

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年5月31日(31.05.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/070639 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C12N 7/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/077142
- (22) 国際出願日: 2011年11月25日(25.11.2011)
- (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 2010-263148 2010年11月26日(26.11.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(Japan Science and Technology Agency) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小林 和人(KOBAYASHI Kazuto) [JP/JP]; 〒9608157 福島県福島市蓬萊町7-10-2-3 D Fukushima (JP).

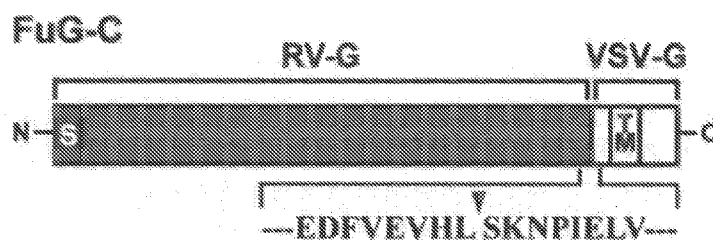
- (74) 代理人: 阿部 正博(ABE Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目14番2号 安田ビル10階 千葉ユナイテッド特許事務所内 Chiba (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: NEURON-SPECIFIC RETROGRADE TRANSPORT VECTOR

(54) 発明の名称: 神経細胞特異的な逆行性輸送ベクター

[図2]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a lentiviral vector system which sustains a high-frequency retrograde transport ability in animal brain and has an increased titer. The present invention relates to a kit for preparing a retrograde transport viral vector and so on, said kit comprising: (1) a packaging plasmid containing the gag and pol genes of HIV-1; (2) a packaging plasmid containing an accessory gene of HIV-1; (3) a transfer plasmid containing a target gene; and (4) an envelop plasmid containing, as an envelope gene, a gene encoding a fused polypeptide, said fused polypeptide comprising a fused extracellular domain comprising the N-terminal region of the extracellular domain of rabies virus glycoprotein (RV-G) and the C-terminal region of the extracellular domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G), the transmembrane domain of RV-G or VSV-G, and the intracellular domain of VSV-G.

(57) 要約: 本発明の目的は動物の脳内において高頻度な逆行性輸送能を保持し、且つ、より高い力価を持つレンチウイルスベクター系を提供すること。本発明は、(1) HIV-1の gag 及び pol 遺伝子を含むパッケージングプラスミド; (2) HIV-1のアクセサリ遺伝子を含むパッケージングプラスミド; (3) 目的遺伝子を含むトランスファープラスミド; 及び (4) エンベロープ遺伝子として、狂犬病ウィルスの糖タンパク質(RV-G)の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質(VSV-G)の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含むエンベローププラスミド、を含む逆行輸送性ウィルスベクター調製用キット等に関する。

WO 2012/070639 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：神経細胞特異的な逆行性輸送ベクター

技術分野

[0001] 本発明は、神経細胞特異的な逆行性輸送ベクター（Neuron-specific retrograde transport vector: NeuRet）系、即ち、特に脳内において高度の逆行性輸送能を有し、生産効率が高く、特に、神経細胞への選択的な遺伝子導入を可能とするウィルスベクター系、より具体的には、狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びにVSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドによって、シュードタイプ化されたレンチウィルスベクター系、該ウィルスベクター系を使用する遺伝子導入方法及び遺伝子治療方法等に関する。

背景技術

[0002] 非増殖（非複製）型組換え体レンチウィルスベクターは、目的遺伝子を中枢神経系（CNS）における非分裂細胞に輸送して長期間に亘る発現を維持する系等のさまざまな疾患に対する遺伝子治療用ベクターとして多くの研究に利用されている（非特許文献1～4）。特に、HIV-1（human immunodeficiency virus type 1）に由来する霊長類のレンチウィルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして最も実績のあるものである（非特許文献5～8）。しかしながら、レンチウィルスベクターは染色体に組み込まれるため、発がんのリスクのあることが知られている。特に、血液系疾患の遺伝子治療において白血病の発症する例が報告されている。神経疾患の遺伝子治療において、発がんのリスクを抑制し、より安全性の高いベクター系を開発するためには、遺伝子導入を神経細胞へ選択的にすることが望まれている。

[0003] 一方、ある種の脳神経疾患に対する遺伝子治療のためには、神経終末部位より感染し、軸索を逆行性に輸送され、かかる感染部位より離れた場所に位置

する標的部位にある細胞体に目的とする遺伝子を導入することのできるウィルスベクターが有益である（図1）。

[0004] これまでに、エンベロープ糖タンパク質（エンベロープ遺伝子タンパク質）として、水泡性口内炎ウィルス（vesicular stomatitis virus:VSV）の糖タンパク質（VSV-G）を利用（シュードタイプ化：pseudotyping）した組換え体HIV-1ウィルスを用いて、カニクイサル脳内における逆行性輸送システムが開発されてきたが、このベクターの逆行性輸送は効率的なものではなかった（非特許文献9）。この文献に記載された方法では、免疫染色により確認された結果、サルの線条体に注入された組換え体HIV-1ウィルスにより逆行性に感染された中枢神経系の細胞はごく僅かであった。

[0005] 一方で、狂犬病ウィルス（rabies virus: RV）は、シナプス終末より感染し、軸索を逆行性に輸送される活性を持つことが知られている。実際に、RV-Gによってウマ貧血ウィルスに基づく非霊長類レンチウィルスベクターの逆行性輸送能が亢進されることが報告されている（非特許文献10、11及び特許文献1）。

[0006] 更に、RV-Gでシュードタイプ化したHIV-1レンチウィルスが報告されているが（非特許文献3）、この報告では実際にこのウィルスベクターを使用した動物実験（インビボ）はなされていない。又、狂犬病の原因となる神経向性ウィルスである、モコラリッサウィルス（Mokola lyssavirus）の糖蛋白質又はVSV-Gでシュードタイプ化したHIV-1ベクターのCNSにおける遺伝子移入が研究されている。モコラリッサウィルスの糖蛋白質又はVSV-Gでシュードタイプ化したHIV-1ベクターをラットの鼻孔に注射した結果、嗅神経系までの逆行性輸送に関して、これらのベクターは互いに同程度であった（非特許文献12）。又、この文献には線条体経由でウィルスベクターを投与した例は記載されていない。

[0007] これまでに本発明者等は、狂犬病ウィルスの糖タンパク質遺伝子(RV-G)でHIV-1レンチウィルスをシュードタイプ化したベクター（RV-G/HIV-1ベクター）を作製することによって、脳内のさまざま領域において高頻度な逆行性遺伝子

導入を可能とすることを明らかにした(特許文献2、Hum. Gene Ther., 2007)。
更に、RV-Gの細胞内ドメインを水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-G)のもので置換した融合糖タンパク質(FuG-B)を作製した。これを用いて、高い効率の逆行性輸送能を保持し、且つ、より高い力価(機能的力価)を持つレンチウイルスベクター系を構築し、逆行性遺伝子導入の頻度を顕著に高めることに成功した(Hum. Gene Ther., 2010)。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2004-517057号公報

特許文献2：特開2009-34029号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：NALDINI, L., BLUMER, U., GAGE, F.H., TRONO, D., and VERMA, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11382-11388.

非特許文献2：REISER, J., HARMISON, G., KLUEPFEL-STAHN, S., BRADY, R.O., KARLSSON, S., and SCHUBERT, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 15266-15271.

非特許文献3：MOCHIZUKI, H., SCHWARTZ, J.P., TANAKA, K., BRADY, R.O., and REISER, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. J. Virol. 72, 8873-8883.

非特許文献4：MITROPHANOUS, K.A., YOON, S., ROHLL, J.B., PATIL, D., WILKES, F.J., KIM, V.N., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J., and MAZARAKIS, N.D. (1999). Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. Gene Ther. 6, 1808-1818.

非特許文献5：KORDOWER, J.H., EMBORG, M.E., BLOCH, J., MA, S.Y., CHU,

Y., LEVENTHAL, L., MCBRIDE, J., CHEN, E.-Y., PALFI, S., ROITBERG, B.Z., BROWN, W.D., HOLDEN, J.E., PYZALSKI, R., TAYLOR, M.D., CARVEY, P., LING, Z., TRONO, D., HANTRAYE, P., DÉGLON, N., and AEBISCHER, P. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767-773.

非特許文献6: MARR, R.A., ROCKENSTEIN, E., MUKHERJEE, A., KINDY, M.S., HERSH, L.B., GAGE, F.H., VERMA, I.M., and MASLIAH, E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J. Neurosci.* 23, 1992-1996.

非特許文献7: ROSENBLAD, C., GEORGIEVSKA, B., and KIRIK, D. (2003). Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *Eur. J. Neurosci.* 17, 260-270.

非特許文献8: LO BIANCO, C., SCHNEIDER, B.L., BAUER, M., SAJADI, A., BRICE, A., IWATSUBO, T., and AEBISCHER, P. (2004). Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an α -synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17510-17515.

