(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4680385号
(P4680385)
(45)発行日　平成23年5月11日(2011.5.11)　(24)登録日　平成23年2月10日(2011.2.10)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/00	
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105

請求項の数 2　(全 13 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-570187 (P2000-570187)
(86)(22)出願日	平成11年9月10日 (1999.9.10)
(65)公表番号	特表2002-524568 (P2002-524568A)
(43)公表日	平成14年8月6日 (2002.8.6)
(86)国際出願番号	PCT/US1999/020723
(87)国際公開番号	WO2000/015649
(87)国際公開日	平成12年3月23日 (2000.3.23)
審査請求日	平成18年9月8日 (2006.9.8)
(31)優先権主張番号	60/099,896
(32)優先日	平成10年9月11日 (1998.9.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　597177242
トーマス・ジェファーソン・ユニバーシティ
Ｔｈｏｍａｓ　Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ
アメリカ合衆国１９１０７－５５８７ペンシルベニア州フィラデルフィア、ウォールナット・ストリート１０２０番
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＲＢ２／ｐ１３０を発現するベクターによる平滑筋細胞増殖の抑制および再狭窄の防止方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
血管再狭窄の予防および/または治療のための医薬の製造における、RB2/p130を発現するアデノウイルスベクターの使用。
【請求項２】
前記予防および/または治療が、前記アデノウイルスベクターを介したRB2/p130の局所的な動脈形質導入によるものである、請求項１に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
序論
本発明は、National Institutes of Healthの後援による調査の進行中になされた。合衆国政府は、本発明において一定の権利を有し得る。
【０００２】
発明の背景
心臓血管性疾患は、欧米諸国における主要死亡原因である（Ross, R. Nature 362, 801-809（1993）; Landau et al. N. Engl. J. Med. 330, 981-993（1994））。米国およびその他の工業国では、狭心症、心筋梗塞（ＭＩ）および突然死を引き起こす虚血性心臓疾患が死亡の主因として広がっており、心臓疾患による全死亡の少なくとも80％を構成する（Braunwald, E. In Heart disease:a textbook of cardiovascular medicine, Saunders W. B. Ed.,（1996））。虚血性心臓疾患の大多数は、冠動脈のアテローム動脈硬化症の結

果である（Ross, R. Nature 362, 801-809（1993））。閉塞性冠状動脈疾患（ＣＡＤ）の治療は、１）冠状動脈バイパス移植（ＣＡＢＧ）、２）経皮的経管的冠状動脈形成術（ＰＴＣＡ）（ステント適用または無適用）、および／または３）医学的管理を別々にまたは組合せて用いる３つのアプローチを包含する。ＰＴＣＡはＣＡＢＧより侵襲性が少なく、コスト有効性が高い一方で、それは多少の制限を有する。ＰＴＣＡの１つの欠点は、その処置の３～６ヶ月以内に30～50％という多数の症例に動脈の再狭窄が起こることである（Landau et al. N. Engl. J. Med. 330, 981-993（1994）; Braunwald, E. In Heart disease:a textbook of cardiovascular medicine, Saunders W. B. Ed.,（1996）; Serruys et al., Circulation, 77,361-71（1988）; Holmes et al. Am. J. Cardiol. 53, 77C-81C（1984）; Guiteras et al. Am. J. Cardiol. 60, 50B-55B（1987））。この技法の変法は、拡張動脈セグメントにおけるステント適用である。有望な予備報告後、さらなる研究により、長期においては、ステント－ＰＴＣＡ後の再狭窄のパーセンテージはＰＴＣＡ単独の場合と同様であることが実証された。実際、in-stent再狭窄はステント－ＰＴＣＡの高頻度合併症である（Beili, G., Ellis, S.G., Topol, E.J., Stenting for ischemic heart disease. In "progress in cardiovascular diseases", W.B. Sunders Ed. pp 159-182（1997））。再狭窄を妨止するための有効な治療は、一般的に利用可能でない。動脈壁に対する慢性または急性損傷（例えばＰＴＣＡによる）が、平滑筋細胞（ＳＭＣ）増殖および中膜から内膜への移動を刺激して、新内膜形成および結果的に生じる再狭窄を引き起こす種々の増殖因子および炎症サイトカインの発現を誘導する、ということは十分に実証されている（Clowes et al. Lab. Invest. 49, 208-215（1983））。新内膜形成の抑制は、ＣＡＤの長期管理におけるＰＴＣＡの有効性を大いに改善するはずである。多数の増殖因子が、in vitroおよびin vivoでの種々の信号伝達経路を介してＳＭＣ増殖を誘導する（Libby et al. Circulation 86（Suppl III）47-52（1992））。したがって、細胞周期機構のいくつかの調節タンパク質が、上流信号伝達分子の代わりに、血管増殖性障害の有効な細胞増殖抑制療法のための標的として示唆されている。例えば、Morishita等は、アンチセンスcdc2キナーゼおよび増殖中細胞核抗原オリゴヌクレオチドの１回管腔内送達が新内膜過形成の長期抑制を生じた研究を開示する（Proc. Acad. Natl. Sci. 90, 8474-8478（1993））。Chang等は、血管平滑筋細胞増殖の調節に際しての（網膜芽細胞腫）Ｒｂの役割を実証することを示唆し、動脈損傷に関連した血管増殖障害のための遺伝子療法アプローチを示唆する研究からの結果を開示する（Science, 267, 518-522（1995））。Smith等も、血管平滑筋増殖および新内膜形成に及ぼすそれらの作用に関する全長リン酸化コンピテントおよび突然変異体切頭形態のヒトＲｂの作用を分析した（Circulation 1997, 96（6）1717-9）。これらの分析は、全長または切頭形態のいずれかの血管平滑筋細胞における高レベルのリン酸化コンピテントヒトＲｂの保持が、血管損傷に誘導されたバルーン後に起こる内膜過形成の程度を調節する有効な方法である、ということを明らかにするために教示されている（Circulation, 96, 1899-1905（1997））。

