(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120035601 A
(43)申请公布日 2025.05.23

(21)申请号 202380072478.2
(22)申请日 2023.10.11
(30)优先权数据
63/415,320 2022.10.12 US
63/514,586 2023.07.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/036900 2023.10.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/080311 JA 2024.04.18
(71)申请人 CPC株式会社
地址 日本
(72)发明人 栗田昌和 加藤基 沈琪 平林祐介 菅翔吾 铃木启一郎 杜泽宁 北条宏德 冈田宽之
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
专利代理师 陈彦 张默
(51)Int.Cl.
C07K 14/015(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/35(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)

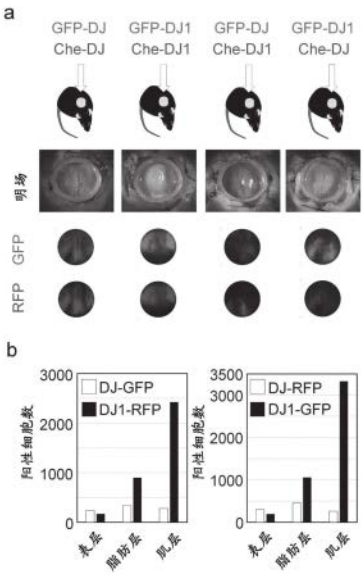
权利要求书6页 说明书61页
序列表（电子公布） 附图33页

(54)发明名称

基因导入法、基因治疗法及组织再生法

(57)摘要

课题是如下方面:不存在对皮肤、皮下组织、皮肤溃疡面及其构成细胞具有高基因导入效率、高特异性的基因导入方法;更一般地,在向生物体内的基因导入中,难以得到高基因导入效率;难以使皮肤附属器在形态上、功能上再生;在失去上肢、下肢的末梢组织(上臂、前臂、手、手指、大腿、小腿、脚、脚趾)等的情况下,难以再生。解决方法是通过对皮肤/皮下组织、皮肤溃疡面的细胞具有高基因导入效率、高特异性的新型AAV(AAV为腺相关病毒的简称)衣壳,对表皮组织及其构成细胞即角质形成细胞具有高基因导入效率、高特异性的新型AAV衣壳,对表皮组织及其构成细胞即角质形成细胞具有高基因表达、高特异性的新型组织特异性启动子,通过与生物体内基因导入一起并用类固醇而达到基因导入效率的提高的医药品,用于针对皮肤附属器功能降低的状态通过生物体内基因导入诱导皮肤附属器的再生、新生、功能提高而实现充足的皮肤附属器功能的医药品,用于开发上肢、下肢的末梢组织、缺损组织的再生方法的研究开发平台,以及用于再生的医药品,从而提供上述课题的解决方法。



CN 120035601 A

1.一种非天然的改变腺相关病毒AAV衣壳蛋白,其与对应的亲代AAV衣壳蛋白相比包含肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列EPKARAP即序列号2,其插入部位是AAVDJ的VP1的氨基酸残基589和590之间、或者其他AAV血清型的衣壳蛋白的对应位置。

2.一种非天然的改变AAV衣壳蛋白,其具有与亲代腺相关病毒AAV衣壳蛋白即AAVDJ相比包含肽插入的、序列号5、序列号14、序列号15、序列号16或序列号17所记载的氨基酸序列作为氨基酸序列。

3.一种多核苷酸,其包含编码权利要求1或2所述的改变AAV衣壳蛋白的碱基序列。

4.一种表达载体,其包含权利要求3所述的多核苷酸,所述多核苷酸中编码所述改变AAV衣壳蛋白的所述碱基序列与启动子序列可操作地连接。

5.一种重组病毒或病毒载体,其包含权利要求1或2所述的改变AAV衣壳蛋白。

6.根据权利要求5所述的重组病毒或病毒载体,所述重组病毒或病毒载体是AAV。

7.根据权利要求5或6所述的重组病毒或病毒载体,所述重组病毒或病毒载体包含编码治疗用基因产物的碱基序列。

8.根据权利要求5～7中任一项所述的重组病毒或病毒载体,所述重组病毒或病毒载体对皮肤溃疡面的细胞或表皮细胞具有更高感染性。

9.一种药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂和权利要求5～8中任一项所述的重组病毒或病毒载体。

10.一种方法,其在需要治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低的对象中,治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低,所述方法包括:通过皮内注射、皮下注射或非经口地任意选择性地投予静脉内,从而将权利要求9所述的药物组合物投予所述对象。

11.一种启动子,包含序列号23或序列号25所记载的碱基序列、或者与序列号23或序列号25所记载的碱基序列具有至少95%或至少99%的同一性的碱基序列,使目标基因在哺乳动物细胞中组织/细胞特异性地表达。

12.一种启动子,包含序列号26所记载的碱基序列、或者与序列号26所记载的碱基序列具有至少95%或至少99%的同一性的碱基序列,使目标基因在哺乳动物细胞中组织/细胞特异性地表达。

13.一种重组载体,其包含权利要求11或12所述的启动子。

14.一种重组载体,其包含权利要求11或12所述的启动子和编码治疗用基因产物的碱基序列。

15.根据权利要求13或14所述的重组载体,所述重组载体是AAV。

16.根据权利要求13～15中任一项所述的重组载体,所述重组载体在表皮细胞、表皮组织中具有高基因表达。

17.一种药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂和权利要求13～16中任一项所述的重组载体。

18.一种方法,其在需要治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低的对象中,治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低,所述方法包括:通过皮内注射、皮下注射或非经口地任意选择性地投予静脉内,从而将权利要求17所述的药物组合物投予所述对象。

19.一种基因导入载体,其通过将至少编码DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、cMYC基因、LEF1基因、SOX2基因、HOXC4基因、HOXC9基因、HOXC13基因、JARID2基因、HEY1基因、

HEY2基因、FOXO1基因、FOXD1基因、EGR3基因、MEF2C基因、LHX2基因、PRRX1基因、PRRX2基因、CREB3基因、ETV1基因、TBX6基因、MSX2基因、PRDM1基因、SHH基因中的任一种的基因作为赋予皮肤附属器诱导能力的基因进行基因导入,从而从生物体内的皮肤溃疡面诱导具有皮肤附属器的皮肤组织。

20.一种基因导入载体,其通过将至少编码DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、cMYC基因、LEF1基因、FOXD1基因、PRDM1基因、SHH基因中的任一种的基因作为赋予皮肤附属器诱导能力的基因进行基因导入,从而从生物体内的皮肤溃疡面诱导具有皮肤附属器的皮肤组织。

21.一种基因导入载体,其通过将编码DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、cMYC基因、LEF1基因、FOXD1基因、PRDM1基因、SHH基因中的全部或一部分的基因作为赋予皮肤附属器诱导能力的基因进行基因导入,从而在生物体内诱导皮肤附属器的新生、皮肤附属器功能的提高。

22.一种基因导入载体,其通过将编码LEF1基因、FOXD1基因、PRDM1基因、SHH基因中的全部或一部分的基因作为赋予皮肤附属器诱导能力的基因进行基因导入,从而在生物体内诱导皮肤附属器的新生、皮肤附属器功能的提高。

23.一种基因导入载体,其通过将编码FOXD1基因、PRDM1基因中的两者或一者的基因作为赋予皮肤附属器诱导能力的基因进行基因导入,从而在生物体内诱导皮肤附属器的新生、皮肤附属器功能的提高。

24.根据权利要求19～23中任一项所述的基因导入载体,所述基因导入载体是AAV或mRNA。

25.一种药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂和权利要求19～24中任一项所述的基因导入载体。

26.一种方法,其在需要治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低的对象中,治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低,所述方法包括:通过溃疡面散布、皮内注射或皮下注射,从而将权利要求25所述的药物组合物投予所述对象。

27.一种基因导入用医药品,其是将基因导入载体和对基因导入效率或基因表达的提高有效的量的类固醇组合而成的。

28.根据权利要求27所述的基因导入用医药品,所述类固醇全身或局部地作用于基因导入的个体。

29.根据权利要求27或28所述的基因导入用医药品,所述基因导入载体是病毒载体、AAV、逆转录病毒载体、用脂质体转染试剂处理的mRNA、脂质体/脂质纳米粒子制剂化的mRNA、或裸DNA。

30.根据权利要求27～29中任一项所述的基因导入用医药品,所述基因导入载体是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

31.一种基因导入效率的提高方法,其特征在于,在向生物体的基因导入中,在基因导入之前使类固醇全身地作用于个体。

32.一种方法,其在需要治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低的对象中,治疗或预防皮肤疾病、皮肤障碍或皮肤功能降低,所述方法包括:提前、同时或导入后早期使类固醇全身或局部地作用于所述对象,通过溃疡面散布、皮内注射或皮下注射而将基因导