非特許文献9: KITAGAWA, R., MIYACHI, S., HANAWA, H., TAKADA, M., and SHIMADA, T. (2007). Differential characteristics of HIV-based versus SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neurosci. Res.* 57, 550-558.

非特許文献10: MAZARAKIS, N. D., AZZOUZ, M., ROHLL, J.B., ELLARD, F.M., WILKES, F.J., OLSEN, A.L., CARTER, E.E., BARBER, R.D., BABAN, D.F., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J., O' MALLEY, K., and MITROPHANOUS, K.A. (2001). Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system.

m after peripheral delivery. Human Mol. Genet. 10, 2109–2121.

非特許文献11: AZZOUZ, M., RALPH, G.S., STORKEBAUM, E., WALMSLEY, L.E., MITROPHANOUS, K.A., KINGSMAN, S.M., CARMELIET, P., and MAZARAKIS, N.D. (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Nature 429, 413–417.

非特許文献12: DESMARIS, N., BOSCH, A., SALA-Uuml;N, C., PETIT, C., PRÉVOST, M.-C., TORDO, N., PERRIN, P., SCHWARTZ, O., DE ROCQUIGNY, H., and HEARD, J.M. (2001). Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. Mol. Ther. 4, 149–156.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] これまでの逆行性輸送を示すRV-GベクターやFuG-Bベクターは注入部位において神経細胞とグリア細胞の両方に遺伝子を導入する性質を持ち、これらのベクター系を使用した場合には、神経細胞に加えて分裂製細胞にも遺伝子導入が起こる。

[0011] 従って、本発明の目的は、高頻度な逆行性輸送を介する遺伝子導入を可能とするばかりではなく、神経細胞への選択的又は特異的な遺伝子導入により、グリア細胞や神経幹細胞等の分裂製細胞に導入される効率を抑えて、発ガンリスクが少なく安全性のより高いレンチウィルスベクター系を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをエンベロープとしてレンチウィルスベクターをシュードタイプ化することによって、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] 即ち、本発明は以下の態様に係るものである。

[態様 1]

(1) HIV-1のgag 及びpol遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
(2) HIV-1のアクセサリー遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
(3) 目的遺伝子を含むトランスファープラスミド；及び
(4) エンベロープ遺伝子として、狂犬病ウィルスの糖タンパク質 (RV-G) の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質 (VSV-G) の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含むエンベローププラスミド、を含む逆行輸送性ウィルスベクター調製用キット。

[態様 2]

態様 1 のウィルスベクター調製用キット、及び、宿主細胞を含む、プロデューサー細胞作製用キット。

[態様 3]

態様 1 のウィルスベクター調製用キットに含まれる、パッケージングプラスミド、トランスファープラスミド、及び、エンベローププラスミドを感染細胞にコトランスフェクションさせることから成る、プロデューサー細胞の作製方法。

[態様 4]

態様 3 で得られたプロデューサー細胞。

[態様 5]

態様 3 のプロデューサー細胞を培養し、培養上清からウィルス粒子を回収することからなる、ウィルスベクターの製造方法。

[態様 6]

態様 5 の方法によって製造された、神経細胞への選択的な逆行性輸送能を有するウィルスベクター。

[態様 7]

態様6のウィルスベクターを動物の神経終末部に感染させ、該ウィルスベクターが該神経の軸索を逆行性に輸送されることにより脳内の標的領域にある該神経の神経細胞体に選択的に導入し、目的とする遺伝子を該神経細胞体内で発現させることから成る、遺伝子導入方法。

〔態様8〕

態様6のウィルスベクターを活性成分として含有する、遺伝子治療剤。

〔態様9〕

態様7方法で導入された目的遺伝子が標的領域における細胞の染色体に組み込まれ発現することを含む、脳疾患の遺伝子治療方法。

〔態様10〕

狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドから成る、レンチウィルスベクターのシュードタイプ化用のエンベロープ。

〔態様11〕

態様10の融合ポリペプチドから成るエンベロープをコードする遺伝子。

〔態様12〕

態様11の遺伝子を含むエンベローププラスミド。

発明の効果

[0014] 本発明の逆行輸送性ウィルスベクターによって、マウス等の哺乳動物を含む動物において、神経終末（シナプス終末）の存在する脳領域に導入目的の特定の遺伝子を持つ組換え体ウィルスベクターを注入し、このウィルスベクターが軸索を逆行性に輸送されることによって、ウィルスベクターの感染（注入）部位から遠く離れた位置にある中枢神経系において、非分裂性細胞である神経細胞へ選択的に該目的遺伝子（導入遺伝子）を効率良く導入して発現させられることがインビボで実証された。特に、特定のパッケージングプラスミド、トランスファープラスミド及びエンベロープ遺伝子を用いるウィル

スベクター調製用キットを使用することによって、予想以上に高いウィルス力価を有するウィルスベクターが得られ、脳内において高頻度な且つ神経細胞への選択的な逆行性輸送能を発揮する組換え体ウィルスベクターの作製が可能となる。

[0015] 又、本発明の逆行輸送性ウィルスベクターはグリア細胞及び神経幹細胞等の分裂性細胞への遺伝子導入は極めて低く抑えられるので、発ガンのリスクが顕著に軽減され、神経細胞以外の細胞における遺伝子導入及び発現によって起こる副作用を減少させることができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]高頻度な逆行性輸送を示すHIV-1 pseudotypeベクターの概要を模式的に示す。

[図2]FuG-Cの構造を示す。RV-Gの細胞外ドメインのN末端領域にVSV-G由来の細胞外ドメインC末端領域が連結され、さらにVSV-G由来の膜貫通・細胞内ドメインを含む。RV-GとVSV-Gの連結部位は矢印で示され、境界のアミノ酸配列が示されている。S, シグナルペプチド; TM, 膜貫通ドメイン。

[図3]導入遺伝子の発現パターンを示す写真である。(A) 線条体における発現パターン。(B) RV-GとFuG-Cベクターの逆行性輸送を介する導入遺伝子発現パターン。一次運動皮質 (M1)、一次体性感覚皮質 (S1)、視床束傍核 (PF)、黒質緻密部 (SNc) における発現。fr (手綱核脚間路)、SNr (黒質網様部)、LV (側脳室)。スケールバー: 500 μ m

[図4]逆行性遺伝子発現効率の力価依存性を示すグラフである。(Two-way ANOVA: main effect of vector, $F_{(1,30)} = 223.9$ for M1, 231.7 for S1, 46.5 for PF, and 87.7 for SNc, $P < 0.001$ in all regions; and interaction between vector and titer, $F_{(4,30)} = 20.4$ for M1, 21.7 for S1, 3.6 for PF, and 8.4 for SNc, $P < 0.05$ in all regions).

[図5]注入部位における神経細胞とグリア細胞への遺伝子導入効を示す共焦点顕微鏡写真である。スケールバー: 50 μ m

[図6]神経幹細胞への遺伝子導入効を示す共焦点顕微鏡写真である。(A) GF

APとの二重染色：（B） BrdUとの二重染色。矢印は、代表的な二重染色細胞を示す。スケールバー：100 μm （A），50 μm （B）。

[図7]エンベローププラスミドpCAG-FuG-Cに含まれている本発明のエンベロープをコードする塩基配列を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 本願発明のウィルスベクターは神経細胞特異的な逆行性輸送ベクター（Neuron-specific retrograde transport vector: NeuRet）であり、高い力価を示すことを特徴とする。

かかるウィルスベクターは、以下の調製用キットを用いて調製することが出来る：

- （1） HIV-1のgag 及びpol遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
- （2） HIV-1のアクセサリ遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
- （3） 目的遺伝子を含むトランスファープラスミド；及び
- （4） エンベロープ遺伝子として、狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含むエンベローププラスミド、を含む逆行輸送性ウィルスベクター調製用キット。

[0018] 本発明のウィルスベクター調製用キットにおいて、「gag」はレトロウィルスのコア蛋白質をコードする遺伝子であり、「pol」は逆転写酵素等をコードする遺伝子である。又、「エンベロープ遺伝子」は、脂質二重膜からなるレトロウィルスの外皮膜であるエンベロープに存在するウィルス特異的な蛋白質であるエンベロープをコードする遺伝子である。エンベロープはウィルスが細胞に吸着し侵入するための重要な役割を担っている。更に、「アクセサリ遺伝子」とは、例えば、構造遺伝子の発現を調節するrev遺伝子等を意味する。

[0019] 本発明のウィルスベクター調製用キットの好適代表例においては、（1） HIV

-1のgag 及びpol遺伝子を含むパッケージングプラスミド及び（２）HIV-1のアクセサリ遺伝子を含むパッケージングプラスミドとして、夫々、「pCAGk GP1.1R」及び「pCAG4-RTR2」を使用し、更に、トランスファープラスミドとして、「pCL20c-MSCV-X（ここで、「X」は目的遺伝子を示す）」を使用することを特徴とする。該トランスファープラスミドはマウス幹細胞ウィルスプロモーターの下流に導入の対象である目的遺伝子「X」がコードされている。

