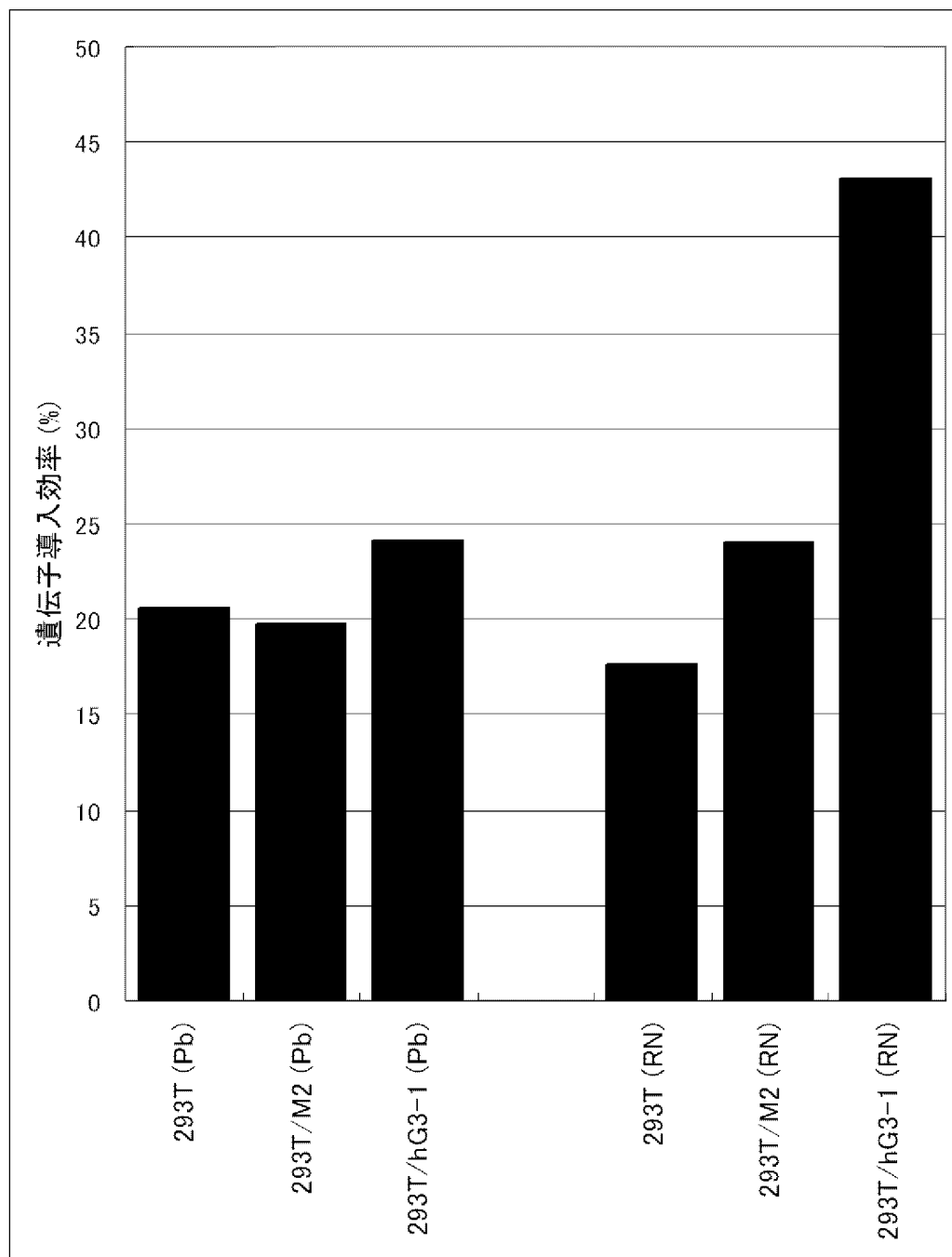
[図4]