入载体投予所述对象。

33.一种方法,其在需要治疗或预防肌肉疾病、肌肉障碍或肌肉功能降低的对象中,治疗或预防肌肉疾病、肌肉障碍或肌肉功能降低,所述方法包括:提前、同时或导入后早期使类固醇全身或局部地作用于所述对象,通过肌肉注射而将基因导入载体投予所述对象。

34.一种方法,其在需要治疗或预防骨软骨疾病、骨软骨障碍或骨软骨功能降低的对象中,治疗或预防骨软骨疾病、骨软骨障碍或骨软骨功能降低,所述方法包括:提前、同时或导入后早期使类固醇全身或局部地作用于所述对象,通过局部注射而将基因导入载体投予所述对象。

35.一种上肢切断模型动物的制作方法,其特征在于,在将非人哺乳动物的上肢移位之后,在上臂/前臂/手/手指平面对上肢进行切断。

36.一种上肢切断模型动物的制作方法,其特征在于,在将非人哺乳动物的上肢移位之后,在前臂平面对上肢进行切断。

37.根据权利要求35或36所述的方法,所述非人哺乳动物是兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠或小鼠。

38.根据权利要求35~37中任一项所述的方法,上肢移位在保持上肢主干神经、动静脉的状态下进行。

39.根据权利要求35~38中任一项所述的方法,上肢移位在肩关节进行。

40.根据权利要求35~39中任一项所述的方法,上肢移位伴随肩胛骨的切除。

41.一种上肢切断模型动物,其通过权利要求35~40中任一项所述的上肢切断模型动物的制作方法来制造。

42.一种医药物质的筛选方法,其特征在于,将待测物质应用于权利要求41所述的上肢切断模型动物,研究对切断部位的影响。

43.一种医药物质的筛选方法,权利要求42所述的医药物质是以基因导入为目的的基因导入载体。

44.一种医药物质的筛选方法,权利要求42或43中所述的医药物质是用于切断的组织的再生的物质。

45.一种研究开发用试剂或医药品,所述研究开发用试剂用于刺激哺乳动物中的缺损四肢的再生或刺激四肢的缺损组织的再生,所述医药品用作药物,所述研究开发用试剂或医药品包含将下述(1)~(3)中的一种以上导入或使其发挥作用的载体、或者下述(4),

(1)在具有组织再生能力的细胞中表达相对强的基因中的至少一种,

(2)作为细胞的分化/产生过程中的主调控基因发挥作用的基因中的至少一种,

(3)在发生组织再生的环境中发挥强力作用的细胞因子基因中的至少一种,

(4)由上述(1)~(3)中所含的基因编码的蛋白质中的至少一种。

46.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH和OCT4的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH和OCT4。

47.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、OCT4和SOX2的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、OCT4和SOX2。

48.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、

FGF2、FGF8、SHH、OCT4、SOX2和TBX6的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、OCT4、SOX2和TBX6。

49.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、OCT4、SOX2和TBX6中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、OCT4、SOX2和TBX6中的至少一种以上。

50.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1和HDAC2的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1和HDAC2。

51.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1和HDAC2中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1和HDAC2中的至少一种以上。

52.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1、HDAC2和BMP5的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1、HDAC2和BMP5。

53.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1、HDAC2和BMP5中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、LEF1、NFIB、PPARD、POLE4、PRRX1、HDAC2和BMP5中的至少一种以上。

54.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、NFIB、PPARD和POLE4的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、NFIB、PPARD和POLE4。

55.根据权利要求45所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、NFIB、PPARD和POLE4中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF20、FGF2、FGF8、SHH、NFIB、PPARD和POLE4中的至少一种以上。

56.一种研究开发用试剂或医药品,其作为用于刺激哺乳动物中的软骨组织的再生的医药使用,所述研究开发用试剂或医药品包含将下述(1)~(3)中的一种以上导入或使其发挥作用的载体、或者下述(4),

(1)在具有组织再生能力的细胞中表达相对强的基因中的至少一种,

(2)作为细胞的分化/产生过程中的主调控基因发挥作用的基因中的至少一种,

(3)在发生组织再生的环境中发挥强力作用的细胞因子基因中的至少一种,

(4)由上述(1)~(3)中所含的基因编码的蛋白质中的至少一种。

57.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1、HDAC2和PRDX2的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1、HDAC2和PRDX2。

58.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1和HDAC2的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1和HDAC2。

59.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自

FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1、HDAC2和PRDX2中的至少一种以上的基因,作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1、HDAC2和PRDX2中的至少一种以上。

60.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1和HDAC2中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF2、SHH、HMGB3、DMNT1和HDAC2中的至少一种以上。

61.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF2、FGF8、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和MEIS1的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF2、FGF8、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和MEIS1。

62.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF2、FGF8、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和MEIS1的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF2、FGF8、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和MEIS1的至少一种以上。

63.根据权利要求57～62中任一项所述的研究开发用试剂或医药品,所述医药品是用于从关节软骨促进软骨内骨化或用于促进长骨生长的医药品。

64.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10和SHH的基因,或者所述蛋白质是FGF10和SHH。

65.根据权利要求56所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10或SHH的基因,或者所述蛋白质是FGF10或SHH。

66.一种研究开发用试剂或医药品,其作为用于刺激哺乳动物中的肌肉组织的再生的医药使用,所述研究开发用试剂或医药品包含将下述(1)～(3)中的一种以上导入或使其发挥作用的载体、或者下述(4),

(1)在具有组织再生能力的细胞中表达相对强的基因中的至少一种,

(2)作为细胞的分化/产生过程中的主调控基因发挥作用的基因中的至少一种,

(3)在发生组织再生的环境中发挥强力作用的细胞因子基因中的至少一种,

(4)由上述(1)～(3)中所含的基因编码的蛋白质中的至少一种。

67.根据权利要求66所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF2、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和WNT7A的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF2、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和WNT7A。

68.根据权利要求66所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF2、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和WNT7A中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF2、LEF1、SHH、MSX1、MSX2、LIN28A和WNT7A中的至少一种以上。

69.根据权利要求66所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF2、LEF1、SHH、HDAC2、PRDX2和WNT7A的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF2、LEF1、SHH、HDAC2、PRDX2和WNT7A。

70.根据权利要求66所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF2、LEF1、SHH、HDAC2、PRDX2和WNT7A中的至少一种以上的基因,或者作为所述蛋白质,包含选自FGF10、FGF2、LEF1、SHH、HDAC2、PRDX2和WNT7A中的至少一种以上。

71.一种研究开发用试剂或医药品,其作为用于刺激哺乳动物中的脂肪组织的再生的医药使用,所述研究开发用试剂或医药品包含将下述(1)～(3)中的一种以上导入或使其发

挥作用的载体、或者下述(4),

(1)在具有组织再生能力的细胞中表达相对强的基因中的至少一种,

(2)作为细胞的分化/产生过程中的主调控基因发挥作用的基因中的至少一种,

(3)在发生组织再生的环境中发挥强力作用的细胞因子基因中的至少一种,

(4)由上述(1)~(3)中所含的基因编码的蛋白质中的至少一种。

72.根据权利要求71所述的研究开发用试剂或医药品,所述基因是编码FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、LEF1、SHH、PRRX1、HDAC2、PRDX2和PPARD的基因,或者所述蛋白质是FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、LEF1、SHH、PRRX1、HDAC2、PRDX2和PPARD。

73.根据权利要求71所述的研究开发用试剂或医药品,作为所述基因,包含编码选自FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、LEF1、SHH、PRRX1、HDAC2、PRDX2和PPARD中的至少一种以上的基因,或者作为蛋白质,包含选自FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、LEF1、SHH、PRRX1、HDAC2、PRDX2和PPARD中的至少一种以上。

74.根据权利要求45~73中任一项所述的研究开发用试剂或医药品,所述哺乳动物是人、猴、大鼠或小鼠。

75.根据权利要求74所述的研究开发用试剂或医药品,所述哺乳动物是小鼠。

基因导入法、基因治疗法及组织再生法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因治疗法、基因导入法、组织再生诱导方法、复原诱导方法、基因组编辑方法。另外,涉及通过将该基因治疗法、基因导入法、组织再生诱导方法、组织复原诱导法、基因组编辑方法应用于临床的病症、疾病而作为治疗法使用、以及作为治疗法、生物学研究的研究开发平台使用。

背景技术

[0002] 将DNA、RNA等核酸导入生物体内外的细胞的基因导入技术可作为针对以往的治疗中治疗困难的病症、遗传性疾病的治疗、再生医疗等赋予组织再生的方法使用,此外还可作为药物创新、生物学研究的方法广泛使用。