[0020] 上記のウィルスベクター調製用キットに含まれる各プラスミドは、St. Jude Children' s Research Hospital のArthur Nienhuis博士によって開発されたHIV-1ベクター系「SJ1」（HANAWA, H., et al., (2002) Mol. Ther. 5, 242-251; (2004). Blood 103, 4062-4069 : St. Jude Children' s Research Hospitalから供与）に基づき構成されている。このベクター系は、HeLa細胞における力価が他のベクター系の約10倍あることが知られている。従って、当業者であれば、本願明細書及び上記文献を参照することによって、これら各プラスミドを容易に作製することができる。尚、上記の（１）及び（２）のパッケージングプラスミドは、一つのプラスミドとして構築されていても良い。

[0021] 本発明ウィルスベクター調製用キットのエンベローププラスミドに含まれるエンベロープ遺伝子は、狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする。尚、各ドメインの融合境界部分において、一個又は複数個のアミノ酸が削除・挿入・置換等のによって適宜変更させることが可能であり、各ドメインを構成するアミノ酸が全て含まれている必要はない。

[0022] このエンベロープ遺伝子の例として、融合細胞外ドメインを構成する狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域（シグナルペプチドを含む）としては、元来アミノ酸458個からなる狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域の、例えば、420個程度以

上、又は、430個程度以上のアミノ酸からなるポリペプチドを有しているものを挙げる事が出来る。

[0023] その好適な一例として、配列番号2に示されたアミノ酸配列から成る融合ポリペプチド (FuG-C) をコードするエンベロープ遺伝子、好ましくは、配列番号1 (図7) に示されたN' 側の1~1,365番目の塩基配列 (配列番号1において、5' 側1~1,317番目 (開始コドン含む) の塩基がRV-G由来であり、3' 側の1,318~1,365番目の塩基がVSV-G由来である) を有する核酸分子を挙げる事が出来る。当該塩基配列は、コドン縮重を考慮して、エンベローププラスミド内の他の要素に合わせて適宜最適コドンと成るように塩基を変更することが可能である。尚、狂犬病ウィルスの糖タンパク質 (RV-G) のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列の例を配列番号4 及び配列番号3で示す。

[0024] このように、上記の融合ポリペプチドは、各種のレンチウィルスベクター、特に、HIV-1レンチウィルスベクターのシュードタイプ化用のエンベロープとして有効である。従って、本発明は、該融合ポリペプチドから成るレンチウィルスベクターのシュードタイプ化用のエンベロープ、該融合ポリペプチドから成るエンベロープをコードする遺伝子、及び、該遺伝子を含むエンベローププラスミドそれ自体にも係る。

[0025] 本発明のウィルスベクター調製用キットに含まれる各プラスミドにおいて、夫々の遺伝子は、当業者に公知の任意の発現調節配列の発現制御下に結合されている。

「発現制御下」とは、所定のアミノ酸配列をコードしたDNAが、所定の条件下で、そのアミノ酸配列を有するタンパク質を発現させる能力を有するという意味である。所定のアミノ酸配列をコードしたDNAが発現調節配列の発現制御下に結合されていると、そのDNAは、所定の条件下で、所定のタンパク質を発現するということになる。ここで、「発現調節配列」とは、他の核酸配列の発現を調節する核酸配列のことを意味しており、他の核酸配列の転写、及び、好ましくは翻訳をも制御及び調節する。発現調節配列には、

適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質をコードする遺伝子における開始コドン（すなわちA T G）、イントロンのためのスプライシングシグナル、ポリアデニル化部位、及びストップコドンが含まれる。

[0026] 「プロモーター」とは、転写を行うために必要最小限な配列のことを意味している。プロモーターには、細胞タイプ特異的、組織特異的、又は外部からの信号や調節剤によってプロモーター依存的に遺伝子の発現を制御するプロモーター要素も含まれる。プロモーター要素は、発現されるDNAの5'領域、又は3'領域のいずれかに結合される。また、プロモーターには、構造的なもの、又は誘導的なもののいずれも含まれる。プロモーターは、使用する目的遺伝子及びウィルスベクターの種類、治療対象となる動物及び脳疾患の種類、及び、患者の病態等に応じて、当業者に公知のものを適宜、選択することが出来る。

[0027] 例えば、本発明におけるエンベローププラスミドにおいては、エンベロープ遺伝子はサイトメガロウィルスエンハンサー及びトリβアクチンプロモーターの制御下で発現するように結合されていることが好ましい。このようなエンベローププラスミドは、常法に従い、上記のベクター系「SJ1」に含まれるエンベローププラスミド「pCAGGS-VSV-G」において、水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインをコードする塩基配列を、乳飲みマウスの脳にて感染継代された狂犬病ウィルスC V S株の糖タンパク質（RV-G）（国立感染症研究所の森本金次郎先生から供与）をコードする核酸（cDNA）（Morimoto, K. et al., (1998) Proc Natl. Acad. Sci., USA 95, 3152-3156 : : 配列番号3）における細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインをコードする塩基配列と置換して得ることが出来る。従って、当業者であれば、本願明細書及び上記文献を参照することによって、これら上記プラスミドを容易に作製することができる。尚、狂犬病ウィルスC V S株の糖タンパク質（RV-G）は上記の配列番号3に示される塩基配列を有するものに限らず、その他の公知の狂犬病ウィルスの任意の株由来の糖タンパク

質 (RV-G) を利用することが出来る。

- [0028] トランスファープラスミドに含まれる目的遺伝子は、ウィルスベクターの使用目的、治療対象となる動物及び脳疾患の種類、及び、患者の病態等に応じて、当業者に公知のものを適宜、選択することが出来る。従って、マウス、サル、ヒト等の哺乳動物の各種遺伝子、例えば、パーキンソン病に代表される脳神経疾患又は神経変性疾患等の治療に使用される、黒質線条体系の生存又は保護に必要な遺伝子（例えば、チロシンヒドロキシラーゼ、グリア細胞株由来神経栄養因子）、又は、脳神経系の研究用としてインターロイキン2受容体 α サブユニット（組み換え体イムノトキシンの標的分子）、及び光依存性イオンチャネル等の遺伝子を挙げることが出来る。
- [0029] 本発明のプロデューサー細胞作製用キットに含まれる宿主細胞としては、上記ウィルスベクター調製用キットによって感染させることができ、その結果、「プロデューサー細胞」と呼ばれるレトロウィルス粒子を産生する細胞を作製できるような細胞であれば、特に制限はなく、当業者に公知の任意の細胞、例えば、HEK293T細胞（SV40 large T antigen が導入されている）等の市販されている適当な動物由来の細胞を使用することができる。
- [0030] 本発明の各種キットには、その構成・使用目的などに応じて、上記各プラスミド及び／又は宿主細胞に加えて、例えば、各種試薬類、緩衝液、各種補助剤、反応プレート（容器）等の当業者に公知の他の要素又は成分を適宜含むことができる。
- [0031] 本発明のプロデューサー細胞作製用キットを用いて、ウィルスベクター調製用キットに含まれる、パッケージングプラスミド、トランスファープラスミド、及び、エンベローププラスミドを感染細胞にコトランスフェクションさせることによって、プロデューサー細胞を作製することが出来る。このトランスフェクションは一過性であり、リン酸カルシウム法等の当業者に公知に任意の方法で行なうことが可能である。
- [0032] こうして得られたプロデューサー細胞を当業者に公知の任意の方法・手段で培養し、培養上清からウィルス粒子を回収することによって、脳内において

神経細胞に選択的又は特異的な逆行性輸送能を有し、高い力価を示すウィルスベクターを製造することが出来る。

[0033] 本発明のウィルスベクターを動物の神経終末部に感染させ、該ウィルスベクターが該神経の軸索を逆行性に輸送されることにより脳内の標的領域にある該神経の神経細胞体に選択的に導入し、目的とする遺伝子を該神経細胞体内で発現させることができる脳内の標的領域は、例えば、線条体に投射する一次運動皮質、一次体性感覚皮質、視床束傍核、黒質緻密部であり、腹側線条体（側坐核）に投射する梨状皮質、鉤状回、扁桃体基底外側核、室傍核前部、視床背内側核、外側視床下部のような脳中枢領域である。更に、本発明のウィルスベクターは脊髄運動ニューロンの軸索を逆行性に輸送される。

[0034] 従って、本発明のウィルスベクターは遺伝子治療剤の活性成分として有効である。この遺伝子治療剤には、活性成分と組合せて、薬学上許容できる、当業者に公知の任意の医薬キャリアー又は希釈剤等のその他の成分を含むことが出来る。

[0035] 本発明の活性成分の有効量は、ウィルスベクターに含まれる導入遺伝子の種類、脳疾患又は神経変性障害等の種類・重篤度、治療方針、患者の年齢、体重、性別、全般的な健康状態、及び患者の（遺伝的）人種的背景に応じて、当業者が適宜選択することができる。活性成分（ウィルスベクター）の投与量は、例えば、1回の投与当たり、数箇所の感染（注入）部位の総量 $10^8 \sim 10^9$ TU (Transducing Unit) 程度とすることができる。尚、ウィルスベクター又は遺伝子治療剤は、当業者に公知の任意の投与方法・装置を用いて、患者の所定部位へ感染（注入）させることができる。