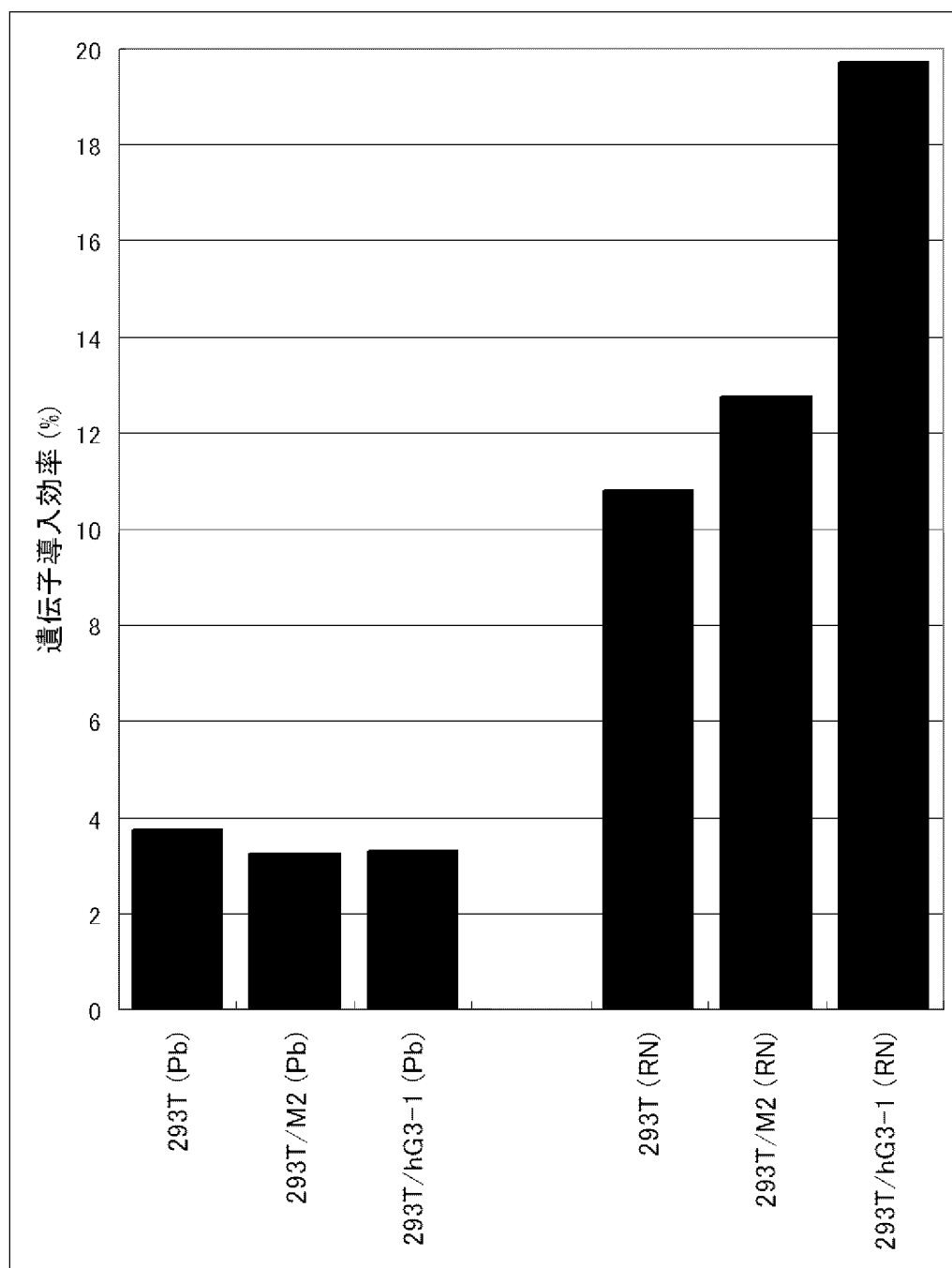
[図5]