[0003] 为了使用基因导入作为基因治疗法、其开发法、药物创新/生物学研究的方法,多数情况下要求在更多的细胞中得到更强的基因表达、即实现高基因导入效率。

[0004] 作为针对动物细胞的基因导入方法,可使用基于腺相关病毒载体(Adeno-associated virus vector,AAV vector)、腺病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、仙台病毒载体等病毒载体的方法、基于以质粒、微环DNA等DNA本身的状态(裸)投予的方法、磷酸钙法、脂质体转染法、电穿孔法等,此外在RNA的递送中可使用脂质纳米粒子(Lipid nanoparticle,LNP)。

[0005] 特别是在向生物体的基因导入中,对于目标脏器、组织、细胞,多数情况下难以得到高基因导入效率,因此在作为治疗法的基因导入的利用及其开发中,要求实现更高的基因导入效率。

[0006] 尤其对于皮肤、皮肤溃疡区域没有优异的基因导入方法,因此在推进针对皮肤遗传性疾病的治疗法(参照非专利文献1)、针对皮肤溃疡的组织再生治疗法(参照非专利文献2、3)的研究开发中,要求能够实现高基因导入效率、组织特异性的基因表达的方法。

[0007] 皮肤附属器由毛囊、脂腺、汗腺等构成,起到免受机械障碍的保护、保温、保湿、体温调节等作用。皮肤附属器在胎儿期、器官产生的过程中通过上皮组织与间充质组织的相互作用而形成(参照非专利文献4)。

[0008] 作为由皮肤附属器的缺损、障碍、功能失调带来的代表性的病症,有脱发症、皮脂缺乏症等。除了体温调节障碍、通过皮肤干燥带来瘙痒感以外,还成为整容障碍的原因。

[0009] 在临床上难以将失去的皮肤附属器再生,通常需要通过植皮术、皮瓣形成术等从身体其他部位移植现有的附属器。

[0010] 对此,存在如下方法:通过在不具有皮肤附属器诱导能力的体细胞中导入包含至少一种在具有皮肤附属器诱导能力的细胞中表达相对强的基因的导入基因,从而制造具有皮肤附属器诱导能力的细胞,作为以针对皮肤附属器的缺损、障碍、功能失调的治疗为目的的细胞供给源的方法(参照专利文献1);通过对存在于生物体内的体细胞进行基因导入,从而诱导没有皮肤附属器的皮肤的方法(非专利文献1),但没有报告:通过向存在于生物体内的体细胞进行基因导入,从而从生物体内的体细胞诱导具有皮肤附属器的皮肤组织的方

法。

[0011] 由上臂、前臂、手、手指构成的上肢、由大腿、小腿、脚、脚趾构成的下肢是由骨、软骨、肌肉、肌腱、脂肪、末梢神经、血管、皮肤等构成的复合组织。

[0012] 在以人为代表的哺乳类中,无论何种高阶组织缺损,都难以将其在临床上再生,除了通过安装假肢、义足、假体等人工物而在功能上、整容上代替以外,没有好的治疗法。

[0013] 另外,在构成上下肢的组织中,尤其骨、软骨、肌肉、脂肪缺损的情况下,即使是单独组织,也难以将其在临床上再生,因此进行从身体其他部位的组织移植术。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:国际公开第2022/244502号

[0017] 非专利文献

[0018] 非专利文献1:Ain QU,Campos EVR,Huynh A,Witzigmann D,Hedtrich S.Gene Delivery to the Skin-How Far Have We Come?“Trends Biotechnol”,2021,39(5),p474-487.

[0019] 非专利文献2:Kurita M,Araoka T,Hishida T,O’Keefe DD,Takahashi Y,Sakamoto A,Sakurai M,Suzuki K,Wu J,Yamamoto M,Hernandez-Benitez R,Ocampo A,Reddy P,Shokhirev MN,Magistretti P,Nunez Delicado E,Eto H,Harii K,Izpisua Belmonte JC,“Nature”,2018,561(7722),p243-247

[0020] 非专利文献3:Kato M,Ishikawa S,Shen Q,Du Z,Katashima T,Naito M,Numahata T,Okazaki M,Sakai T,Kurita M.“Commun Biol”,2023,6(1),p508.

[0021] 非专利文献4:Lee J,B■scke R,Tang PC,Hartman BH,Heller S,Koehler KR.“Cell Research”,2018,22(1),p242-254

发明内容

[0022] 本发明包括:对皮肤、皮下组织及其构成细胞具有高基因导入效率、高特异性的基因导入方法、提高向生物体内的基因导入效率的方法、使用基因导入而使皮肤附属器再生的方法、以及使缺损的四肢前端部再生的方法。各自可以作为以基于基因导入的疾病治疗、病症改善/健康增进等为目的的治疗方法使用,此外还可以作为用于研究/开发基于基因导入的治疗方法的工具使用,进而可以作为以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具使用。

[0023] 发明所要解决的课题

[0024] 所要解决的第一问题是,不存在对皮肤、皮下组织、皮肤溃疡面及其构成细胞具有高基因导入效率、高特异性的基因导入方法。

[0025] 第二问题是,更一般地,在向生物体内的基因导入中,难以得到高基因导入效率、高目标基因的表达。

[0026] 第三问题是,对于在由皮肤附属器的缺损、障碍、功能失调带来的病症、年龄增长等生理变化中失去的皮肤附属器,难以在形态上、功能上再生。

[0027] 第四问题是,在失去上肢、下肢的末梢组织(上臂、前臂、手、手指、大腿、小腿、脚、脚趾)等的情况下,难以在形态上、功能上再生缺损组织。

[0028] 用于解决课题的方法

[0029] 本发明的主要特征在于,为了能够进行对皮肤、皮下组织、皮肤溃疡面及其构成细胞具有高基因导入效率、高特异性的基因导入,包括:对皮肤/皮下组织、皮肤溃疡面的细胞具有高基因导入效率、高特异性的新AAV(AAV为腺相关病毒的简称,以下相同)衣壳;对表皮组织及其构成细胞即角质形成细胞具有高基因导入效率、高特异性的新AAV衣壳;对表皮组织及其构成细胞即角质形成细胞具有高基因表达、高特异性的新组织特异性启动子。

[0030] 另外,本发明的主要特征在于,包括:通过在AAV、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、仙台病毒载体等病毒载体、质粒DNA、微环DNA等裸DNA、以及最近的mRNA(也包括以脂质纳米粒子(LNP)为载体的物质)等各种生物体内基因导入之前、同时或导入后早期全身或局部地并用类固醇,从而得到针对全身的脏器/组织/细胞的基因导入效率的提高、高基因表达的方法,以及能够实现该方法的研究用试剂和医药品。

[0031] 另外,本发明的主要特征在于,包括:针对如皮肤溃疡面那样的皮肤和皮肤附属器缺损的病症、以年龄增长性变化为代表的各种皮肤附属器功能降低的状态,通过生物体内基因导入,诱导皮肤附属器的再生、新生、功能提高,从而实现充足的皮肤附属器功能的方法,以及能够实现该方法的研究用试剂和医药品。

[0032] 另外,本发明的主要特征在于,包括:在失去上肢、下肢的末梢组织(上臂、前臂、手、手指、大腿、小腿、脚、脚趾)等的情况下,在形态上、功能上再生缺损组织的方法;能够实现该方法的研究用试剂和医药品;以及用于开发再生方法的研究开发平台。

[0033] 发明效果

[0034] 本发明的对皮肤溃疡面的细胞具有优异的基因导入效率的AAV即AAVDJ1具有如下优点:对于皮肤溃疡面的细胞,与包括AAVDJ的其他衣壳相比,对生物体内皮肤溃疡面的细胞、皮下组织的细胞、以及处于培养条件下的其构成细胞显示高基因导入效率、优异的指向性。

[0035] 本发明的对角质形成细胞、表皮组织具有优异的基因导入效率的AAV即AAVDJ2具有如下优点:与已知对角质形成细胞显示高基因导入效率的AAV2、AAV6、AAVDJ相比,显示高基因导入效率和优异的指向性,对生物体内表皮组织以及处于培养条件下的角质形成细胞显示高基因导入效率、优异的指向性、高特异性。

[0036] 本发明的对角质形成细胞/表皮组织特异性高的启动子即K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子与已知对以角质形成细胞/表皮组织为代表的任何组织/细胞种类都带来高基因表达的CAG启动子相比,带来更高或同等的基因表达,另一方面,在以表皮附近的间充质细胞为代表的角质形成细胞、表皮组织以外的组织/细胞中仅带来相对低的基因表达,因此作为针对表皮组织、培养角质形成细胞的组织特异性启动子具有优点。

[0037] 本发明的通过基因导入而在生物体内诱导皮肤附属器的再生、新生、功能提高的方法具有如下优点:能够诱导在由皮肤附属器的缺损、障碍、功能失调导致的病症、年龄增长等生理变化中失去的皮肤附属器的再生、新生、功能提高。

[0038] 本发明的使上肢、下肢的末梢组织再生的方法具有如下优点:能够使以人为代表的哺乳类中无法形成的上肢、下肢的末梢组织的一部分在形态上、功能上再生,成为迄今为止不存在的用于开发缺损组织整体的完全再生方法的研究开发平台。