[0036] 本発明のウィルスベクターを患者に投与することによって、標的領域における神経細胞に導入された遺伝子は該神経細胞の染色体に組み込まれ、目的遺伝子が安定的に発現される。従って、この遺伝子導入方法を利用して、ヒト等の霊長類を含む哺乳動物の脳疾患又は神経変性疾患（例えば、パーキンソン病）等の遺伝子治療を実施することが可能である。

[0037] 以下、実施例および試験例により本発明をより詳細に説明する。これらの

例は、本発明の一部を示すものであり、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって何ら限定されるものではない。又、特に記載のない場合には、各操作における実験条件等は本明細書に引用して文献記載の方法に準じて、又は、当該技術分野における標準的な方法に従った。

実施例 1

[0038] ウィルスベクターの調製：

本発明のウィルスベクターを、St. Jude Children's Research Hospital の Arthur Nienhuis博士によって開発されたHIV-1ベクター系を利用して調製した。即ち、gag及び pol遺伝子を含むパッケージングプラスミド (pCAGkGP1.1 R)、アクセサリ遺伝子を含むパッケージングプラスミド (pCAG4-RTR2)、及び、目的遺伝子として緑色蛍光蛋白質 (GFP) を含むトランスファープラスミド (pCL20c-MSCV-GFP) を使用した。

[0039] エンベローププラスミド (pCAG-FuG-C：配列番号5) としては、国立感染症研究所の森本金次郎先生から供与されたRV-G遺伝子の細胞外ドメインのN末端領域にVSV-G由来の細胞外ドメインC末端領域を連結し、さらにVSV-G膜貫通及び細胞内ドメインを接続することによって融合糖タンパク質 (FuG-C) を作製した (図2)。FuG-Cの細胞外ドメインは、439アミノ酸のRV-G由来細胞外ドメインN末端領域と16アミノ酸のVSV-G由来細胞外ドメインC末端領域から構成される。

同様に、エンベローププラスミドとしてVSV-G及び RV-Gを用いて比較用のウィルスベクターを作製した。

[0040] ウィルス力価の測定：

これらのプラスミドを含むウィルスベクター溶液を、HEK293 T細胞 (10-cm ディッシュ、18枚) ヘリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。48時間培養後、培養上清よりウィルス粒子を回収し、遠心し、これを0.45 μ mセルロースフィルターでろ過した。次に、ベクター粒子を遠心分離 (10,000 X g、16-18時間) によって回収し、1 mlのPBSに懸濁した。懸濁液をSepharose Q FFイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけ、PBSで洗浄後、0-1

.5 M NaClの直線勾配により溶出し、分画を260/280 nmの吸光度でモニターした。ベクター粒子を含む分画を集め、限外濾過フィルターを用いて濃縮し、-80°Cで保存した。

[0041] ウィルス力価を評価するために、公的機関等から容易に入手・購入可能な培養細胞、即ち、ヒト腎臓細胞：HEK293T（理化学研究所の細胞バンクから入手可能、寄託番号：RCB2202）、マウス神経芽細胞：Neuro2A（ATCCから購入入手可能、ID番号：CCL-131TM）、マウス神経芽細胞：N1E-115（ATCCから購入入手可能、ID番号：CRL-2263TM）を6ウェル細胞培養用プレート：MULTIWELL（登録商標）FALCON）に撒き、適当な濃度のウィルス溶液を該培養細胞に感染させ、形質転換3日後にFACS Calibur（Nippon Becton Dickinson Co., Tokyo, Japan）を用いて機能的力価を測定した。次に、ベクターストックに含まれるRNAレベルを定量的RT-PCR法を用いて測定した。

[0042] 以上の結果を表1に示した。FuG-Cベクターの機能性タイター（Functional titer）は、Neuro2Aにおいてのみ検出されたが、その値はVSV-GやRV-Gベクターに比較すると有意に低下し（ANOVA, Tukey HSD, $p < 0.01$ ）、FuG-CのRNAタイターはVSV-GやRV-Gベクターのものと同等であった。

[0043] [表1]

レンチウィルスベクターの力価

	Functional titer			RNA titer
	HEK293T	Neuro2A	N1E-115	
VSV-G	$1.0 \pm 0.02 \times 10^9$	$5.0 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.8 \pm 0.1 \times 10^8$	$6.8 \pm 0.6 \times 10^9$
RV-G	$5.2 \pm 1.0 \times 10^7$	$1.9 \pm 0.04 \times 10^7$	$3.4 \pm 0.2 \times 10^6$	$8.6 \pm 0.7 \times 10^9$
FuG-C	ND	$1.2 \pm 0.01 \times 10^6$ *	ND	$8.9 \pm 0.8 \times 10^9$

ND, Not detected. * $P < 0.01$ vs VSV-G or RV-G, (ANOVA, Tukey HSD)

実施例 2

[0044] ウィルスベクターのマウス脳内への導入：

動物の飼育及び取り扱い操作は福島県立医科大学の動物実験委員会が制定したガイドラインに基づき実施した。

12週齢マウス (C57BL/6J) をペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、上記で作製したベクターを含む溶液 (4.8×10^{10} copies/ml) を、マウスの脳内 (線条体) に脳定位固定装置を利用して、マウス脳アトラス (PAXINOS, G., and FRANKLIN, K.B.J. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn. (Academic Press, San Diego)) に従い、マイクロインジェクションポンプに連結したガラスマイクロインジェクションキャピラリーを介して線条体 (striatum) の背部領域 (dorsal region) にトラック上2箇所、1箇所あたり $2 \mu\text{l}$ の溶液を注入した ($0.1 \mu\text{l}/\text{min}$)。ブレグマ (bregma) からの前後 (anteroposterior)、内外側 (mediolateral)、及び背腹 (dorsoventral) の方向の座標は、夫々、0.50、2.00及び2.50/3.25 (mm) であった。

[0045] 注入の4週間後、マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で深く麻酔し、心臓経由で、4%ホルマリン及び0.1 Mリン酸塩緩衝液 (PB: pH 7.4) を灌流固定して脳を摘出した。クライオスタットを用いて切片を作製し、免疫染色法を用いて解析した。

[0046] その結果、FuG-Cベクターを注入したマウスでは、線条体の広い領域に免疫陽性シグナルが観察されたが、RV-Gベクターに比較して、その強度は顕著に低下した (図3 A)。更に、線条体に投射する脳領域の代表として、一次運動皮質 (M1)、一次体性感覚皮質 (S1)、視床束傍核 (PF)、黒質緻密部 (SNc) における導入遺伝子の発現を免疫染色法により解析した。大脳皮質については注入部位と同側および反対側の脳領域を、PFとSNcについては同側の脳領域を観察し (図3 B)、それぞれの領域の陽性細胞数を計測した (表2)。FuG-Cベクターの遺伝子導入効率は、すべての脳領域について、RV-Gベクターの導入効率よりも顕著に増加した (Student t-test, $p < 0.01$ or 0.05)。以上の結果から、FuG-Cベクターは逆行性輸送を介した神経細胞への遺伝子導入効率が向上していることが示唆された。

[0047] [表2]

レンチウイルスベクターによる逆行性遺伝子導入の効率

	Brain region					
	<i>M1</i>		<i>S1</i>		<i>PF</i>	<i>SNc</i>
	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>Contra</i>		
RV-G	61.2 ± 9.0	10.4 ± 2.3	59.6 ± 8.6	9.1 ± 1.8	121.2 ± 13.6	2.0 ± 0.4
FuG-C	246.6 ± 20.5 ^b	67.1 ± 3.6 [*]	248.8 ± 21.7 [*]	50.8 ± 4.4 [*]	191.6 ± 24.5 ^{**}	7.2 ± 0.7 [*]

*P < 0.01, **P < 0.05 vs RV-G (Student *t*-test)

[0048] 次に、FuG-Cベクターによる逆行性導入効率の向上を確認するために、種々の濃度のベクター溶液 ($3.0 \times 10^9 \sim 4.8 \times 10^{10}$ copies/ml) をマウス線条体に注入し、M1, S1, PF, SNcにおける陽性細胞数をカウントした (図4)。いずれの脳領域においても、FuG-Cベクターを注入した動物では、陽性細胞数は濃度依存的に明らかな上昇を示した。RV-Gベクター注入動物でも濃度依存性の細胞数の上昇はみられたが、その程度はFuG-Cベクターよりも低いものだった (two-way ANOVA)。これらの結果から、FuG-Cベクターは、RV-Gベクターに比較して明らかに高い逆行性輸送を介した遺伝子導入を可能にすることが示された。

実施例 3

[0049] 神経細胞への選択的遺伝子導入：

FuG-Cベクターの注入部位における神経細胞とグリア細胞への遺伝子導入効率を解析した。各ウイルスベクター (VSV-G, RV-G, FuG-C) (1.2×10^{10} copies/ml) をマウス線条体内に注入した後、脳切片を作製し溶液 (1.2×10^{10} コピー/ml) を実施例2と同様にマウスの線条体に注入後、線条体の切片を作製し、神経細胞のマーカーであるNeuNとGFPあるいはグリア細胞のマーカーであるGFAPとGFPの二重免疫染色を行った (図5)。線条体の神経細胞とグリア細胞