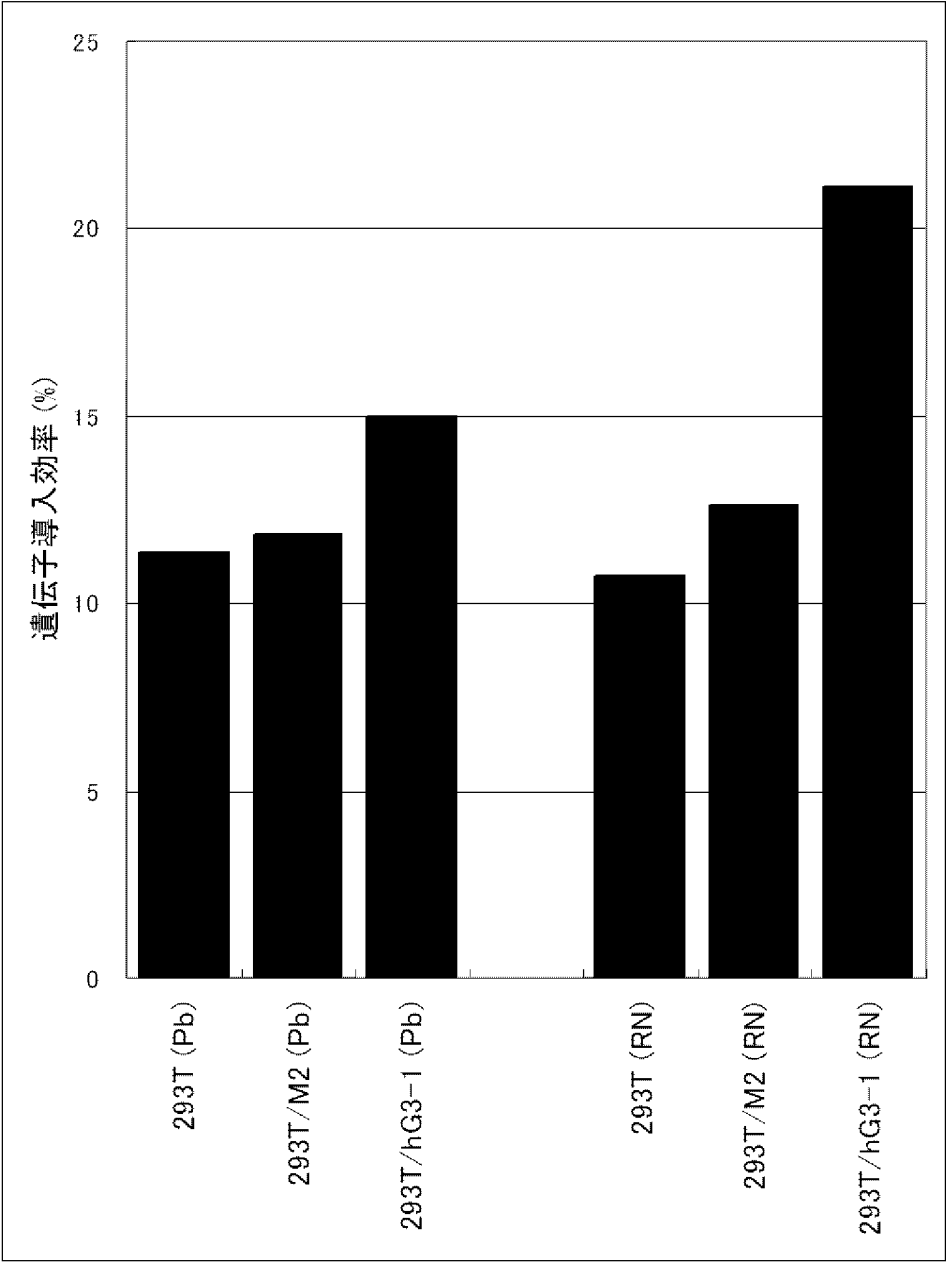
[図6]