【０００３】

網膜芽細胞腫族の別の成員であるRB2/p130も、細胞周期機能において調節的役割を有することが示されている。Baldi等は、RB2/p130遺伝子生成物のリン酸化が、Ｒｂのリン酸化が細胞周期依存性である（DeCaprio et al. Cell 58:1085-1095（1989））同一方法で、細胞周期依存的方法で調節されることを示した（Baldi et al. J. Cell. Biochem. 59:402-408（1995））。さらに、RB2/p130の遺伝子生成物の増殖抑制特性は、ｐＲｂおよびp107と同様の方法でG_1期に特異的であることが示されている（Claudio et al. Cancer Res. 56:2003-2008（1996））。RB2/p130の遺伝子生成物は、Ｒｂ族の他の成員（即ち、ｐＲｂおよびp107）と類似の方法で、ヒト腫瘍細胞株における増殖を阻止することも示されている。しかしながら、このタンパク質は、ｐＲｂおよびp107の両方の増殖抑制作用に耐性である神経膠芽細胞腫細胞株における増殖も抑制する（Claudio et al. Cancer Res. 54:5556-5560（1994））。したがって、RB2/p130は、ｐＲｂおよびp107と類似のさらに示差的な増殖抑制特性を有する（Claudio et al. Cancer Res. 54:5556-5560（1994））。

【０００４】

血管形成術時のウイルスベクターによるRB2/p130の局在化動脈形質導入は、新内膜過形成を徹底的に低減し、再狭窄を防止する、ということが目下判明している。さらに、増殖を遮断するRB2/p130の能力は、細胞周期進行の重要なメディエーターであるＥ２Ｆ族の転写因子を結合し、封鎖するその能力と相関する。したがって、RB2/p130は、血管遺伝子療法のための重要な標的であると考えられる。

【０００５】

発明の要約

本発明の目的は、血管平滑筋細胞増殖を抑制する方法であって、RB2/p130を発現するベクターで血管平滑筋細胞を形質導入することを包含する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、再狭窄の防止方法であって、RB2/p130を発現するウイルスベクターを患者に投与することを包含する方法を提供することである。

【０００６】

発明の詳細な記載

新内膜形成を生じる平滑筋細胞（ＳＭＣ）増殖は、アテローム動脈硬化症の病因に関与し、冠状動脈疾患（ＣＡＤ）のための広範な治療である、ステント適用を用いたまたは用いない経皮的経管的冠状動脈形成術（ＰＴＣＡ）後の高率の再狭窄を説明する。内皮病変は内皮下のＳＭＣへの強力な増殖信号の引き金となり、休止G_0状態から細胞周期に再び入るのを刺激し、新内膜形成および血管閉塞を引き起こす。細胞増殖は、増殖調節および／または腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば網膜芽細胞腫（Ｒｂ）遺伝子族成員（RB2/p105、p107、RB2/p130）により負制御される。

【０００７】

したがって、網膜芽細胞腫族タンパク質（pRb/p105、p107およびRB2/p130）は、血管疾患遺伝子療法のための優れた候補である。それらは、Ｅ２Ｆ転写因子族（Ｅ２Ｆ１－５）の特定の成員と相互作用する増殖抑制特性を有するリンタンパク質であって、細胞周期依存的方法でリン酸化／脱リン酸化事象により調節される（Weinberg, R.A., Cell 85, 457-459（1996）;およびNevins et al. J. Cell. Physiol. 173, 233-236（1997））。RB2/p130発現増殖の誘導は、細胞周期機構の活性と直接相互作用し、それを調節することにより細胞周期のG_0／G_1期における増殖中細胞を阻止することを、種々の研究は示している（Claudio et al. Cancer Research 54, 5556-5560（1994）; Claudio et al. Cancer Res. 56, 2003-2008（1996）;およびDe Luca et al. J. Biol. Chem. 272, 20971-20974（1997））。さらに、RB2/p130発現の誘導は、Ｒｂ族成員pRb/p105およびp107の作用に無反応性であるある種の細胞株における細胞増殖を阻害する（ Claudio et al. Cancer Research 54, 5556-5560（1994）;およびDe Luca et al. J. Biol. Chem. 272, 20971-20974（1997））。RB2/p130のアデノウイルス媒介性形質導入はin vivoおよびin vitroでのＳＭＣ増殖を遮断する、ということが目下判明している。さらに、RB2/p130は、ＳＭＣにおけるＥ２Ｆ４の増殖促進性転写活性と優先的に相互作用し、封鎖する、ということが現在示されている。

【０００８】

アデノウイルスは、in vivoで細胞に導入遺伝子を送達するための有効且つ効率的ベクターとして役立つことが示されている。したがって、これらの実験では、血管形成術後の再狭窄を防止するために、アデノウイルス媒介性RB2/p130遺伝子導入を用いて、急性損傷後の動脈平滑筋の増殖能力を検査させた。

肺動脈平滑筋細胞株（ＰＡＳＭ）の増殖に及ぼすRB2/p130遺伝子のウイルス形質導入の作用を調べた。ＰＡＳＭ細胞株はＳＭＣから多数の弁別マーカーを発現し、したがって良好な範例であると考えられる（Roberts et al. EMBO J. 15, 6301-6310（1996）;Rothman et al. Circulation. 86, 1977-1986（1992）
）。これらの実験では、ＰＡＳＭ細胞を1 X 10^3の密度で直径10 cmの皿に三通りに入れて、50 pfu/細胞のＡｄ－ＣＭＶまたはＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130で形質導入した。トリパンブルー排除法により１週間に亘って毎日計数して、それらの増殖率をモニタリングした。Ａｄ－ＣＭＶ－RB2/p130で形質導入されたＰＡＳＭ細胞では、増殖率は、Ａｄ－ＣＭＶ形

質導入化細胞の場合と比較して、５分の１に抑制された。

【０００９】

Ａｄ－ＣＭＶ－RB2/p130およびＡｄ－ＣＭＶ形質導入化細胞におけるRB2/p130の発現レベルを測定するために、細胞を１週間に亘って毎日収穫し、ウエスタンブロット分析を抽出物で実施した。各々の時点で、RB2/p130の発現は、Ａｄ－ＣＭＶ－RB2/p130では、Ａｄ－ＣＭＶ形質導入化細胞の場合の～200倍であった。抗βチューブリンで膜をブロッティングし、ならびにクーマシーブリリアントブルーで膜を染色することにより、ブロットをタンパク質の等しい負荷および導入に関して標準化した。