への遺伝子導入効率を評価するために、まず、全NeuN⁺細胞数あたりのGFP⁺/NeuN⁺二重陽性細胞数、及び、全GFAP⁺細胞数あたりのGFP⁺/GFAP⁺二重陽性細胞数の割合を求めた。GFP⁺/NeuN⁺二重陽性細胞数の割合は、VSV-G⁻、RV-G⁻、FuG-Cベクターで、それぞれ $81.7 \pm 2.9\%$ 、 $21.4 \pm 1.8\%$ 、及び $6.2 \pm 1.4\%$ であった ($n = 4$)。FuG-Cベクターの線条体神経細胞への遺伝子導入効率は、他のベクターに比較して顕著に低下したANOVA, Tukey HSD, $p < 0.001$ vs VSV-G, $p < 0.01$ vs RV-G)。一方、GFP⁺/GFAP⁺二重陽性細胞数の割合は、VSV-G⁻、RV-G⁻、FuG-Cベクターで、それぞれ $5.9 \pm 0.7\%$ 、 $71.5 \pm 3.6\%$ 、及び $0.3 \pm 0.03\%$ であった ($n = 4$)。したがって、グリア細胞への遺伝子導入はほとんど観察されなかった。これらの結果は、FuG-Cベクターは主に逆行性輸送を介して神経細胞へ選択的に遺伝子導入されることを示している。

実施例 4

[0050] 神経幹細胞へのベクターの遺伝子導入特性：

VSV-Gベクターは神経幹細胞への高い遺伝子導入効率を示すことが知られている。脳室周囲領域 (SVZ) に局在する神経幹細胞への各種ベクターの遺伝子導入特性について解析した。ウィルスベクター溶液 (1.2×10^{10} コピー/ml) をマウスのSVZに注入後、脳切片を作製し、神経幹細胞のマーカーとしてGFAPを用い、GFAPとGFPの二重免疫染色を行った (図6 A)。VSV-GあるいはRV-Gベクターを注入した場合、導入遺伝子の発現はSVZにおける多数のGFAP陽性神経幹細胞に観察された。一方、FuG-Cベクターを用いた場合は、これらの神経幹細胞への遺伝子導入はほとんど認められなかった。また、分裂性細胞を検出するために、BrdUを投与して標識し、1週間後に脳切片を作製しBrdUとGFPとの二重免疫染色をおこなった (図6 B)。VSV-GあるいはRV-Gベクターを注入した場合、導入遺伝子の発現はSVZにおける多数の分裂性細胞に観察されたが、FuG-Cベクターを用いた場合は、これらの分裂細胞への遺伝子導入はほとんど認められなかった。これらの結果から、FuG-Cベクターの神経幹細胞及び分裂細胞への遺伝子導入は非常に低頻度であることが示された。

[0051] 組織学的操作

アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法による免疫染色用に、クライオスタットを用いて横断切片（マウス用：厚さ30 μm ）を調製し、ウサギ抗GFAPポリクローナル抗体（Molecular Probes, Eugene, OR：1:2,000希釈）でインキュベートし、更に、ビオチニル化ヤギ抗ウサギIgG抗体（Vector Laboratories, Burlingame, CA：1:1,000希釈）とインキュベートした。免疫反応シグナルはVectastain Elite ABC キット（Vector Laboratories, Burlingame, CA）で視覚化した。

[0052] 二重免疫蛍光組織化学染色用に、切片を上記ウサギ抗GFAPポリクローナル抗体、及び、抗コリンアセチル転移酵素マウス抗体（Chemicon, Temecula, CA：1:100希釈）のいずれか一つとインキュベートした。次に、切片をFITC結合ヤギ抗ウサギIgG及びCy3-結合ロバ抗マウス抗体（1:500希釈、Jackson, ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）とインキュベートした。蛍光画像は、FITC及びCy3蛍光チャンネル用の適当なフィルターキューブ仕様を備えた共焦点レーザースキャニング顕微鏡（LSM510, Zeiss, Thornwood, NY）下で捉えた。これら蛍光画像はZeiss Axiovision ソフトウェアパッケージにより調節された高級CCDカメラシステムで撮影した。

[0053] 細胞計数

前脳及び中脳を通る一連の切片を使用して、上記のアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法による免疫染色を実施した。各脳領域における免疫染色された細胞の数はコンピュータ操作による画像プログラム（NIH Image 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD）で計測した。ベクター注入部位における線条体細胞の同定の為に、代表的な切片を用いて二重免疫蛍光組織化学染色を行った。各動物において、対象領域内の免疫染色細胞数を画像プログラムにより計測した。各動物からの8～10個の切片を使用して計測し、切片辺りの平均を計算した。

[0054] 本明細書中に引用される文献に記載された内容は、本明細書の一部として本明細書の開示内容を構成するものである。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の逆行輸送性ウィルスベクターは、主に逆行性輸送を介して神経細胞への選択的な遺伝子導入を可能とし、一方で、グリア細胞や神経幹細胞を含む分裂性細胞への導入は顕著に抑制される。本ベクターは中枢神経系における発がんのリスクを大幅に低下させ、神経細胞以外での非特異的な遺伝子発現による副作用を軽減させることができ、パーキンソン病等の脳神経疾患の遺伝子治療のために有効且つ安全性の高い技術を提供する。