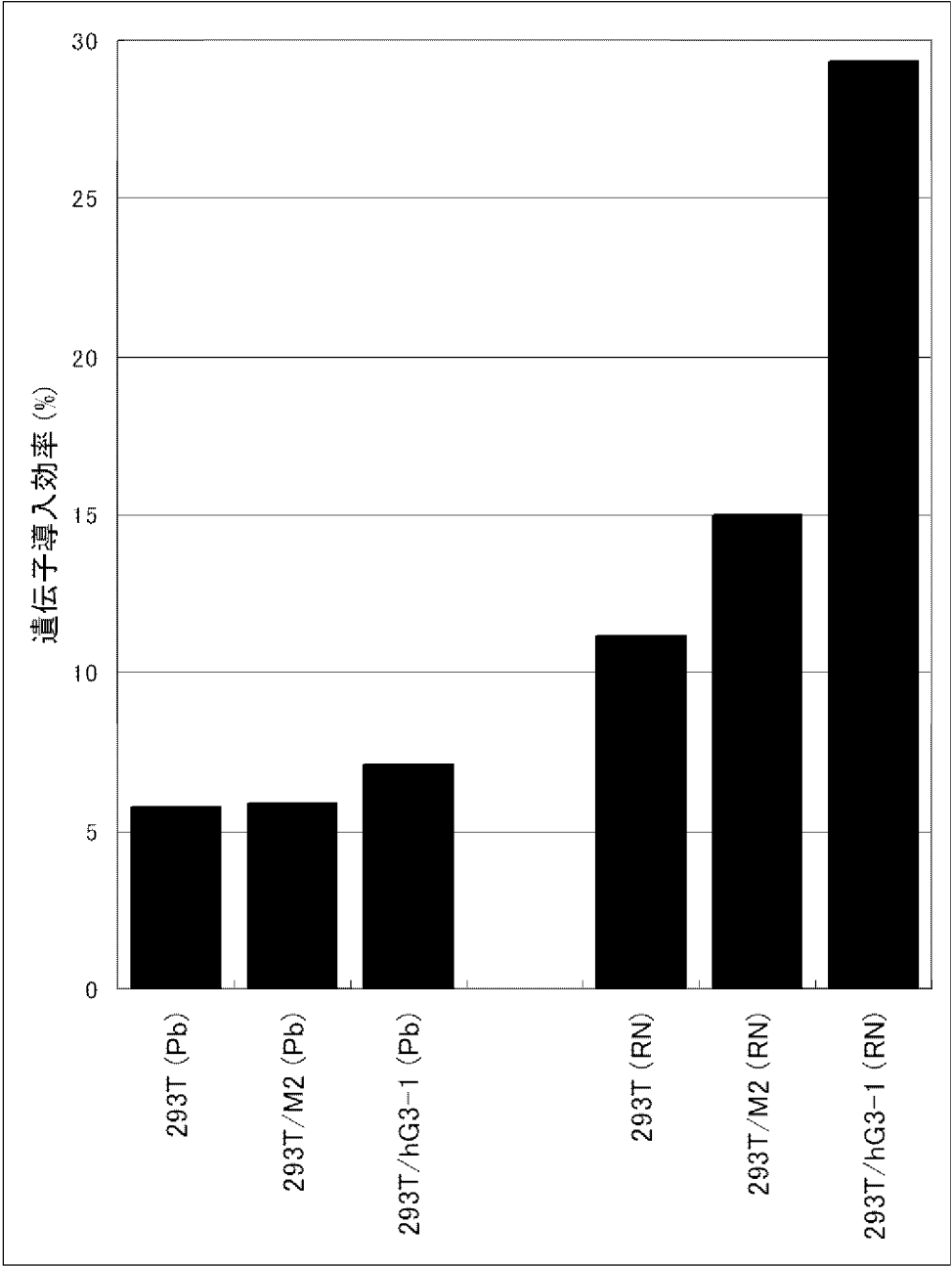
[図7]



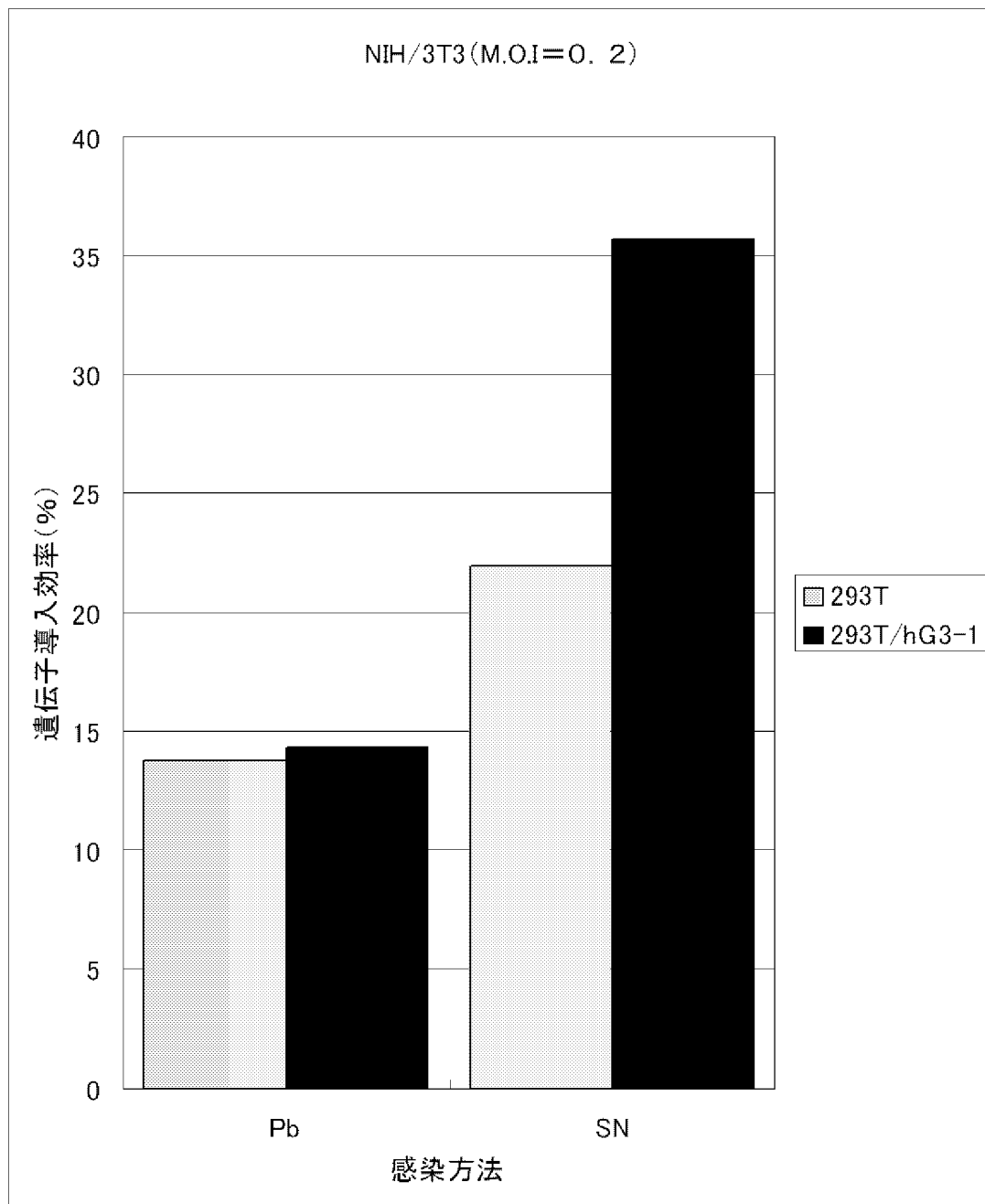
[図8]