【００１０】

肺動脈平滑筋細胞株（ＰＡＳＭ）の増殖に及ぼす異なる量のアデノウイルス粒子の作用も調べた。この実験では、ＰＡＳＭ細胞を1 X 10^5の密度で直径10 cmの皿に三通りに入れて、5、10または50 pfu/細胞のＡｄ－ＣＭＶ、Ａｄ－ＣＭＶ－β－ＧａｌまたはＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130で形質導入した。トリパンブルー排除法により5日間に亘って毎日計数して、それらの増殖率をモニタリングした。10または50 MOIのＡｄ－ＣＭＶ－Rb2/p130で形質導入されたＰＡＳＭ細胞では、増殖率は、Ａｄ－ＣＭＶおよびＡｄ－ＣＭＶ－β－Ｇａｌ形質導入化細胞の場合と比較して、ほぼ4分の１に抑制された。Ａｄ－ＣＭＶ感染ＰＡＳＭ細胞における細胞計数は、Ａｄ－ＣＭＶ－β－Ｇａｌ感染細胞の場合に匹敵することが判明した。50 MOIでのアデノウイルスへの培養細胞の曝露が毒性に関連し得るか否かを試験するために、ＰＡＳＭ細胞を、50 MOIのＡｄ－ＣＭＶ、Ａｄ－ＣＭＶ－β－ＧａｌまたはＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130で形質導入して、48時間後に、Ｆａｃｓ分析のために試料を加工処理した。３つのアデノウイルスのいずれかへのＰＡＳＭ細胞の曝露は、明らかな細胞傷害性を引き起こさない、ということが観察された。さらに、RB2/p130の過剰発現は、対照（Ａｄ－ＣＭＶおよびＡｄ－ＣＭＶ－β－Ｇａｌ）形質導入化細胞と比較して、細胞のG_{10}蓄積を引き起こした。

【００１１】

RB2/p130は、Ｅ２Ｆ族成員とin vivoで会合し、ＰＡＳＭ細胞における細胞周期を促す遺伝子をトランス活性化するそれらの能力を抑制することも示された。in vivoRB2/p130はＥ２Ｆ４およびＥ２Ｆ５と会合し、それにより細胞周期進行を促す遺伝子をトランス活性化するそれらの能力を抑制する（Sardet et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2403-2407（1995））。網膜芽細胞腫族のタンパク質の増殖抑制機能は少なくとも一部は、それらの結合ならびに転写因子のＥ２Ｆ族の特定の成員の負調節により起こると考えられるため、Ａｄ－ＣＭＶ－Rb2/p130またはＡｄ－ＣＭＶ細胞に感染したＰＡＳＭ細胞中のＥ２Ｆ複合体を分析した。これらの実験では、ＰＡＳＭ細胞を2 X 10^6の密度で入れて、50 pfu/細胞の濃度でのアデノウイルスＡｄ－ＣＭＶまたはＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130で形質導入し、48時間後に収穫した。［^{32}Ｐ］－γｄＣＴＰで標識したＥ２ＦＤＮＡ結合配列のオリゴヌクレオチドプローブを用いた電気泳動移動度シフト検定（ＥＭＳＡ）により、冷野生型オリゴヌクレオチドと効率よく競合するが、しかしＤＮＡと結合するＥ２Ｆを妨げる点突然変異化オリゴヌクレオチドとは競合しないＥ２Ｆ複合体を検出した。RB2/p130を特異的に認識する抗体とのインキュベーションにより、ならびにＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130およびＡｄ－ＣＭＶ形質導入化細胞の両方においてＥ２Ｆ４を特異的に認識する抗体により、Ｅ２Ｆ複合体のバンドを過シフト化した。RB2/p130抗体のインキュベーションにより、Ａｄ－ＣＭＶ－RB2/p130感染細胞においてほぼ全部のＥ２Ｆ複合体がシフトされたが、これは、ほとんどのＥ２ＦがこれらのRB2/p130により結合されることを示している。しかしながら、Ａｄ－ＣＭＶ形質導入化細胞では、Ｅ２Ｆ複合体の小分画のみがRB2/p130抗体により過シフト化された。これは増殖中のＰＡＳＭ細胞中でのRB2/p130の低内因性発現レベルを反映している。これは、Ａｄ－ＣＭＶ－RB2/p130による平滑筋細胞の形質導入とその結果生じるRB2/p130の高レベルの発現がＥ２Ｆ活性を効率的に封鎖し、それにより増殖素子をもたらし得る豊富なRB2/p130を提供する。さらに、Ｅ２Ｆ複合体のバンドは、Ｅ２Ｆ４を認識する抗体とのインキュベーションにより過シフト化された。

【００１２】

形質導入後のＥ２Ｆ族成員の発現も調べた。発現レベルのＥ２Ｆ５は、RB2/p130を保有するアデノウイルスまたはアデノウイルス対照によりもたらされないことが判明した。その代わりに、Ｅ２Ｆ４の発現がRB2/p130の過剰発現時に下方調節されたが、これは、ＰＡＳＭ細胞におけるその過剰発現がタンパク質不安定性および分解に対してＥ２Ｆ４を標的化するかまたはその転写を抑制した、ということを示している。

【００１３】

G_0／G_1移行中の内因性Ｅ２Ｆ活性は大多数が、Ｅ２Ｆ４に由来する（Cobrinik et al. Genes & Development. 7, 2392-2404（1993））。実際、細胞周期のG_1期中は、Ｅ２Ｆ４が遊離活性のほとんどすべてを占める。Ｓ期中は、Ｅ２Ｆ４とＥ２Ｆ１の等混合物は遊離Ｅ２Ｆ活性を包含する（Moberg et al. Mol. & Cell. Biol. 16, 1436-1449（1996））。一次マウス繊維芽細胞においてG_0～G_1期に検出されるＥ２Ｆの主形態は、RB2/p130と結合したＥ２Ｆ４であり、これは次に、後期G_1にp107Ｅ２Ｆ４により置換される（Cobrinik et al. Genes & Development. 7, 2392-2404（1993）; Moberg et al. Mol. & Cell. Biol. 16, 1436-1449（1996））。したがって、RB2/p130は、静止または休止中の細胞におけるＥ２Ｆ活性の主要な負のモジュレーターであり、バルーン血管形成術後の細胞増殖および内膜肥厚を抑制する可能性を提供する。