更に、本発明は、脳神経疾患の遺伝子治療のための有効な且つ安全性の高い実験技術、及び、病態モデルの作製のための技術を提供するものである。

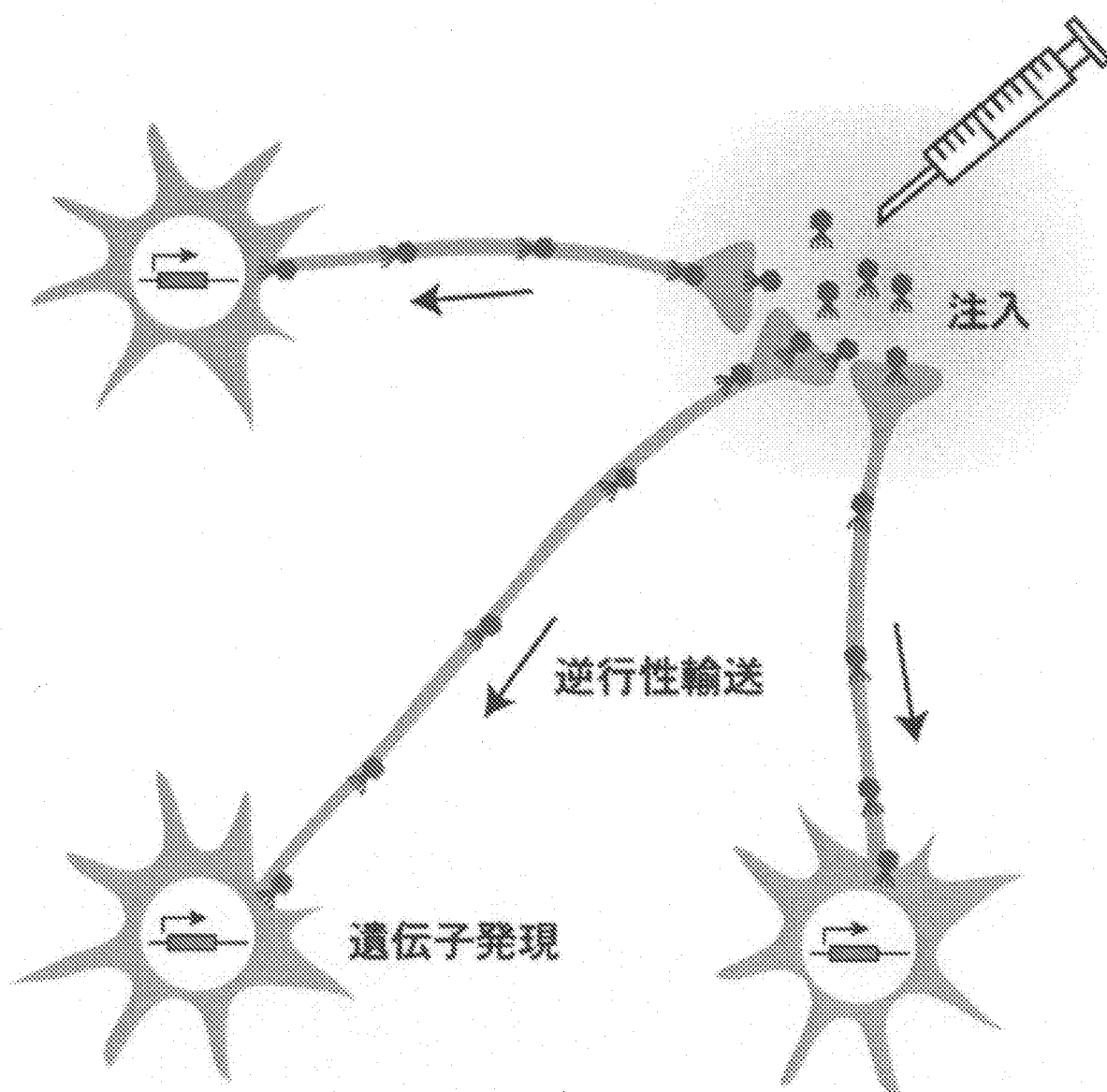
請求の範囲

- [請求項1] (1) HIV-1のgag 及びpol遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
(2) HIV-1のアクセサリ遺伝子を含むパッケージングプラスミド；
(3) 目的遺伝子を含むトランスファープラスミド；及び
(4) エンベロープ遺伝子として、狂犬病ウィルスの糖タンパク質（RV-G）の細胞外ドメインのN末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質（VSV-G）の細胞外ドメインのC末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G又はVSV-Gの膜貫通ドメイン、並びに、VSV-Gの細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を含むエンベローププラスミド、を含む逆行輸送性ウィルスベクター調製用キット。
- [請求項2] 融合ポリペプチドが配列番号2又は配列番号6に示されたアミノ酸配列を有し、パッケージングプラスミド（1）がpCAGkGP1.1Rであり、パッケージングプラスミド（2）がpCAG4-RTR2であり、且つ、トランスファープラスミドがpCL20c-MSCV-X（ここで、「X」は目的遺伝子を示す）であることを特徴とする、請求項1記載のウィルスベクター調製用キット。
- [請求項3] エンベローププラスミドにおいて、エンベロープ遺伝子がサイトメガロウィルスエンハンサー及びトリβアクチンプロモーターの制御下で発現する、請求項1又は2記載のウィルスベクター調製用キット。
- [請求項4] 融合ポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列が配列番号1に示されたものである、請求項3記載のウィルスベクター調製用キット。
- [請求項5] 目的遺伝子がヒトの遺伝子である、請求項1～4のいずれか一項に記載ウィルスベクター調製用キット。
- [請求項6] 目的遺伝子が脳神経疾患治療用の遺伝子である、請求項5に記載のウィルスベクター調製用キット。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載のウィルスベクター調製用キット

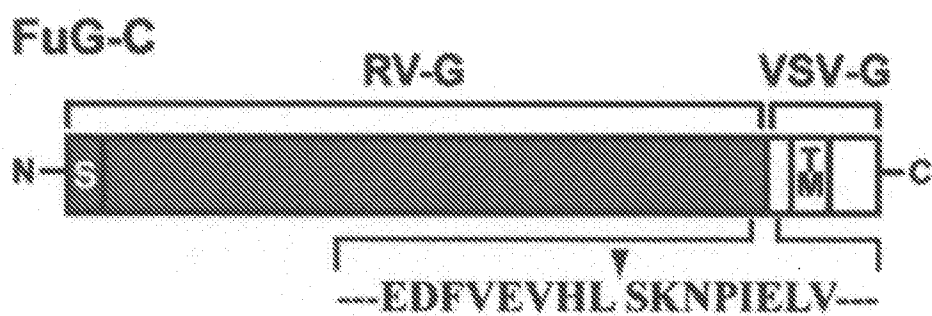
- 、及び、宿主細胞を含む、プロデューサー細胞作製用キット。
- [請求項8] 感染細胞がHEK293T細胞である、請求項7記載のキット。
- [請求項9] 請求項1～6のいずれか一項に記載のウィルスベクター調製用キットに含まれる、パッケージングプラスミド、トランスファープラスミド、及び、エンベローププラスミドを感染細胞にコトランスフェクションさせることから成る、プロデューサー細胞の作製方法。
- [請求項10] 感染細胞がHEK293T細胞である、請求項9記載の作製方法。
- [請求項11] リン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションする、請求項9又は10記載の作製方法。
- [請求項12] 請求項9～11で得られたプロデューサー細胞。
- [請求項13] 請求項12記載のプロデューサー細胞を培養し、培養上清からウィルス粒子を回収することからなる、ウィルスベクターの製造方法。
- [請求項14] 請求項13記載の方法によって製造された、神経細胞への選択的な逆行性輸送能を有するウィルスベクター。
- [請求項15] 請求項14記載のウィルスベクターを動物の神経終末部に感染させ、該ウィルスベクターが該神経の軸索を逆行性に輸送されることにより脳内の標的領域にある該神経の神経細胞体に選択的に導入し、目的とする遺伝子を該神経細胞体内で発現させることから成る、遺伝子導入方法。
- [請求項16] 神経終末部が線条体にあり、脳内の標的領域が線条体に投射する脳中枢領域である、請求項15記載の遺伝子導入方法。
- [請求項17] 線条体に投射する脳中枢領域が一次運動皮質、一次体性感覚皮質、視床束傍核、及び／又は、黒質緻密部である、請求項16記載の方法。
- [請求項18] 腹側線条体（側坐核）に投射する脳中枢領域が梨状皮質、鉤状回、扁桃体基底外側核、室傍核前部、視床背内側核、及び／又は、外側視床下部である、請求項16記載の方法。
- [請求項19] 動物が哺乳類である、請求項15～18のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項20] 哺乳類が霊長類である、請求項 1 9 記載の方法。
- [請求項21] 哺乳類がヒトである、請求項 2 0 記載の方法。
- [請求項22] 請求項 1 5 記載のウィルスベクターを活性成分として含有する、遺伝子治療剤。
- [請求項23] 請求項 1 5 ～ 2 1 記載の方法で導入された目的遺伝子が標的領域における細胞の染色体に組み込まれ発現することを含む、脳疾患の遺伝子治療方法。
- [請求項24] 請求項 2 1 記載の遺伝子治療剤を患者に投与することを含む、請求項 2 2 記載の治療方法。
- [請求項25] 脳疾患がパーキンソン病である、請求項 2 3 又は 2 4 記載の治療方法。
- [請求項26] 狂犬病ウィルスの糖タンパク質 (RV-G) の細胞外ドメインの N 末端領域及び水泡性口内炎ウィルスの糖タンパク質 (VSV-G) の細胞外ドメインの C 末端領域から成る融合細胞外ドメイン、RV-G 又は VSV-G の膜貫通ドメイン、並びに、VSV-G の細胞内ドメインを含む融合ポリペプチドから成る、レンチウィルスベクターのシュードタイプ化用のエンベロープ。
- [請求項27] レンチウィルスベクターが HIV-1 レンチウィルスである、請求項 2 6 記載のエンベロープ。
- [請求項28] 請求項 2 6 又は 2 7 記載の融合ポリペプチドから成るエンベロープをコードする遺伝子。
- [請求項29] 請求項 2 8 記載の遺伝子を含むエンベローププラスミド。