附图说明

[0039] 图1是针对小鼠背部皮肤溃疡面的AAVDJ与AAVDJ1的基因导入效率的比较研究试验(实施例1)的结果,显示了AAVDJ1与AAVDJ相比,特别是针对作为深部组织的脂肪层和肌层具有高基因导入效率。(a)在上段显示对各组的小鼠投予的导入基因和衣壳的组合的图解,显示了各组的代表性的可见光观察下的立体显微镜照片、荧光观察下的立体显微镜照片。(b)的左侧图表是将编码GFPNLS(GFP)的AAVDJ和编码mCherryNLS(RFP)的AAVDJ1混合并投予后,对于组织所见上分别在浅层、脂肪层、肌层中的基因导入阳性细胞进行计数的图,(b)的右侧图表是将编码mCherryNLS的AAVDJ和编码GFPNLS的AAVDJ1混合并投予后,使用图像分析对于组织所见上分别在浅层、脂肪层、肌层中的基因导入阳性细胞进行计数的图。

[0040] 图2是针对小鼠/人培养角质形成细胞的新AAVDJ变体与已知的AAV的基因导入效率的比较研究试验(实施例2)的结果,显示了新AAVDJ变体AAVDJK1、AAVDJK2、AAVDJK3、AAVDJK8、尤其AAVDJK2与已知的AAV相比具有高基因导入效率。(a)是对角质形成细胞具有优异的基因导入效率的作为已知AAV的AAV2、AAV2K1、AAV2K2、AAV2K3、AAV2K8、AAV6、AAVDJ、以及新AAVDJK1、AAVDJK2、AAVDJK3、AAVDJK8的氨基酸序列的图解。(b)是在饲养培养条件下的小鼠/人角质形成细胞的菌落(由虚线包围的部分)的相位差显微镜照片。(c)是利用由各个衣壳制作的GFPNLS表达载体针对小鼠角质形成细胞进行基因导入试验的结果,显示了新AAVDJ变体AAVDJK1、AAVDJK2、AAVDJK3、AAVDJK8、尤其AAVDJK2与已知的AAV相比具有高基因导入效率。(d)是利用由各个衣壳制作的GFPNLS表达载体针对人角质形成细胞进行基因导入试验的结果,显示了新AAVDJ变体AAVDJK1、AAVDJK2、AAVDJK3、AAVDJK8、尤其AAVDJK2与已知的AAV相比具有高基因导入效率。

[0041] 图3是针对小鼠/人培养间充质细胞的已知的AAV2、AAV2K2、AAVDJ与新AAVDJK2的基因导入效率的比较研究试验(实施例3)的结果,可知在新AAVDJK2中没有确认到在AAVDJ、AAV2中所确认到的针对间充质细胞的高基因导入效率。(a)是利用由各个衣壳制作的GFPNLS表达载体针对小鼠脂肪来源的间充质细胞进行基因导入试验的结果,可知在新AAVDJK2中没有确认到在AAVDJ中所确认到的针对间充质细胞的高基因导入效率。(b)是利用由各个衣壳制作的GFPNLS表达载体针对人成纤维细胞进行基因导入试验的结果,可知在新AAVDJK2中没有确认到在AAV2和AAANDJ中所确认到的针对间充质细胞的高基因导入效率。

[0042] 图4是针对小鼠背部皮肤的荧光二氧化硅粒子的注入试验(参考例1)的结果,显示了在皮内注射中注入的粒子的大部分不会分布于表皮。(a)是使用手术用显微镜的皮内注射的情况。(b)是针对小鼠背部皮肤的荧光二氧化硅粒子注入试验的图解。(c)是刚注入荧光二氧化硅粒子后,经过1小时、3小时后回收皮肤组织,在组织切片上调查荧光二氧化硅粒子的分布的情况。可知所注入的粒子的大部分从皮内分布到皮下。(d)是同一待测物的表皮附近的放大图像。可知所注入的荧光二氧化硅粒子的大部分不会分布于表皮。

[0043] 图5是针对小鼠背部皮肤的AAVDJK2与AAVDJ的基因导入效率的比较试验的结果,显示了AAVDJK2与AAVDJ相比在表皮组织中具有高的基因导入效率、特异性。(a)是实验的图解。按照在CAG启动子下表达GFPNLS的AAVDJK2和表达mCherryNLS的AAVDJ以相同滴度(10^{11}GC(基因拷贝数)/35μl)包含的方式进行调节,并对小鼠背部进行皮内注射。(b)是在2天后采集注入部位的组织时的荧光立体显微镜图像。(c)表示组织学所见上,利用AAVDJK2

导入的GFPNLS在表皮中表达较强,在皮下组织中表达较弱,与此相对,利用AAVDJ导入的mCherry在表皮中表达较弱,在皮下组织中表达较强。

[0044] 图6是对于小鼠/人培养角质形成细胞和间充质细胞,将具有通过新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子以及已知的CAG启动子、K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子来表达GFPNLS的AAVDJK2衣壳的AAV作为载体进行基因导入时的基因表达的比较研究试验(实施例5)的结果,显示了新启动子对角质形成细胞具有高基因导入效率和/或高特异性。(a)是搭载了新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子以及已知的CAG启动子、K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子的GAPNLS表达AAV质粒序列的图解。(b)是利用由各个启动子表达GFPNLS的AAVDJK2衣壳载体针对小鼠角质形成细胞进行基因导入试验的结果,显示了K14SCP3启动子具有高于CAG启动子、K14启动子、K14短启动子的基因导入效率,此外,K16SCP3启动子、K16P5短启动子具有高于K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子的基因导入效率。(c)是利用由各个启动子表达GFPNLS的AAVDJK2衣壳载体针对小鼠角质形成细胞进行基因导入后,用流式细胞术探讨基因导入效率的结果,显示了K14SCP3启动子具有高于CAG启动子、K14启动子、K14短启动子的基因导入效率,此外,K16SCP3启动子、K16P5短启动子具有高于K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子的基因导入效率。(d)是利用由各个启动子表达GFPNLS的AAVDJK2衣壳载体针对小鼠脂肪来源间充质细胞进行基因导入试验的结果,显示了包含新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子的角蛋白特异性启动子的基因导入效率远低于CAG启动子。(e)是利用由各个启动子表达GFPNLS的AAVDJK2衣壳载体针对小鼠脂肪来源的间充质细胞进行基因导入后,用流式细胞术探讨基因导入效率的结果,显示了包含新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子的角蛋白特异性启动子的基因导入效率远低于CAG启动子。

[0045] 图7是将在K14SCP3启动子下表达GFPNLS的AAVDJK2皮内注射至小鼠背部皮肤的基因导入试验的结果,显示了该载体以高效率、高特异性将基因导入表皮组织中。在将类固醇(康宁克通(Kenacort)注射剂)10μl皮下投予腹部的次日,在背部皮肤皮内注射AAVDJK2-K14SCP3-GFPNLS后第2天的小鼠背部皮肤的组织图像中,在表皮组织(白色箭头)中一致地确认到高GFPNLS表达。若除去毛囊的表皮组织,则从真皮到皮下组织的基因导入被抑制为低频率。

[0046] 图8是对于在小鼠背部筋膜上安装腔室而制作的、与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面,使用AAV进行基因导入而诱导带有皮肤附属器的皮肤的试验的图。显示了在与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上诱导了带有皮肤附属器的皮肤。(a)是试验的图解。将制作皮肤溃疡、安装腔室的日期设为D0,显示了使用AAV的基因导入的时机。DJ1、DJ表示所使用的AAV的衣壳(分别为AAVDJ1、AAVDJ)。以斜体记载的部分表示导入的基因。各个病毒的右端数值(5、10、20、25、50、100)表示投予的AAV的滴度(×10^{10}GC,基因拷贝数)。(b)表示经时的溃疡面的外观图像。可知从D21开始在溃疡面上诱导了表皮组织。(c)是在D28时的皮肤溃疡面的立体显微镜图像。可知毛发生长(箭头)。(d)是组织所见。HE表示苏木精染色,KRT14表示作为表皮标记物的角蛋白14,DAPI表示细胞核。可知在独立于周围皮肤的溃疡面诱导的表皮部分,形成有由毛囊、脂腺构成的皮肤附属器结构。

[0047] 图9是对于在小鼠背部筋膜上安装腔室而制作的、与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面,使用AAV进行基因导入而诱导带有皮肤附属器的皮肤的试验的图。在与周围皮肤隔离的皮