【００１４】

バルーン損傷の２週間後の新内膜形成に及ぼすRB2/p130形質導入の作用は、再狭窄のラット頸動脈モデルでin vivoで分析された（Indolfi et al. Nature Med. 3, 775-779（1997）; Indolfi et al. Nature Med. 1, 541-545（1995））。Ａｄ－ＣＭＶを注入された動物群では、メチレンブルーで染色した半薄切切片により示されるような再現可能な新内膜形成が観察された。内部弾性薄板の妨害を伴う数層の平滑筋細胞の存在のための内膜厚の増大が認められた。これは、左頸動脈（Ｌｕ＝758.8μｍ±41.85、Ｔｈ＝57.4μｍ±1.2）と比較した場合に、管腔（Ｌｕ）の厚みの大幅な低減（276.4μｍ±25.4）、そして反対に、頸動脈の中膜、内膜層（Ｔｈ）の厚みの増大（308μｍ±74）を生じた。電子顕微鏡によれば、Ａｄ－ＣＭＶで処理されたラットの新内膜は、ほとんどすべてが、細網繊維を含めた細胞内基質に浸漬された平滑筋細胞の層から成るように見え、新血管形成のいかなる痕跡も伴わなかった。

【００１５】

Ａｄ－RB2/p130で処理した群では、新内膜形成は、損傷後14日目に高度に抑制された。Ａｄ－RB2/p130（Ｌｕ＝712.38μｍ±117.36）で還流した右頸動脈の管腔は、左非損傷側（Ｌｕ＝652.63μｍ±87.23）に匹敵した。Ａｄ－RB2/p130（Ｔｈ＝60.5μｍ±6.18）で処理した動脈壁および正常非損傷左側（Ｔｈ＝64.8μｍ±8.68）との間に本質的な差は認められなかった。Ａｄ－ＣＭＶまたはＡｄ－RB2/p130で処理した動物群間の差は、統計学的に有意であることが判明した（P<.01）。しかしながら、管腔サイズまたは動脈厚の統計学的有意差は、Ａｄ－RB2/p130で処理した右頸動脈または左未処理頸動脈間には認められず、このことは、RB2/p130がin vitroと同様にin vivoにおける平滑筋細胞の増殖能力を大いに抑制したことを示す。電子顕微鏡によって、Ａｄ－RB2/p130で処理した頸動脈の内膜層は内皮細胞だけから成る、ということが実証された。Ａｄ－RB2/p130処理頸動脈の形態学的局面を、対側非損傷側と比較した。メチレンブルーで染色され、光学顕微鏡で観察された左頸動脈（対照）の横断半薄切片は、正常厚の動脈壁、ならびにＡｄ－RB2/p130処理頸動脈と同一の電子顕微鏡により測定されたような管腔を限定する典型的内皮細胞を示した。

【００１６】

in vivoでの形質導入後のRB2/p130の発現レベルも、免疫組織化学により調べた。Ａｄ－RB2/p130で処理した頸動脈の切片は、左正常非損傷側と比較した場合、高レベルのRB2/p130を示したが、このことは、RB2/p130のin vivoアデノウイルス遺伝子導入および２週間後の形質導入化遺伝子の構成的高発現を実証する。核pRb2/p130染色に対して陽性の単一細胞を同定することにより、ならびにＡｄ－β－Ｇａｌ感染血管中の高発現レベルのβ－ガラクトシダーゼ導入遺伝子により、遺伝子導入の効能を確定した。

【００１７】
したがって、本発明は、 RB2/p130を包含するウイルスベクターにより、血管ＳＭＣ増殖を抑制するための、そして患者における再狭窄を防止するための方法を提供する。好ましい実施態様では、RB2/p130ｃＤＮＡは、当業界で周知のプラスミド構築の方法にしたがって、アデノウイルスベクター中にサブクローニングされる。しかしながら、当業者に明らかなように、本開示に関しては、本明細書中に記載した以外のベクターが充当する。例えば、一実施態様では、一過性３プラスミド系（env、gag-polおよびRB2/p130をコードするプラスミド）が調製され得る。この実施態様は、RB2/p130の全長ｃＤＮＡ配列がベクター中でサブクローニングされるレトロウイルスベクターを用いることを包含する。適切なベクターの選択は、最小ウイルス遺伝子発現を伴う遺伝子の適切な発現を基礎にする。
【００１８】
細胞をベクターと接触させることにより、RB2/p130をコードするウイルスベクターは次に、血管平滑筋細胞中に形質導入される。これは、当業者に既知の方法を用いて成し遂げられ得る。好ましい実施態様では、ウイルスベクターは、哺乳類、好ましくはヒトに投与される。一実施態様では、RB2/p130遺伝子を含有するベクターは、血管平滑筋細胞増殖を抑制し、この細胞の増殖サプレッサー遺伝子の発現による再狭窄を防止するために投与される。この実施態様では、形質導入の方法は、好ましくは動脈への動脈内注射により実施される。血管形成術後の再狭窄を防止するためには、RB2/p130を発現するウイルスベクターが前記の処置時点で患者に投与されるのが好ましい。
【００１９】
ウイルスベクターは、注射のための製薬上許容可能な担体、例えば滅菌水性溶液または分散液中で投与されるのが好ましい。処置の用量および継続時間は、改善の程度および速度によって別々に決定される。このような決定は、当業者によりルーチンに実施される。
以下の実施例は、本発明をさらに説明するために提供され、本発明を限定するものではない。
【００２０】
実施例
実施例１：プラスミド
HindIII-Sal I消化を用いてpCDNA3-RB2/p130からRB2/p130遺伝子を放出し、それをHindIIIで消化したpAdCMVLink-1中に挿入することにより、RB2/p130遺伝子の全長ＯＲＦをpAdCMVlink-1ベクター中でサブクローニングした（Claudio et al. Cancer Research 54, 5556-5560（1994）; Davis, A.R. and Wilson, J.M. Adenovirus Vectors, Dracopoli et al. Eds. In Current Protocols in Human Genetics 2, Unit 12.4（1996））。構築物pAdCMVLink-1-βgalは、以前に記載されている（ Davis, A.R. and Wilson, J.M. Adenovirus Vectors, Dracopoli et al. Eds. In Current Protocols in Human Genetics 2, Unit 12.4（1996））。ベクターpAdCMVLink-1は、アデノウイルス５配列コードマップ単位０～１、サイトメガロウイルス直接初期エンハンサー／プロモーター素子、SV40スプライス供与体／受容体部位イントロン、SV40ポリアデニル化信号、アデノウイルス５配列コードマップ単位９～１６、合成多重クローニング部位およびpAT153プラスミドからの配列を含有する。
【００２１】
実施例２：細胞株
293個の細胞（一次胎芽ヒト腎細胞）およびＰＡＳＭ（肺動脈平滑筋）細胞を、10％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）およびＬ－グルタミンを含有するＤ－ＭＥＭ中に保持した。
実施例３：アデノウイルス産生および形質導入
ＡｄＣＭＶ－RB2/p130、ＡｄＣＭＶおよびＡｄＣＭＶ－βｇａｌを、以下のようにして生成した。アデノウイルスシャトルプラスミド（ＣＭＶプロモーターの後ろにRB2/p130またはLac-Z遺伝子の挿入を伴うpAdCMVlink-1）およびＧＦＰ選択マーカーを含有するClaI消化Ａｄ５ＤＮＡ（「ウイルス主鎖」）を293個の一次胎芽ヒト腎細胞中に同時トランスフェクトすることにより、組換え体アデノウイルスを構築した。293個の細胞は、トランス