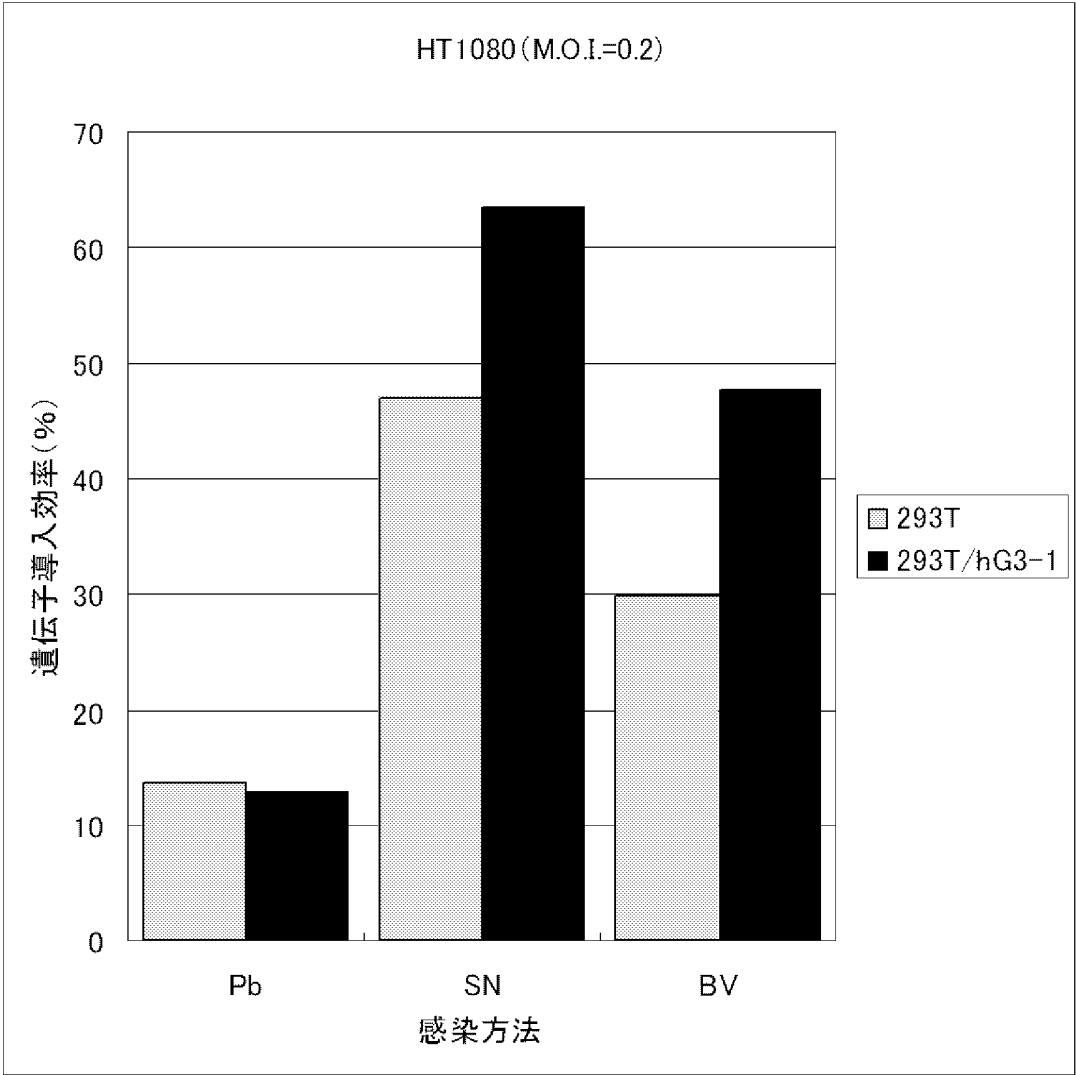
[図9]