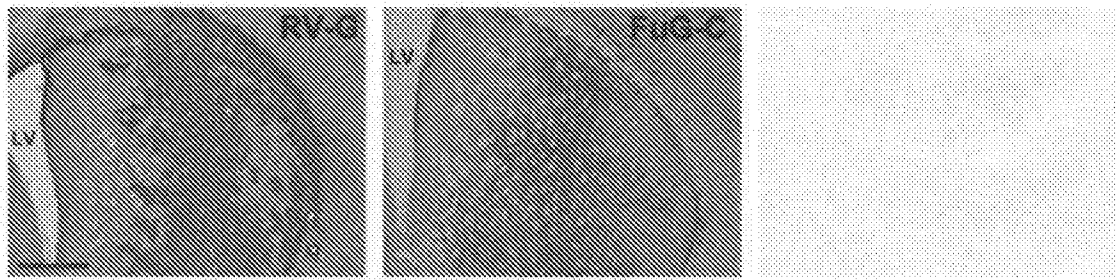
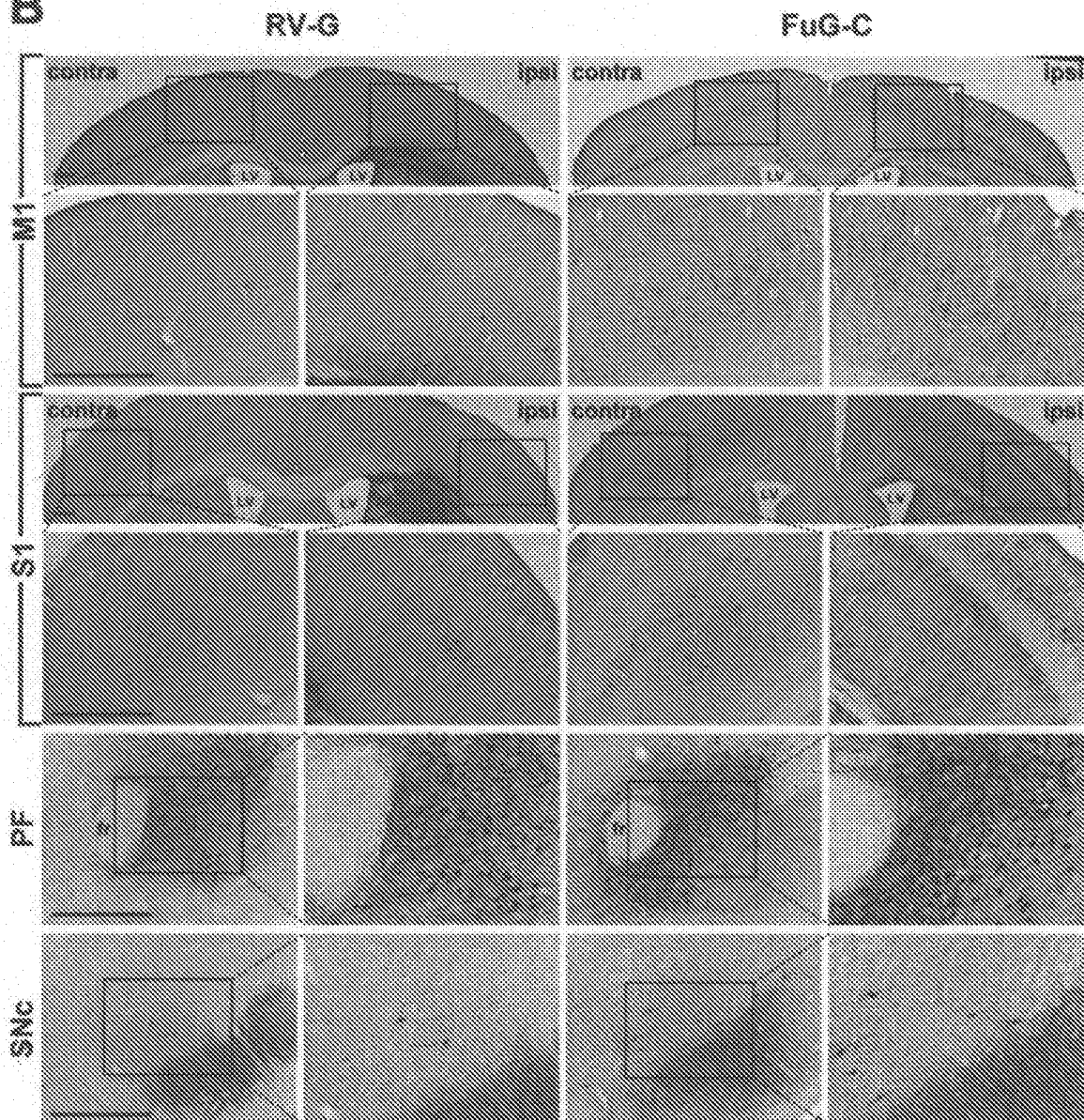
[図1]



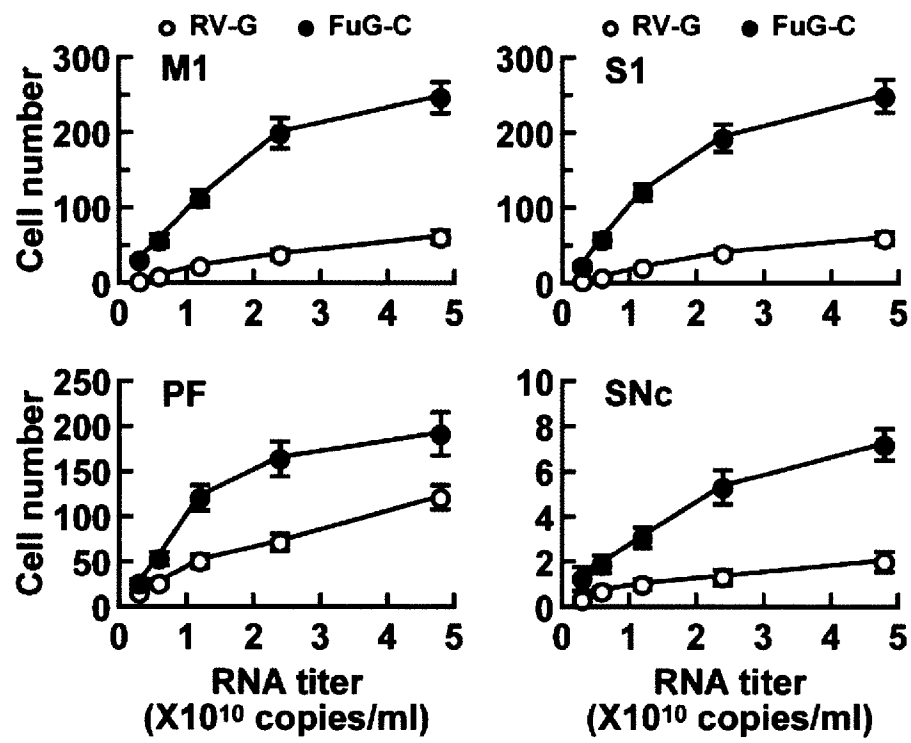
[図2]



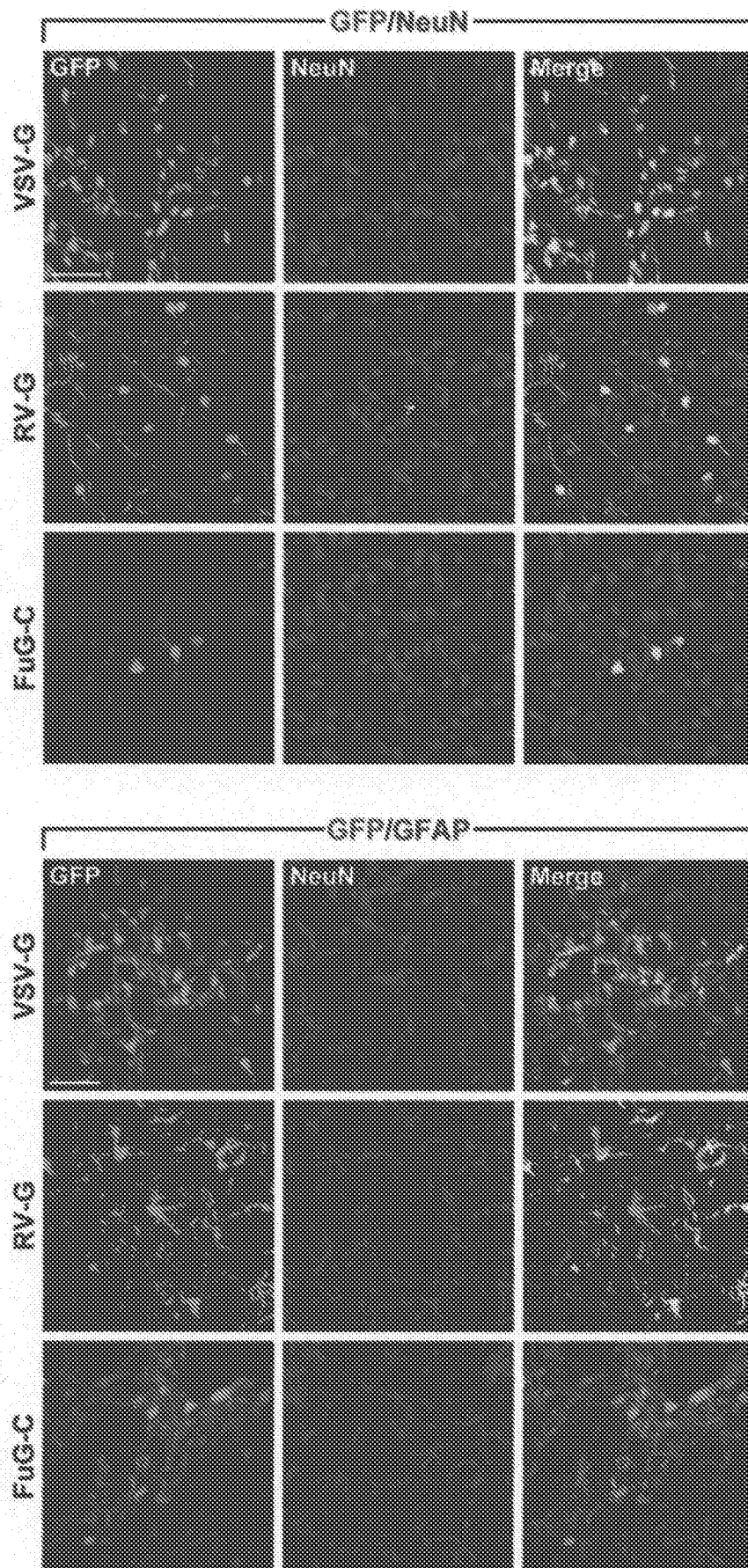
[図3]