でＥＩ機能を供給するパッケージング細胞株として役立てる。相同的組換えは、制限化Ａｄ５ウイルスＤＮＡ（「ウイルス主鎖」）とシャトルプラスミド（pAdCMVLink-1-RB2/p130）との間の領域ＥＩで、重複の領域で起こる。トランスフェクション後、293個の細胞に寒天含有培地を被せて、約10日後、可視的プラークを倒立蛍光顕微鏡を用いて検査した。非蛍光または「白色」プラークは、バックグラウンドまたは「緑色」プラークから容易に区別された。293個の細胞の感染により白色プラークを拡張させ、完全細胞障害作用の出現後、Hirtの方法の変法によりＤＮＡを調製した（Arad, U. Biotechniques 24, 761-762（1998））。制限酵素分析により、ＤＮＡ組換え体アデノウイルスを制御した。次に、RB2/p130を特異的に認識する抗体を用いたRB2/p130の発現レベルに関するウエスタンブロット分析により、組換え体アデノウイルスをスクリーニングした（Baldi et al. J. Cell. Biochem. 59, 402-408（1995））。RB2/p130の最高発現を示した組換え体アデノウイルスは、１回以上精製され、293個の細胞の感染により拡張されたプラークであった。ＣｓＣｌを用いた連続平衡密度勾配により、上清中のアデノウイルスの精製を実施した（Davis, A.R. and Wilson, J.M. Adenorirus Vectors, Dracopoli et al. Eds. In Current Protocols In Human Genetics 2, Unit 12.4（1996））。精製ウイルスを、-80℃で、10％グリセロールを含有する溶液中に保存した。光学密度を測定し、ウイルスストックを5 X 10^{12}粒子／mlで作製した。Ａｄ－ＣＭＶおよびＡｄ－ＣＭＶ－RB2/p130ウイルスに関するプラーク検定により、22 X 10^{9} pfu/mlのウイルス力価を確定した。Ａｄ－β－ｇａｌウイルスに関しては、40 X 10^{9} pfu/mlのウイルス力価を確定した。非許容細胞（ＥＩ機能を欠く細胞）の感染は、ウイルスが１回の感染を受け得るのみで、したがってそれらは複製欠損性である、ということを確証した。

【００２２】

実施例４：増殖率の確定およびウエスタンブロット

1 X 10^{5}／皿の密度で、10 cm培養皿中で３回、ＰＡＳＭ細胞をプレート化した。2％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するＤＭＥＭ培地中で、4.4 X 10^{7} pfuのＡｄＣＭＶまたはＡｄＣＭＶ－RB2/p130を用いて、細胞を形質導入した。翌朝、培地を除去し、10％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭと取り換えた。細胞を６日間、24時間毎に収穫し、トリパンブルー排除により計数した。細胞を回転沈降させて、ペレットを溶解した。ウエスタンブロット分析を、前記と本質的に同様に実施した（Claudio, et al. Cancer Res. 56, 2003-2008（1996））。抗RB2/p130を1:1000の稀釈で用い、抗－β－チューブリン（Sigma, St Louis, MO）は1:1000の稀釈で、そしてＥ２Ｆ－４および５抗体（Santa Cruz, CA）は1:500の稀釈で用いた。

【００２３】

実施例５：用量－反応増殖曲線およびＦａｃｓ分析

1 X 10^{5}／皿の密度で、10 cm培養皿中で３回、ＰＡＳＭ細胞をプレート化した。2％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するＤＭＥＭ培地中で、5、10または50 MOIののＡｄＣＭＶ、ＡｄＣＭＶ－βＧａｌまたはＡｄＣＭＶ－Rb2/p130を用いて、細胞を形質導入した。翌朝、培地を除去、10％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭと取り換えた。細胞を５日間、24時間毎に収穫し、用量－反応増殖曲線のためにトリパンブルー排除により計数した。Ｆａｃｓ分析のためには、前記のClaudio et al., Cancer Research 56:2003-2008（1996）に記載されたのと同様に、細胞を形質導入の48時間後に収集し、70％エタノール中で固定して、ヨウ化プロピジウムおよびＲＮＡアーゼを含有する溶液で処理した。

【００２４】

実施例６：ゲルシフト検定（ＥＭＳＡ）

1 X 10^{5}／皿の密度で、10 cm培養皿中で２回、ＰＡＳＭ細胞を植え付けた。2％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ培地中で、1 X 10^{8} pfuのＡｄＣＭＶまたはＡｄＣＭＶ－RB2/p130を用いて、細胞を形質導入した。翌朝、培地を除去し、10％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭと取り換えた。細胞を収集し、Pagano et al. Science 255, 1144-1147（1992）に以前に記載されたのと本質的に同様に、ゲルシフトを実施した。