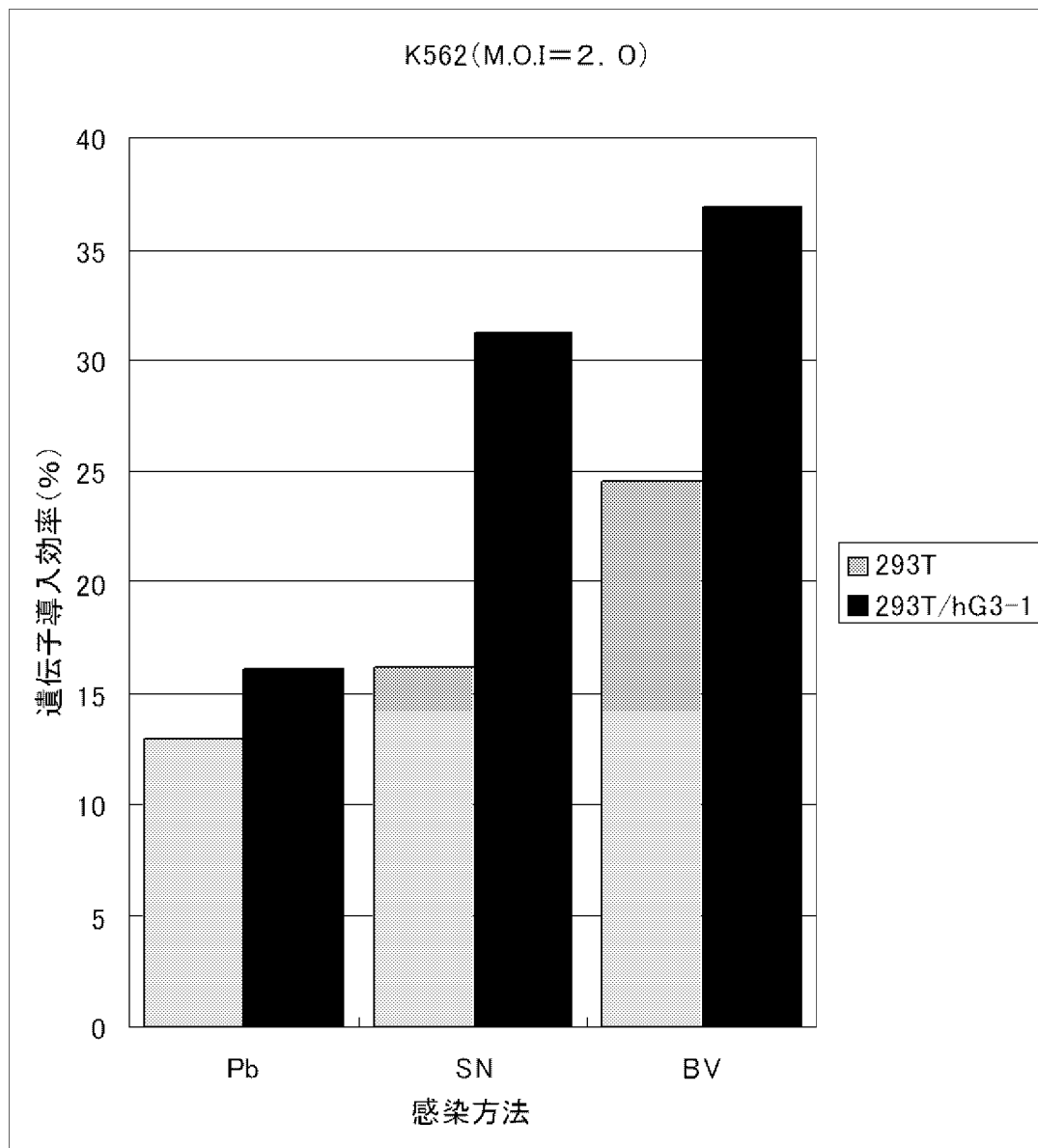
[図10]