肤溃疡面上确认到黑色毛发的生长。(a)是试验的图解。将制作皮肤溃疡、安装腔室的日期设为D-1,显示了使用AAV的基因导入的时机。DJ1、DJ、DJK2表示所使用的AAV的衣壳(分别为AAVDJ1、AAVDJ、AAVDJK2)。以斜体记载的部分表示导入的基因。各个病毒的右端数值(10、25、50、100)表示投予的AAV的滴度(×10^{10}GC,基因拷贝数)。(b)表示经时的溃疡面的外观图像。可知从D21开始在溃疡面上诱导了表皮组织(箭头)。(c)是在D30时的溃疡面诱导的皮肤组织的立体显微镜图像。可知黑色毛发生长(箭头)。

[0048] 图10是关于类固醇对于针对皮肤溃疡面的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验的图解。在投予AAVDJ-CAG-GFP病毒10^{11}GC/100μl的前一天,在小鼠背部制作皮肤溃疡面,安装硅腔室。制作了类固醇未投予组、将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、将10μl的康宁克通投予腔室内的局部投予组。在投予AAV后的第7天,用荧光立体显微镜观察皮肤溃疡面后,采集包含溃疡面在内的组织。

[0049] 图11是投予AAV后第7天的溃疡面的可见光和荧光观察下的立体显微镜所见,显示了在类固醇远端投予组中,在溃疡面上确认到强GFP的表达。

[0050] 图12是投予AAV后第7天的组织学所见,显示了在远端投予组中特别是在深层确认到大量的GFP阳性细胞。(a)是各组的溃疡组织的代表性所见,显示了在无类固醇的组中皮下、深部的GFP阳性细胞数少,而在远端投予组中特别是在深层确认到大量的GFP阳性细胞,且在局部投予组中浅层、深层的阳性细胞数均少。(b)是溃疡中央部的组织所见上计数的GFP阳性细胞数。显示了如果将浅层、深层合并,则在远端组中确认到与无类固醇相比显著多的GFP阳性细胞。(c)显示了如果限于深层(皮下+肌层),则在远端组中确认到与无类固醇组、局部投予组相比显著多的GFP阳性细胞。

[0051] 图13是关于不同浓度的类固醇对于针对皮肤溃疡面的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果,在投予AAVDJ-CAG-GFP病毒10^{11}GC/100μl的前一天在小鼠背部制作皮肤溃疡面,安装硅腔室。制作了类固醇未投予组、将1μl、10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、将1μl、10μl的康宁克通投予腔室内的局部投予组。在投予AAV后第6天,用荧光立体显微镜观察皮肤溃疡面后,采集包含溃疡面在内的组织,结果在远端投予组中10μl时阳性细胞数较多,而在局部投予组中1μl时阳性细胞数较多。

[0052] 图14是关于类固醇投予对于针对小鼠背部皮肤的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果,显示了通过类固醇的投予,基因导入效率提高。(a)是实验的图解。准备了将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、无类固醇的组。1天后,背部除毛,然后在背部皮肤皮内注射AAVDJK2-K14SCP3-GFPNLS10^{11}GC/35μl。在AAV注入后第2天进行观察、组织采集。(b)基于立体显微镜的观察所见上,确认到投予类固醇的动物的GFP表达更强。(c)组织学所见上,在投予类固醇的动物中以高效率、连续地确认到以表皮组织为中心的GFPNLS阳性细胞。在无类固醇的动物中,GFPNLS阳性细胞呈低频率零散分布。

[0053] 图15是关于不同浓度的类固醇对于针对皮肤的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果,显示了如果对腹部皮下远端投予的类固醇的量极端减少(0.01μl),则由类固醇带来的基因导入效率提高效果减少。

[0054] 图16显示出在小鼠中进行左上肢切断后,以避免小鼠自身对残端部的侵袭、尽可能地保持局部的安静为目的,将左上肢向背侧移位的手术操作。按照左段从上至下、中段从

上至下、右段从上至下的顺序示出各阶段的手术方法。手术中保留臂神经丛和向上肢的主干动静脉。通过本手术方法,左上肢移位至背侧。

[0055] 图17是关于类固醇投予对于针对小鼠前臂切断残端的基于AAV、逆转录病毒的基因导入效率产生的影响的试验结果,显示了通过类固醇的投予,基因导入效率提高。(a)显示出回收前臂切断组织的外观图和代表性的组织所见。在中央部分存在骨,在周围存在肌肉,皮肤和皮下脂肪覆盖其外侧。黑色比例尺表示2mm。(b)是在类固醇未投予、局部投予、远端投予后利用AAV和逆转录病毒载体将GFPNLS进行基因导入时的组织所见,在AAV、逆转录病毒中,通过类固醇的局部投予、远端投予而基因导入效率均大幅提高。特别是在AAV的研究中,在皮下、筋膜、肌肉、骨膜等构成四肢的广泛的组织中确认到显著的基因导入效率的提高。低倍放大图像的比例尺表示2mm,高倍放大图像的比例尺表示500μm。

[0056] 图18是关于类固醇投予针对小鼠大腿前面肌肉的基于mRNA的基因导入效率产生的影响的试验的结果,显示了通过类固醇的投予,基因导入效率提高。(a)是向腹部皮下远端投予类固醇1天后,将使用Lipofectamine 2000处理的表达EGFP的mRNA注入裸鼠大腿部前面肌肉体内12小时后的立体显微镜所见。显示了在类固醇远端投予组的肌肉表面确认到用立体显微镜可确认的荧光信号。(b)是肌肉体的组织所见,显示了在类固醇投予组中确认到更强的GFP的表达。

[0057] 图19是关于类固醇投予对于针对体外培养细胞的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果,显示了通过适当浓度的类固醇而可以得到更高的基因导入。在1、10μg/ml类固醇存在下,与无类固醇相比,确认到更高的GFP阳性细胞,而在100、1000μg/ml类固醇存在下,由于对细胞的类固醇作用,细胞数、阳性细胞数减少。

[0058] 图20是关于类固醇投予对于皮下注射的荧光二氧化硅粒子的动态产生的影响的试验结果,显示了通过类固醇的投予,局部注入的荧光二氧化硅粒子的局部清除率降低。(a)是实验的图解,准备了无类固醇的组、以及在1天前在腹部皮下注射10μl的类固醇康宁克通A(40mg/ml)的远端投予组,在小鼠背部皮下注射具有与AAV相同程度大小的荧光二氧化硅粒子(sicastar(注册商标)-redF,plain(无修饰),30nm,25mg/ml)30μl后,立即、1、3、6、9、12、18、直至24小时后,使用荧光立体显微镜进行局部观察,分析类固醇对荧光二氧化硅粒子的局部滞留产生的影响。(b)的左侧是根据曝光时间(30msec)经时拍摄荧光显微镜图像的结果,右侧是经过24小时后,组织回收时以更长的曝光时间进行拍摄的结果。显示了注射类固醇的动物在注入后,二氧化硅粒子明显地局部滞留。在经过24小时的时间点的观察中,在无类固醇的动物中,也显示出粒子进一步向周边扩散的所见。(c)是在经过24小时的时间点采集的组织的组织切片所见。并列显示出苏木精伊红染色(HE)、利用DAPI的核染色和二氧化硅、以及仅二氧化硅的荧光观察所见。组织所见上也显示在注射类固醇的动物中,与无类固醇的动物相比,二氧化硅粒子向周围组织的扩散得到抑制,更明显地局部滞留。

[0059] 图21显示裸鼠前臂切断部的残端处理方法的图解。在裸鼠前臂的皮肤表面上,在比手腕关节近端的部分存在伴有平缓突出的伴有轻微发红的结构物(右侧照片箭头)。在新生儿的小鼠中,在该部位也存在突起,其特征是从出生时起就长出了毛发(左侧照片箭头),是解剖学上一贯存在的结构物。通过将切断高位设为比该结构物近端的位置,能够可靠地在比手关节近端的位置进行切断。关于切断部,单纯地横向切断,或者在切断后施加残端部

的周围皮肤切除,或者在切断时将神经保留得较长。切断后的创面设为开放创口,或者将周围的皮肤用手指压接或缝合。在从残端部分的出血多的情况下,可以通过安装硅帽来促进止血。

[0060] 图22是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,然后将切断面设为开放创口的试验结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。在切断后70天为止的期间,在外观上没有确认到大的残端部的形态变化。组织切片上,骨的残端部分被皮质骨封闭。软组织通过周边皮肤的收缩封闭而治愈。未确认到显著的组织再生。上方的比例尺表示5mm,下方的比例尺表示1mm。虚线表示根据骨的形态判断的切断面。

[0061] 图23是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。利用逆转录病毒进行POLE4、NFIB、PPARD、FGF10、FGF20、FGF2的基因导入,利用AAVDJ1进行PRRX1、HDAC2的基因导入,利用AVDJ进行LEF1、SHH的基因导入。关于逆转录病毒,在即将切断之前至切断后第5天的期间局部注入10次。关于AAVDJ-SHH,在切断后立即局部注入1次。关于其他的AAV载体,将3种混合,在切断当日创面涂布2次,在次日注入2次,在第2天注入3次。在切断后经过4周时,前端部分的组织开始轴向伸长。在第36天的时间点回收的组织的组织所见上,确认到在前端部分的组织内骨轴向延伸。进而,前端部分超过骨的前端部分而由软组织块形成(放大图像)。组织所见内的比例尺表示10mm。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3、4、5段:组织所见连续切片图像和放大图像。