【００２５】

実施例７：動物試験
全WKYラットを同一温度（21±1℃）、湿度（60±5%）および明／暗周期下で保持し、正常ラット餌を自由に摂取させた。 ＡｄＣＭＶまたはＡｄＣＭＶ－RB2/p130で処理した動物群は、各々10匹で構成され、一方、Ａｄ－β－Ｇａｌ感染群は、５匹のラットで構成された。
【００２６】
体重350～400 Gの14週齢のWKYラット（Charles River, Morini, Italy）35匹の右総頸動脈を、外頸動脈を通して導入されたバルーン塞栓切除カテーテル（2F' Fogarty, Edwards Laboratories）の管腔内通過により、内皮を剥がした。全動物を、ケタミン（Ketalar, Parke-Davis）80 mg/kgおよびキシラジン（Rompun, Bayer AG）5 mg/kgの腹腔内注射により麻酔した。右総頸動脈および外頸動脈を外科的に露出し、外頸動脈で動脈切開を実施した。2F Fogartyバルーンカテーテルの挿入および通過により内膜剥離損傷を成し遂げ、食塩溶液で十分に拡張させて、目盛付き用具（Indeflator Plus 20, Advanced Cardiovascular System, Inc.）を用いて、1.5気圧での膨張によりわずかな抵抗を生成した。適切な内皮損害を保証するために、膨張カテーテルを合計３回通過させた。この技法は、頸動脈それ自体の拡張を生じた。バルーン膨張の時間は、20秒間、一定に維持された。バルーン損傷後、近位総頸動脈および近位内頸動脈上に血管鉗子を配置して、長さ約１cmの総頸動脈のセグメントを単離した。ポリエチレンカテーテル（ＰＥ５０、Hecton Dickinson）を外頸動脈動脈切開により導入し、単離血管セグメントをM-199培地で流し洗いした後、いずれかのアデノウイルスベクターを導入した。アデノウイルスベクターを解凍し、稀釈（1×10^9 pfu/μL）して、使用するまで湿潤氷中に保持した。ストックはすべて、解氷の２時間以内に使用した。各ラットに関して、外頸動脈に配置したカテーテルにより、全体で50μLの稀釈アデノウイルスベクターを単離総頸動脈セグメント中に浸透させた。ベクター含有培地の注入中、単離頸動脈セグメントは膨張するようになり、浸透期間の継続中は残存した。20分間のインキュベーション後、ベクター含有培地を抜き取り、外頸動脈を結紮して、総頸動脈および内頸動脈を通る血流を再確立した。ラットを麻酔から回復させて、それらのケージに戻した。
【００２７】
実施例８：形態学的知見
遺伝子形質導入の２週間後、頸動脈を周囲組織から切り離し、ラットを屠殺した。
普遍的溶液（0.1 Mリン酸塩緩衝液中の4%パラホルムアルデヒドおよび1%グルタルアルデヒド）中に固定した検体に関して、血管壁および管腔の構造および微細構造分析を実施した。固定の猶予時間は約2～3時間であった。血管をＰＢＳ中で２回洗浄し、1%四酸化オスミウム中で後固定した。次に、検体をＰＢＳ中で２回すすぎ、その後、アルコールシリーズ（30～100%、15分工程）を通して脱水した。エポキシ樹脂（エポン812）中に包埋し、60℃で一夜重合させた。半薄横断切片（0.5μm）をUltracut-E（Reichert-Young）で切断し、スライドに載せて、温メチレンブルーで染色した。ツァイス顕微鏡を用いて、スクリーニングおよび写真撮影を実施した。
【００２８】
超薄横断切片（60 nm）を銅格子に載せて、酢酸ウラニルで6分間、クエン酸鉛で５分間、対比染色した。JEOL JEM-1220電子顕微鏡により、検体を分析した。
Digital Imaging Processing（Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring Maryland, USA）を用いて、血管壁厚および管腔直径を評価した。免疫組織化学目的のために、連続凍結血管切片（5μm）を12時間室温と平衡させて、10分間アセトンに曝露した。ビオチン－ストレプタビジン（Vectastain Universal Quick Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA）予備生成複合体を用いて、RB2/p130の発現を検出した。切片を10%ウマ血清／ＰＢＳ＋0.2%トゥイーン-20で、室温で20分間、予備遮断した。組織切片は余分の血清を排除し、我々の特異的ポリクローナル抗pRb2/p130またはウマ血清（De Luca et al. Mature Med. 3, 913-916（1997））を適切な稀釈で用いて、インキュベートした。洗浄後、室温で20分間ＴＢＳ中で予備稀釈し、その後、ペルオキシダーゼ抱合ストレプ

タビジンとともに10分間インキュベートした普遍的ビオチニル化抗体により、結合一次抗体を検出した。３－アミノ－９エチルカルバゾール（ＡＥＣ）は、熱量測定基質として用いた。ツァイス顕微鏡により、血管切片の分析を実施した。

【００２９】

実施例９：統計的分析

示したデータはすべて、平均±標準誤差である。Systatプログラム（Systat INC, Evanston, IL）を用いた分散の分析（ＡＮＯＶＡ）により、群間の統計的分析を実施した。Tukey検定を適用して、有意の全体的作用が確定された場合の、単一平均値を比較した（Dixon, W.J. et al., Introduction to Statistical Analysis, New York, McGraw-Hill (1969)）。<.05というＰ値は、統計学的に有意であるとみなされた。

【００３０】

本明細書中に引用された特許出願を含むがそれらに限定されない出版物および参考文献はすべて、各々別々の出版物および参考文献が特定的におよび別々に全記載内容が参照により本明細書中に含まれることが示されているように、それらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる。

特定の実施態様を参照しながら本発明を説明してきたが、これらの方法および組成物の変法が用いられ得ること、そして本発明は、本明細書に特定的に記載されたものと別様に実施され得るということは、当業者には明らかである。したがって、本発明は、特許請求の範囲に定義されたような本発明の精神および範囲内に包含されるすべての変形を含む。

【図面の簡単な説明】

【図１Ａ】　ラット肺動脈平滑筋細胞（ＰＡＳＭ）の増殖に及ぼすRB2/p130のアデノウイルス形質導入の作用、ならびにＡｄ－ＣＭＶ（空ウイルスベクター）またはＡｄ－ＣＭＶ－Ｒｂ２/p130で形質導入されたＰＡＳＭ細胞における経時的pRb2/p130発現を実証するウエスタンブロットを示す。

【図１Ｂ】　図１Ａの続きである。

【図２Ａ】　肺動脈平滑筋細胞株（ＰＡＳＭ）の増殖に及ぼす漸増量のアデノウイルス粒子の作用を示す。

【図２Ｂ】　図２Ａの続きである。

【図２Ｃ】　図２Ｂの続きである。

【図３】　Ｅ２Ｐ結合能力に及ぼすpRb2／p130誘導の作用を示す。

【図４】　Ａｄ－ＣＭＶ、Ａｄ－RB2/p130形質導入化ＣＡおよび左頸動脈（対照）における血管形成後の管腔サイズ（Ａ）および動脈壁厚（Ｂ）のグラフである。

【図５】　ＣＭＶおよびＲｂ２血管の構造および微細構造分析を示す。

【図６】　Ａｄ－ＣＭＶまたはＡｄ－RB2/p130で形質導入されたＰＡＳＭ細胞におけるＥ２Ｆ－４および５のウエスタンブロット分析である。

【図７】　対照血管の構造および微細構造分析を示す。

【図８】　非損傷、Ａｄ－RB2/p130およびβ－ガラクトシダーゼ形質導入化頸動脈におけるpRb2／P130およびβ－ガラクトシダーゼの免疫組織化学的分析を示す。