A**B**

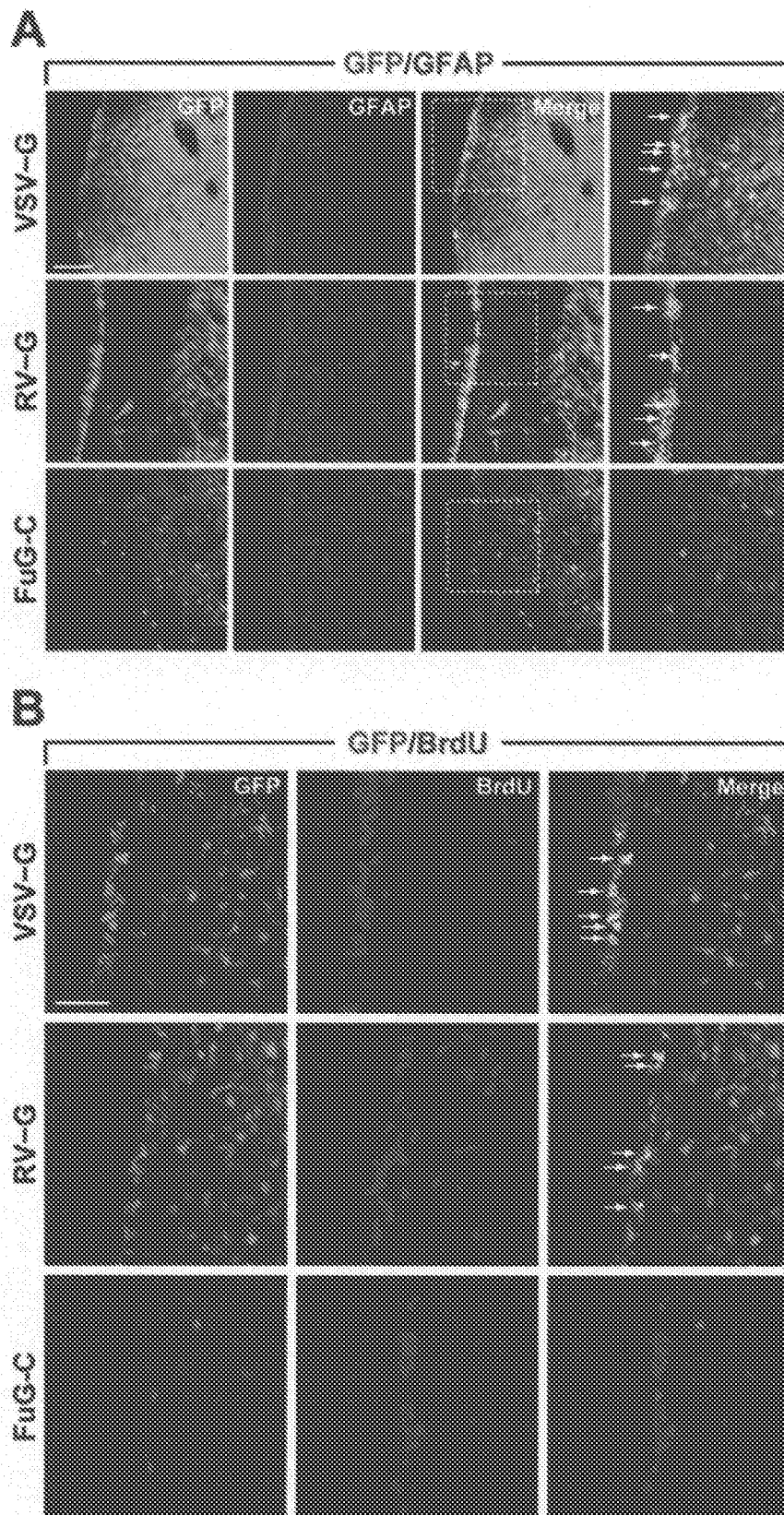
[図4]



[図5]



[図6]



[図7]

ATGGTTCCGCAGGTTCTTTTGTGTTGTACTCCTTCTGGGTTTTTCGTTGTGTTTCGG
 GAAGTTCCCATTTACACGATACCAGACGAACCTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGAC
 ATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGTACCA
 ACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAA
 AGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAAC
 TTTGTTGGTTATGTCAACAACCACATTTAAGAGAAAGCATTTCGCCCCACCCCAGA
 CGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGA
 GTCCCTACACAATCCATACCCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAGAACCACC
 AAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACA
 AATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACGGTGTC
 CTCTACCTACTGCTCAACTAACCATGATTACACCATTTGGATGCCCAGAAATCCGA
 GACCAAGGACACCTTGTGACATTTTTACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCATCCAA
 CGGGAACAAGACTTGCGGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAA
 GGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTGGACTTAGACTTATGGATGGAA
 CATGGGTTCGCGATGCAAACATCAGATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCAGTT
 GGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCTCGTTGTGGAGGAG
 TTAGTCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACCA
 AGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACCTGTCCCAGGGTTTGG
 AAAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTGATGCTCACTACAAG
 TCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCCCCTCAAAGGGTGTGTTGAAAGTTGGAG
 GAAGGTGCCATCCTCATGTGAACGGGGTGTGTTTTCAATGGTATAATATTAGGGCC
 TGACGACCATGTCCTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATG
 GAGTTGTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCTGGCAGACCCTTCTA
 CAGTTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGTTCACCTCTCCAAA
AATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTCTT
TATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTCATTAAAT
TAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATA GAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA

太字：RV-G 細胞外ドメインN末端領域

四角枠：VSV-G 細胞外ドメインC末端領域

下線：VSV-G 膜貫通ドメイン

二重下線：VSV-G 細胞内ドメイン

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N7/02(2006.01)n

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)

C12N15/00, A61K35/76, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/16, C12N5/10, C12N15/09, C12N7/02

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KITAGAWA, R. et al., Differential characteristics of HIV-based versus SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene, Neuroscience Research, 2007, Vol.57, pages 550-558.	1-18, 22, 26-29
A	DESMARIS, N. et al., Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins, MOLECULAR THERAPY, August 2001, Vol.4 No.2, pages 149-156.	1-18, 22, 26-29



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

17 January, 2012 (17.01.12)

Date of mailing of the international search report

24 January, 2012 (24.01.12)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077142

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-034029 A (Japan Science and Technology Agency), 19 February 2009 (19.02.2009), entire text (Family: none)	1-18,22, 26-29
A	MAZARAKIS, N. D. et al., Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery, Human Molecular Genetics, 2001, Vol.10 No.19, pages 2109-2121.	1-18,22, 26-29
A	JP 2004-517057 A (OXFORD BIOMEDICA UK LTD.), 10 June 2004 (10.06.2004), entire text & WO 2002/036170 A2 & EP 1333863 A2 & US 2004/071675 A1 & JP 2008-303215 A	1-18,22, 26-29
A	KATO, S. et al., Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein, Human Gene Therapy, 2007, Vol.18 No.11, abstract.	1-18,22, 26-29
P,X	KATO, S. et al., Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein, Human Gene Therapy, 2011, Vol.22 No.12, abstract.	1-18,22, 26-29
P,A	KATO, S. et al., A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein, Human Gene Therapy, 2011, Vol.22 No.2, abstract.	1-18,22, 26-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077142

Box No. II 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.: 19-21, 23-25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19 to 21 and 23 to 25 involve methods for treatment of human being by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.
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 No. III 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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））			
Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N7/02(2006.01)n			
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（I P C））			
Int.Cl. C12N15/00, A61K35/76, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/16, C12N5/10, C12N15/09, C12N7/02			
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 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 2 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 2 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 2 年			
国際調査で使用了電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）			
CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq、PubMed、CiNii、WPI			
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 請求項の番号
A	KITAGAWA, R. et al., Differential characteristics of HIV-based versus SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene, Neuroscience Research, 2007, Vol.57, pages 550-558.		1-18, 22, 26-29
A	DESMARIS, N. et al., Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins, MOLECULAR THERAPY, August 2001, Vol.4 No.2, pages 149-156.		1-18, 22, 26-29
☒ 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 1 7 . 0 1 . 2 0 1 2		国際調査報告の発送日 2 4 . 0 1 . 2 0 1 2	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 白井 美香保 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8	4 N 4 5 0 2

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 請求項の番号
A	JP 2009-034029 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2009.02.19, 全文 (ファミリーなし)	1-18, 22, 26-29
A	MAZARAKIS, N. D. et al., Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery, Human Molecular Genetics, 2001, Vol.10 No.19, pages 2109-2121.	1-18, 22, 26-29
A	JP 2004-517057 A (OXFORD BIOMEDICA UK LTD) 2004.06.10, 全文 & WO 2002/036170 A2 & EP 1333863 A2 & US 2004/071675 A1 & JP 2008-303215 A	1-18, 22, 26-29
A	KATO, S. et al., Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein, Human Gene Therapy, 2007, Vol.18 No.11, abstract.	1-18, 22, 26-29
P, X	KATO, S. et al., Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein, Human Gene Therapy, 2011, Vol.22 No.12, abstract.	1-18, 22, 26-29
P, A	KATO, S. et al., A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein, Human Gene Therapy, 2011, Vol.22 No.2, abstract.	1-18, 22, 26-29

第Ⅱ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（P C T 17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. ☒ 請求項 19-21, 23-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 19～21 及び 23～25 は、人間を対象として治療する方法を含んでおり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 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Ⅲ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ろの国際調査機関は認めた。

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項について作成した。
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項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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ので、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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立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あったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。