[0062] 图24是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。利用逆转录病毒进行PRDX2、POLE4、NFIB、PPARD、FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、SHH的基因导入,利用AAVDJ1进行PRRX1、HDAC2的基因导入,利用AVDJ进行LEF1的基因导入。关于逆转录病毒,在即将切断前和切断后第2天至第5天的期间局部注入5次。关于AAV载体,将3种混合,在即将切断之前和次日进行2次注入。在切断后经过3周时,前端部分的组织开始轴向伸长。在第40天的时间点回收的组织的组织所见上,在骨切断面的远端形成软组织块,从其内部确认到伴有骨小梁结构的骨的新生(放大图像)。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3、4、5段:组织所见连续切片图像和放大图像。

[0063] 图25是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的基因导入。在残端部外侧利用逆转录病毒进行SHH的基因导入。在残端部利用AAVDJK2进行FGF8的基因导入。关于表达6个基因的逆转录病毒,在从即将切断之前到第5天的期间局部注入18次。关于表达SHH的逆转录病毒,在刚切断后至第3天的期间局部注入11次。关于表达FGF8的AAVDJK2,在切断后第5天至第23天的期间局部注入7次。切断后经过3周后开始,前端部的形状变为平坦,从手掌侧观察时看到分支的白色结构物。在第28天的时间点回收的组织的组织所见上,软组织块中,与白色结构物的位置一致地聚集存在骨髓细胞(箭头)。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观腹侧正面图像,第3段左侧:第28天的外观手掌侧图像,第3段右侧:组织所见。

[0064] 图26是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和代表性的组织

所见以及放大图像。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。关于表达SHH、FGF8的AAVDJ,从切断前一天至切断第20天为止以7天间隔局部注入4次。关于表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4的逆转录病毒,从切断时至第4天为止局部注入20次。接着,将表达OCT4的逆转录病毒从切断第5天至切断第10天为止局部注入16次。在即将切断之前注入初次的逆转录病毒液时,混合注入康宁克通A。切断后经过10周左右起,在前端部出现突起状的结构,继续伸长。在第105天的时间点回收的组织的组织所见上,确认到在伸长的组织内沿轴向纵贯的细胞结构。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段左侧:包含突起状结构物的组织所见,第3段右侧:突起状结构物的放大图像。

[0065] 图27是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和代表性的组织所见以及放大图像。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。关于表达SHH、FGF8的AAVDJ,从切断前一天至切断第20天为止以7天间隔局部注入4次。关于表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2的逆转录病毒,从切断时至第4天为止局部注入20次。接着,将表达OCT4、SOX2的逆转录病毒从切断第5天至切断第10天为止局部注入16次。在即将切断之前注入初次的逆转录病毒液时,混合注入康宁克通A。从切断后经过8周左右起,在前端部出现突起状的结构,然后前端部以分支的形状继续伸长。在第70天的时间点回收的组织的组织所见上,确认到在伸长的分支部内沿轴向纵贯的细胞结构。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段左侧:包含分支伸长的结构物的组织所见,第3段右侧:分支伸长的结构物的放大图像。

[0066] 图28是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和代表性的组织所见以及放大图像。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。关于表达SHH、FGF8的AAVDJ,从切断前一天至切断第20天为止以7天间隔局部注入4次。关于表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒,从切断时至第4天为止局部注入20次。接着,将表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒从切断第5天至切断第10天为止局部注入16次。在即将切断之前注入初次的逆转录病毒液时,混合注入康宁克通A。从切断后经过8周左右起,在前端部出现突起状的结构,然后前端部以分支的形状继续伸长。在第98天的时间点回收的组织的组织所见上,确认到在伸长的分支部内沿轴向纵贯的与手指的远节指骨类似的形状的由软骨系细胞构成的组织结构、伴有骨新生的骨小梁结构。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段:外观腹侧正面图像,第4段左侧:第98天的时间点的前端部分的放大图像,第4段中间:包含分支伸长的结构物的组织所见,第4排右侧:分支伸长的结构物的组织所见的放大图像。

[0067] 图29是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和代表性的组织所见以及放大图像。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6、

SHH的基因导入。在残端部前端利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。关于表达FGF8的AAVDJ,从切断前一天至切断第20天为止以7天间隔局部注入4次。关于表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒,从切断时至切断第5天为止局部注入16次。表达SHH的逆转录病毒从切断时至第3天为止局部注入4次。接着,将表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒从切断第6天至切断第8天为止局部注入7次。在切断后注入逆转录病毒液时,混合注入康宁克通A。在切断后第56天的时间点回收的组织的组织所见上,在骨残端部的远端形成袋状的结构,在内部确认到与软骨组织和周围的肌肉独立的肌束新生。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观腹侧正面图像,第3段中间:组织所见的整体图像,第3段左侧:骨残端部远端袋状结构内的放大图像,箭头为软骨组织,第3段右侧:骨残端部远端袋状结构内的放大图像,箭头为新生的肌肉组织。

[0068] 图30是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。在切断前利用混合注入了FGF2的逆转录病毒1天1次共3天进行HMGB3、DMNT、1HDAC2、PRDX2、FGF10的基因导入。在即将切断之前也将混合注入了FGF2的表达HMGB3、DMNT、1HDAC2、PRDX2、FGF10的逆转录病毒液进行局部注入。在切断后残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入。在切断第1天、第2天,将逆转录病毒液1天1次涂布于切断面。外观上,随时间的推移,前端开始突出、伸长。组织学上在骨残端部诱导了伴有与关节内软骨类似的软骨内骨化样组织像的软骨组织。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3、4段:组织所见连续切片图像和放大图像。

[0069] 图31是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断4天前至2天前进行利用逆转录病毒的FGF10的基因导入和FGF2注入。切断时,将神经残端保留得较长并进行切断,切除残端部周围皮肤后,再次注入病毒液。切断1周后,在外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入。从组织学上残端部附近的皮肌层具有连续性地诱导了软骨组织。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段:组织切片前端部放大图像,第4段:包含前端部分的组织所见图像。

[0070] 图32是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断4天前至2天前进行利用逆转录病毒的HMGB3、DMNT1、HDAC2、FGF10的基因导入和FGF2注入。切断时,将神经残端保留得较长并进行切断,切除残端部周围皮肤后,再次注入病毒液。切断1周后,在外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入。组织学上,确认到从残端部附近的皮肌层具有连续性地诱导了软骨组织,软骨样组织被覆骨残端部。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段左侧:包含前端部分的切片的组织所见,第3段右侧:前端部分组织所见的放大图像。

[0071] 图33是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断8天前至1天前进行利用逆转录病毒的MSX1、MSX2、LIN28A、MEIS1、FGF10的基因导入和FGF2注入。切断时,将神经残端保留得

较长并进行切断,切除残端部周围皮肤后,再次注入病毒液。切断11天后,在外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入。切断14天后,在前端部分利用AAVDJK2进行LEF1、FGF8的基因导入。组织学上诱导了骨残端的轴向延伸,在骨残端部诱导了伴有与关节内软骨类似的软骨内骨化样组织像的软骨组织。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段:包含前端部分的相邻的组织切片的所见(左起第1个和第3个)和各自的前端部分的放大图像(左起第2个和第4个)。

[0072] 图34是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断5天前至2天前利用逆转录病毒进行MSX1、MSX2、LIN28A、WNT7A、FGF10的基因导入和FGF2注入。在切断前一天,利用AAVDJ1进行SHH的基因导入,利用AAVDJK2进行LEF1的基因导入。注入逆转录病毒液后进行横向切断,切除残端部周围皮肤。切断次日也注入逆转录病毒液。组织学上在切断残端周围的皮下诱导了肌肉组织。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段左侧:包含前端部分的切片的组织所见,第3段右侧:前端部分组织所见的放大图像。

[0073] 图35是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断5天前至2天前进行利用逆转录病毒的LEF1、HDAC2、PRDX2、WNT7A、FGF10的基因导入和FGF2注入。在切断前一天,利用AAVDJ1进行SHH的基因导入,利用AAVDJK2进行LEF1的基因导入。注入逆转录病毒液后进行横向切断,切除残端部周围皮肤。切断次日也注入逆转录病毒液。组织学上在切断残端周围的皮下诱导了肌肉组织。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3段左侧:包含前端部分的切片的组织所见,第3段右侧:前端部分组织所见的放大图像。