【図１Ａ】

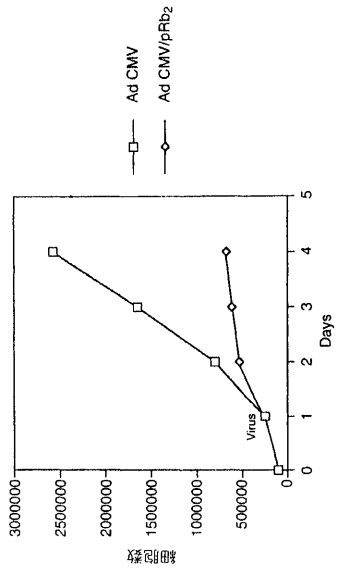

Fig. 1A

【図１Ｂ】

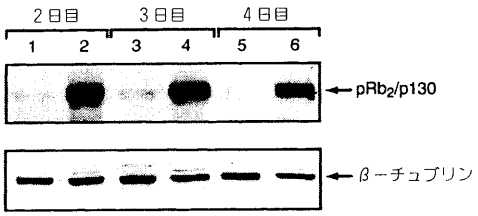

Fig. 1B

【図２Ａ】

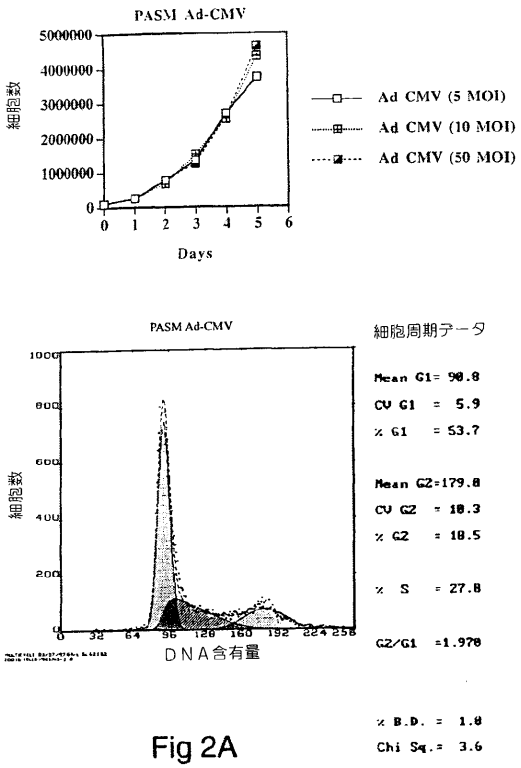

Fig 2A

【図２Ｂ】

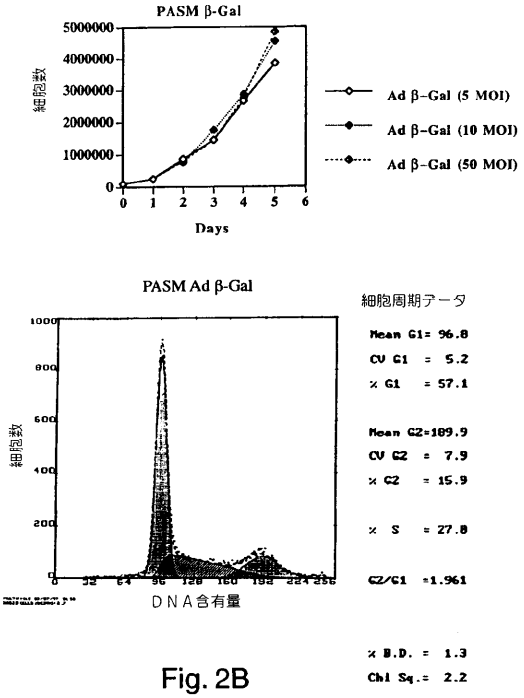

Fig. 2B

【図２Ｃ】

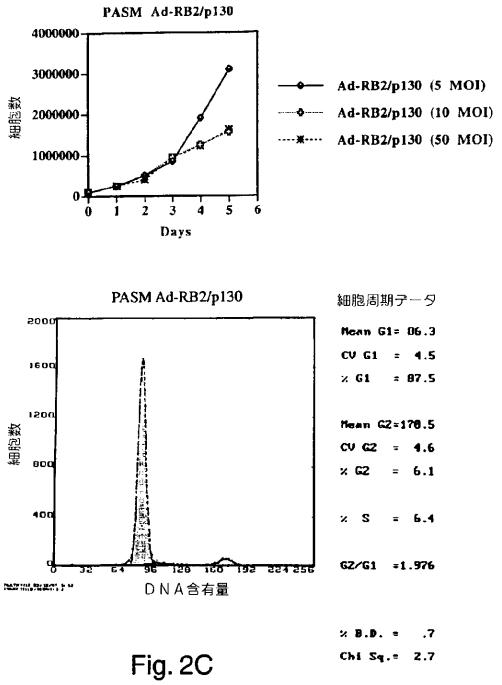

Fig. 2C

【図３】

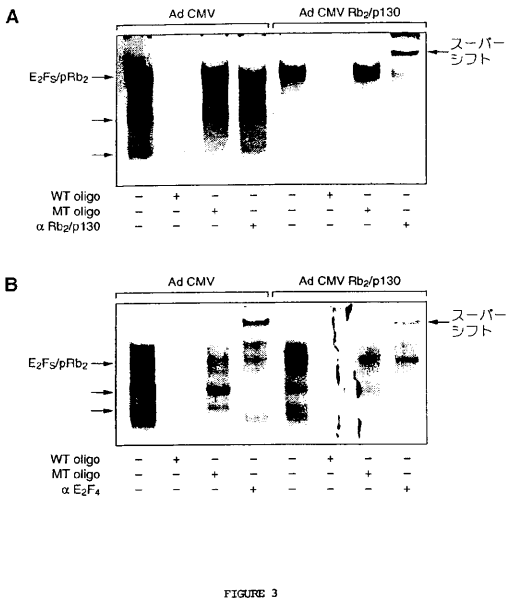

FIGURE 3

【図４】

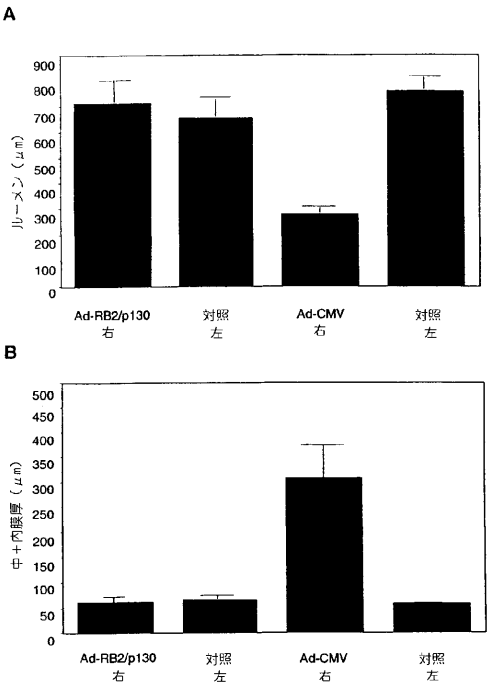

Fig. 4

【図５】

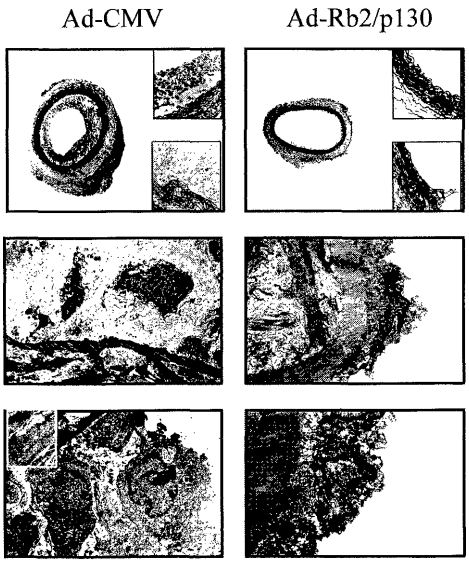

Fig. 5

【図６】

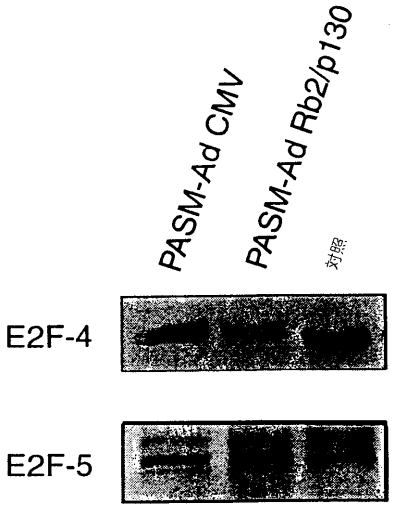

Fig. 6

【図７】

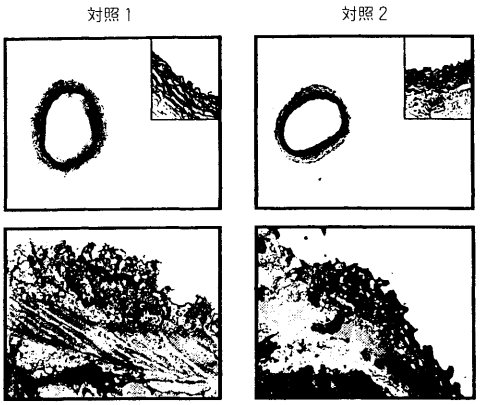

Fig. 7

【図８】

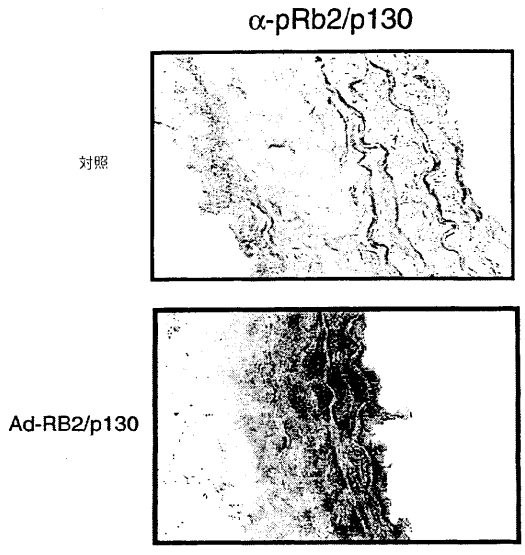

Fig. 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｎ 15/09 (2006.01) Ｃ１２Ｎ 15/00 ＺＮＡＡ

(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 ジョルダーノ，アントニオ
アメリカ合衆国，ペンシルベニア １９１２８，フィラデルフィア，ジンジャー レーン ３０３
(72)発明者 クラウディオ，ピエール ピ.
アメリカ合衆国，ペンシルベニア １９１４６，フィラデルフィア，ロムバード ストリート ２０５４

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 特表平１０－５０７６２６（ＪＰ，Ａ）
FELDMAN, FUNDAMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY, １９９５年, V9 N1, P8-16
FELDMAN, CARDIOVASCULAR RESEARCH, １９９６年, V32 N2, P194-207
RADER,D.J., INTERNATIONAL JOURNAOL OF CLINICAL AND LABORATORY RESEARCH, １９９７年, V27 N1, P35-43
DRECHSEL, SCHWEIZERRISCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, １９９６年, V128 N13, P497-507
WICKHAM, JOURNAL OF VIROLOGY, V70 N10, P6831-6838
CHANG, M.W., et al., SCIENCE, １９９５年 1月２７日, Vol.267, p.518-522
DE LUCA, A., et al., Histology and Histophathology, １９９６年, Vol.11, No.4, p.1029-1034
CLAUDIO, P.P., et al., CANCER RESEARCH, １９９４年１１月 1日, Vol.54, p.5556-5560
BALDI, A., et al., Journal of Cellular Biochemistry, １９９５年, Vol.59, p.402-408

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 48/00
A61K 35/00-76
A61K 38/00
A61P 9/00-10
A61P 43/00
C12N 15/00-09
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)