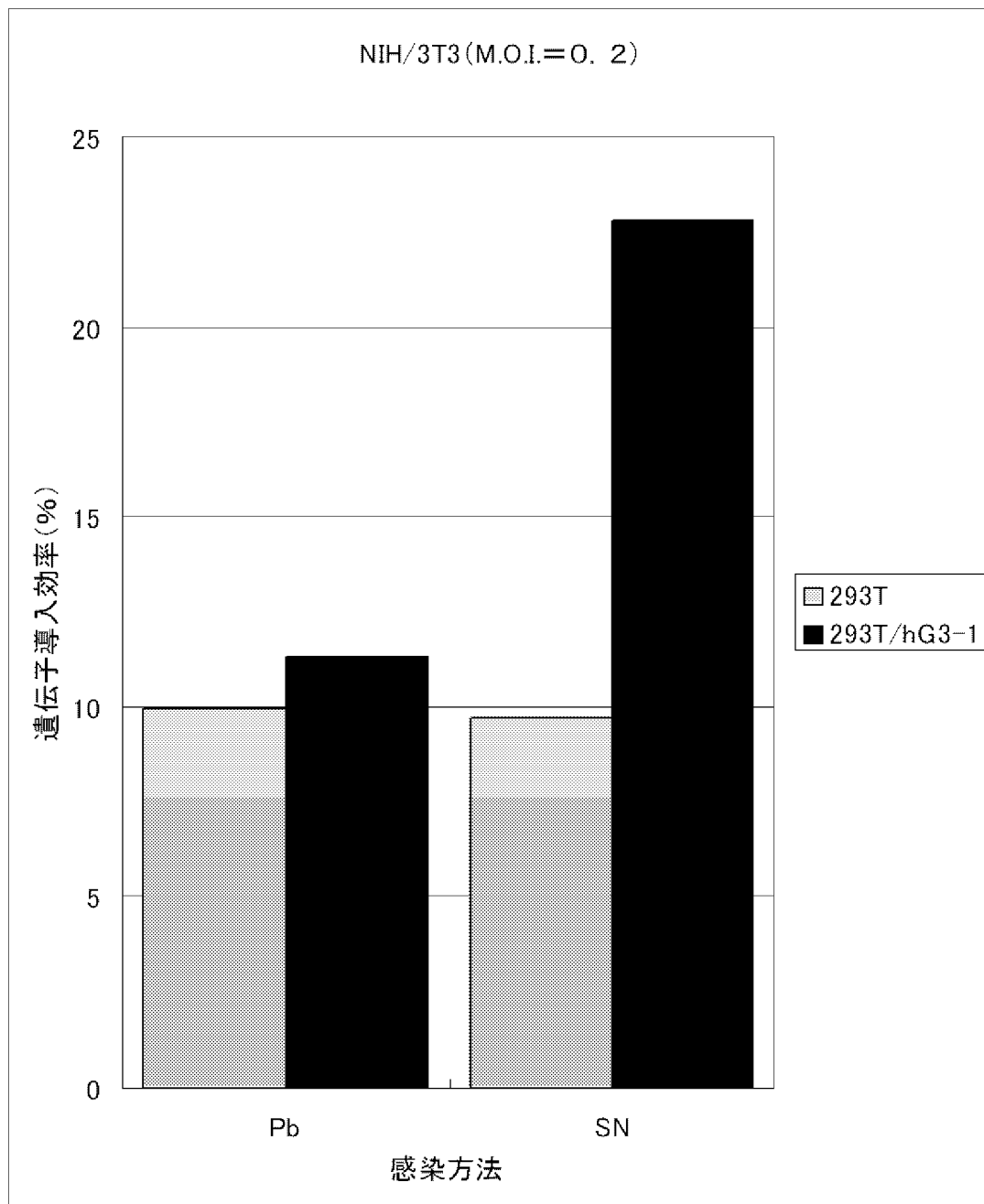
[図11]



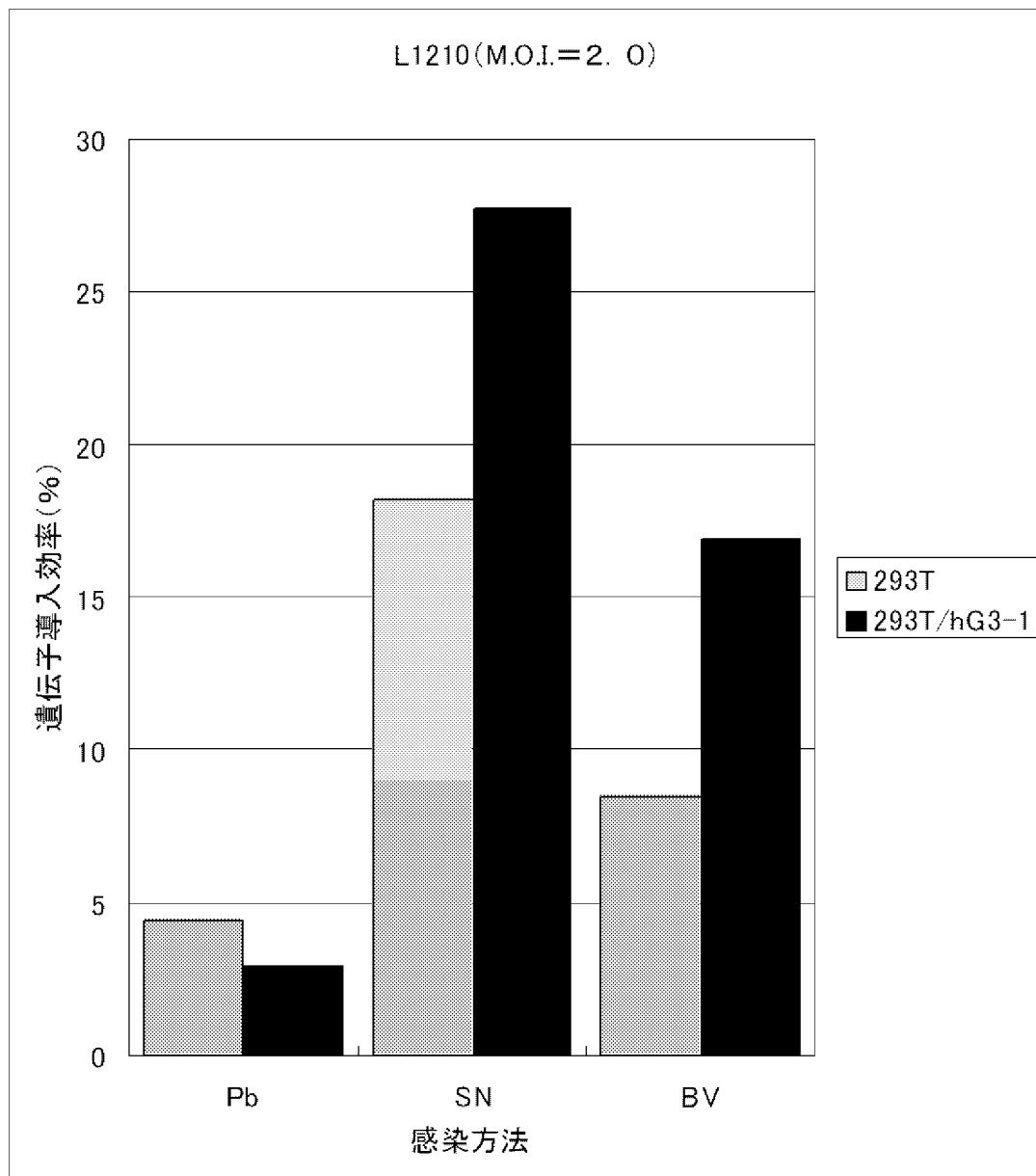
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/867 (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12N7/00** (2006.01)

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)

C12N15/867 (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12N7/00** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	KURIHARA, T. et al., Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyl transferase genes, Xenotransplantation, 2003, Vol.10, pages 562 to 568	<u>1-11</u> 12, 13
A	WO 00/013836 A1 (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 13 January, 2000 (13.01.00), Full text & CN 1314947 A & EP 1362918 A1 & US 2004/0058447 A1	1-13



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 application or patent 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

"T" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October, 2005 (18.10.05)

Date of mailing of the international search report

25 October, 2005 (25.10.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/867 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N7/00 (2006.01)

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.⁷ C12N15/867 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N7/00 (2006.01)

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus(JOIS)

C. 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 A	KURIHARA T. et al., Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes, Xenotransplantation, 2003, vol.10, p562-568	<u>1-11</u> 12、13
A	WO 00/013836 A1 (寶酒造株式会社) 2000.01.13, 全文 & CN 1314947 A & EP 1362918 A1 & US 2004/0058447 A1	1-13

☒ 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ー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「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」優先権主張に疑義を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

18.10.2005

国際調査報告の発送日

25.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先

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)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3227