[0074] 图36是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后利用AAV进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和组织所见。从切断后至第2天,在残端部利用AAVDJ进行LEF1、PRRX1、HDAC2、PRDX2、PARD、FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、SHH的基因导入。前端部分带有圆度地增大,组织学上从皮下到深筋膜下的肌肉组织内确认到脂肪组织的增生。从上开始第1段:外观背侧正面图像,第2段:外观侧面图像,第3、4段:组织所见连续切片图像。

具体实施方式

[0075] 1.对皮肤溃疡面的细胞具有优异的基因导入效率的AAV的用途

[0076] 在本发明中,“皮肤溃疡面的细胞”是存在于皮肤缺损的皮肤溃疡面的细胞,除了真皮来源的成纤维细胞、脂肪组织的间充质来源的脂肪来源的间充质细胞、脂肪细胞、存在于筋膜的细胞、存在于肌肉组织的间充质的细胞、肌肉细胞、组织巨噬细胞等生理上存在于皮肤和软组织的细胞以外,还包括通过创伤信号而聚集于皮肤溃疡面的单核细胞、巨噬细胞等循环血液来源的细胞等。

[0077] 已知AAV根据衣壳的结构而对特定的细胞种类、组织显示出高基因导入效率,即具有指向性,特别是对于小鼠的皮肤和软组织、以及皮肤溃疡面的细胞,作为人工开发的衣壳的AAVDJ显示出比其他衣壳大幅优异的指向性(参照非专利文献2,Grimm D,Lee JS,Wang

L,Desai T,Akache B,Storm TA,Kay MA.In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses.J Virol.2008Jun;82(12):5887-911.)。

[0078] 在本发明中,“基因治疗”不仅是指通过使目标基因表达而补充目标基因的功能缺失的治疗法,还指通过使目标基因表达而实现组织再生的治疗法、进行微RNA、siRNA等具有特异性功能的人工基因的基因导入的治疗法、以基因组基因的改变、基因组编辑为目的而进行基因导入的治疗法等以疾病治疗、生理功能提高、老化预防/老化改善等治疗为目的而进行基因导入的所有治疗。

[0079] 在本发明中,“基因导入载体”是指为了操作动植物的细胞的基因表达、或者为了操作基因本身而将DNA、RNA递送到动植物的细胞内的介质或载体,作为代表性的基因导入载体,有AAV、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、仙台病毒载体等病毒载体、质粒载体、mRNA、以mRNA为构成物质的脂质纳米粒子等。

[0080] 在本发明中,“基因导入用医药品”是指在需要治疗或预防疾病、病态障碍或从生理状态的功能降低的对象、期望从正常状态作出进一步改善(针对年龄增长性变化的复原等)的对象中,为了治疗或预防疾病、病态障碍或从生理状态的恢复、或者从正常状态作出进一步改善而使用的物质。以影响人或动物的结构或功能为目的的准药品、化妆品等也包含在该范畴内。

[0081] 在本发明中,“可以用作基因治疗法的研究开发工具”不仅是指用作基因治疗的实验动物中的实证实验的工具。还包括最终为了设想诱导基因表达的其他方法(各种病毒载体、质粒DNA投予、微RNA、siRNA、mRNA投予等)的治疗法开发、效果验证而使用基因导入的情况。尤其还包括用作CRISPR筛选等筛选方法的一环的情况。

[0082] 在本发明中,“可以作为以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具使用”包括如下情况:以病态模型制作、分子生物学信号通路的控制等为目的,使用基因导入作为研究开发工具,从而最终用于低分子化合物、中/高分子化合物、蛋白质制剂、抗体医药品、细胞医药品等基因治疗以外的治疗法开发、生物学研究开发工具。

[0083] 本发明的对皮肤溃疡面的细胞具有优异的基因导入效率的AAV即AAVDJ1具有如下优点:对于皮肤溃疡面的细胞,与包括AAVDJ的其他衣壳相比,对皮肤溃疡面的细胞显示更高的基因导入效率、优异的指向性,因此除了可以用作针对生物体内皮肤溃疡面的基因治疗中的基因导入载体以外,还可以用作皮肤溃疡面的基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。由于在培养存在于皮肤溃疡面的各种细胞时也显示出高指向性,因此作为针对培养细胞的基因导入载体,可以用作使用培养细胞的基因治疗中的基因导入载体,除此以外,还可以用作基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。

[0084] 本发明的对皮肤溃疡面具有优异的基因导入效率的AAV是对衣壳改变AAVDJ文库使用定向进化法来开发的,所述衣壳改变AAVDJ文库是利用质粒来制作的,该质粒按照在AAVDJ衣壳的第589、590位的氨基酸即NR的部位编码QRG、接着编码随机7个氨基酸、接着编码A的11个碱基(QRGXXXXXXXA(序列号1),X为随机氨基酸)的方式改变AAVDJ的Rep-Cap衣壳

的碱基序列的一部分(参照Muller OJ,Kaul F,Weitzman MD,Pasqualini R,Arap W,Kleinschmidt JA,Trepel M.Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors.Nat Biotechnol.2003;21(9):1040-6.)。将衣壳改变AAVDJ文库感染小鼠背部的皮肤溃疡面后,回收感染的溃疡面组织,从其中分离培养原代间充质细胞。从细胞内提取包含病毒基因组的DNA,对提取DNA进行PCR,扩增包含随机化的碱基序列的片段,将其克隆至骨架载体中,再次制作AAV,将该循环重复。对重复4个系列的独立循环后残留的片段进行测序,对于在随机化序列部位具有从多个系统检测出的多个候选序列的改变AAVDJ,分别准备表达GFPNLS的AAV。利用小鼠脂肪来源的间充质细胞、以及在小鼠背部制作的皮肤溃疡面来研究基因导入效率的结果是,EPKARAP(序列号2)显示最优异的基因导入效率,因此将具有该肽的AAV作为对皮肤溃疡面的细胞具有优异的指向性的AAVDJ1。即,在AAVDJ1的置换肽中,尤其EPKARAP(序列号2)的序列在感染性方面发挥重要的作用。

[0085] 2.对皮肤溃疡面的细胞具有优异的基因导入效率的AAV的制造方法

[0086] 本发明的对皮肤溃疡面的细胞具有优异的指向性的AAVDJ1是具有公知的AAVDJ衣壳(序列号3:氨基酸序列1)的第589、590个氨基酸即NR的部位被QRGEPKARAPA(序列号4)置换的衣壳(序列号5:氨基酸序列2)的AAV。通过与编码作为衣壳序列的AAVDJ1的Rep-Cap质粒、搭载了目标基因的载体质粒、辅助质粒的同时转染,或基于杆状病毒的AAV制造法等制造AAV的一般方法,制成表达目标基因的AAV。示出了编码AAVDJ1的碱基序列(序列号6:衣壳碱基序列1)、Rep-cap质粒的碱基序列(序列号7:质粒碱基序列1)。

[0087] 公知的AAVDJ衣壳的氨基酸序列(序列号3)如下。对第589、590个NR的部位标注下划线。

[0088] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTG
GTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDD
EEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVW
QDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIE
WELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0089] 本发明的AAVDJ1衣壳的氨基酸序列(序列号5)如下。对置换后的QRGEPKARAPA(序列号4)的部位标注下划线。

[0090] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEA
DAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR
PVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADG
VGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR
DWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVF
MIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLS

RTQTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPA
MASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGQRGEPKARAPAQ
AATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSK
LNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL*

[0091] 本发明的编码AAVDJ1衣壳的碱基序列的1例(序列号6)如下。对改变后的部位标注下划线。

[0092] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGG
AAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGG
GTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTC
CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCT
TGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGG
AGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGA
GACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAAT
GGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCC
CTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACT
GGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACC
AAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG
CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCA
ACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGC
AACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG
GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGC
AGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTAC
CGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTC
CTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACA
GACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG
CCAGAGAGGCGAACCAAAAGCACGTGCACCAGCCCAGGCGGCCACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAG
GCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTT
CACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACACGCCTGTACC
TGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCG
TGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCCAACTACTAC
AAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCACCCGTTACCT
CACCCGTAATCTGTAA

[0093] 本发明的编码AAVDJ1衣壳的Rep-cap质粒碱基序列的1例(序列号7)如下。下划线部对应于AAVDJ1衣壳。

[0094] CCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCA

TTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTG
ATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGC
CCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAAACCACCG
GGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTCGCGAAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATC
GAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGA
GTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATT
TAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAG
CAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTCAGCCAGGTACATGGAGCT
GGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCT
TCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAA
ACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACT
AAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCA
TCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGG
TGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAA
GATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGT
CCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCA
ACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTT
TGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAAT
TCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGC
GAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTC
TCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCT
TCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCG
TATCAGAAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGT
GGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGG
CTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGA
GCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGG
GAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGAC
AACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAA
CCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGG
CTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAG
CAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGA
ACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACG
AGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACC
ACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG
ATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACT
TTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTC
AACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGT
GTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGGCTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGG
ACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTAC

TGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCC
TTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCGGCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACT
TGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATG
GCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAA
CAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGG
CCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCA
GAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTAC
GGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCCAGAGAGGCGAACCAAAAGCACGTGCACCAGCCCAGG
CGGCCACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGG
CCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACA
CCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGA
ACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAG
CGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCCAACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGG
CGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAATTGCCTGTTAATCAATAAACCG
GTTGATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGAGGTCCTGTAT
TAGAGGTCACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTGCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACG
CAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGACTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCT
TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGC
GCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC
ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCG
ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCT
CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGAT
ACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTG
GTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAAT
AGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTC
CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGA

TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATG
CCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAG
TTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG
AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA
GTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAC
CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTG
GAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCAC
TACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGC
CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGC
TAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCG
CGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTG
GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC
GGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGATCGAGGTCGACGGT
ATCGGGGGAGCTCGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAG

[0095] 3.实验结果1

[0096] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0097] 实施例1

[0098] 图1是针对小鼠背部皮肤溃疡面的AAVDJ与AAVDJ1的基因导入效率的比较研究试验的结果。准备衣壳质粒、在CAG启动子下表达GFPNLS(NLS为nuclear localization signal(核定位信号)的缩写,具有该序列的荧光色素与细胞核一致地发出荧光)、mCherryNLS的载体质粒(序列号8:质粒碱基序列2,序列号9:质粒碱基序列3)、作为辅助质粒的pAD5质粒,按照常规方法进行通过利用磷酸钙法转染293AAV细胞来进行的AAV制作、利用超离心分离的浓缩(参照非专利文献2),准备AAVDJ-GFPNLS载体、AAVDJ-mCherryNLS载体、AAVDJ1-GFPNLS载体、AAVDJ1-mCherry载体,然后准备将分别包含10^{11}GC的1)AAVDJ-GFPNLS+AAVDJ-mCherryNLS、2)AAVDJ1-GFPNLS+AAVDJ1-mCherryNLS、3)AAVDJ-GFPNLS+AAVDJ1-mCherryNLS、4)AAVDJ1-GFPNLS+AAVDJ-mCherryNLS的组合载体的50μl的病毒液,将其接种在安装于小鼠背部的硅腔室内的溃疡面上,各组5只。4天后,使用荧光立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)拍摄溃疡面后,采集包含溃疡面的组织,用4%多聚甲醛固定后包埋在OCT复合物中,制作冷冻切片。使用荧光玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将用DAPI进行了核染色的切片和HE染色的相邻切片作为图像文件读取。此时,使用利用同一衣壳病毒进行了基因导入的组的样品,调整绿色荧光摄影、红色荧光摄影的曝光时间。以相邻的HE染色连续为指标,将DAPI染色切片的区域分类为表层(皮下脂肪组织上方的筋膜上)、脂肪层(皮下脂肪组织)、肌层(斜方肌等肌肉)。为了分割各层的核,生成通过RMS prop优化器和二元交叉熵/Dice损失(BCE-dice-loss)函数进行了学习的UNet++模型。为了生成学习数据,将图像以512×512像素切出,以400个次数(epoch)、8的批大小(batch size)、10^{-4}的学习率应用于模型学习。学习后,将模型应用于全部图像来预测核区域,在[0,1]的范围内计算各像素

的概率。提取概率在[0.5,1]的范围内的像素作为核区域,接着使用分水岭(Watershed)算法分割核区域。将具有5个以上的荧光阳性像素的核定义为基因导入阳性细胞的核。对于各区域和各层,计数基因导入阳性细胞的数量。对于各样品,分析10～16个切片(平均14.4)。

[0099] 作为结果,根据溃疡面的荧光立体显微镜观察,在利用同一衣壳进行基因导入的组中,绿色荧光观察、红色荧光观察中均可观察到类似的信号,但在利用不同的衣壳进行基因导入的组中,绿色荧光观察、红色荧光观察中观察到不同的信号。在基于组织所见的基因导入阳性的核的数量的分析中,在AAVDJ-GFPNLS+AAVDJ1-mCherryNLS、AAVDJ1-GFPNLS+AAVDJ-mCherryNLS的任一组的待测物中,特别是在脂肪层和肌层中,均确认到AAVDJ1衣壳的病毒的基因导入阳性细胞数比AAVDJ衣壳的病毒高。显示了AAVDJ1与AAVDJ相比,特别是对作为深部组织的脂肪层和肌肉层具有更高的基因导入效率。

[0100] 表达GFPNLS的载体质粒pAAV-CAG-GFPNLS的序列(序列号8)如下。

[0101] CTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCA
GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCA
ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGG
AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG

CCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAG
GGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA
GGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCC
ATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAGTACCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA
TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTC
TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC
GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGA
GAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCC
TATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTC
GCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCT
GTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGT
TCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTC
CTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
GAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGC
CCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA
GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCA
GAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAG
ACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCC
AAAAAAGAAGAGAAAGGTATAAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA
GATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCT
ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC
CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCT
GTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCT
GCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACC
TTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC
CTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCCGGGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGA
GTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG

TAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATG
TGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCCTAGAGCATGGCTACG
TAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC
GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCT

[0102] 表达mCherryNLS的载体质粒pAAV-CAG-mCherryNLS的序列(序列号9)如下。

[0103] CTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCA
GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCA
ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGG
AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG
CCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAG
GGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA
GGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA

GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCC
ATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAGTACCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA
TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTC
TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC
GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGA
GAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCC
TATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTC
GCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCT
GTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGT
TCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTC
CTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCCGCCACCATGGCATATCCGTAT
GATGTGCCGGATTATGCGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGT
GCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCC
AGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTAC
GGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTG
GGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCA
TCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAG
GCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGG
CGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCA
ACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCAC
TCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAA
AAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTATAAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTC
TGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCT
TTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTC
TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTG
GTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC
ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAA
ATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTT
CGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGC
CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCCGGGCGGCCGCTTCGAGCAGA
CATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTT
GTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATG
TTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGA
TCTTCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAG
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGC
CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG

TATTGGGCGCT

[0104] 4.对角质形成细胞/表皮组织具有优异的基因导入效率的AAV的用途

[0105] 本发明的对角质形成细胞/表皮组织具有优异的基因导入效率的AAV即AAVDJK2与已知对角质形成细胞显示高的基因导入效率的AAV2、AAV6、AAVDJ相比显示更高的基因导入效率和优异的指向性,因此可以用作针对生物体内表皮组织的基因治疗中的基因导入载体,此外还可以用作针对表皮组织的基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。由于构成表皮组织的培养角质形成细胞也显示出高指向性,因此可以用作使用培养角质形成细胞的再生医疗/基因治疗中的基因导入载体,此外还可以用作使用培养角质形成细胞的基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于使用培养角质形成细胞的基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。

[0106] 5.对角质形成细胞/表皮组织具有优异的基因导入效率的AAV的制造方法

[0107] 本发明的对角质形成细胞/表皮组织具有优异的指向性的AAV是具有如下衣壳的AAV:公知的AAVDJ衣壳(序列号3:氨基酸序列1)的第589个、第590个氨基酸即NR的部位被NAAAPRGDLAPAAR(序列号10)置换的衣壳(AAVDJK2)(序列号14:氨基酸序列3)、被NAAARGDTATLAAR(序列号11)置换的衣壳(AAVDJK1)(序列号15:氨基酸序列4)、被NAAARGDQQSLAAR(序列号12)置换的衣壳(AAVDJK3)(序列号16:氨基酸序列5)、被NAAAPRGDLRPAAR(序列号13)置换的衣壳(AAVDJK8)(序列号17:氨基酸序列6)。通过与编码作为衣壳序列的各AAV的Rep-Cap质粒、搭载了目标基因的载体质粒、辅助质粒的同时转染,或基于杆状病毒的AAV制造法等制造AAV的一般方法,从而制成表达目标基因的AAV。以下,作为参考,示出了编码AAVDJK2的碱基序列的一例(序列号18:衣壳碱基序列2)、编码AAVDJK1的碱基序列的一例(序列号19:衣壳碱基序列3)、编码AAVDJK3的碱基序列的一例(序列号20:衣壳碱基序列4)、编码AAVDJK8的碱基序列的一例(序列号21:衣壳碱基序列5)和编码AAVDJK2的Rep-cap质粒的碱基序列的1例(序列号22:质粒碱基序列4)。

[0108] AAVDJK2衣壳的氨基酸序列(序列号14)如下。对置换后的NAAAPRGDLAPAAR(序列号10)的部位标注下划线。

[0109] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTG
GTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDD
EEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNAAAPRGDLAPAARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0110] AAVDJK1衣壳的氨基酸序列(序列号15)如下。对置换后的NAAARGDTATLAAR(序列号11)的部位标注下划线。

[0111] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD

AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTG
GTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDD
EEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNAAARGDTATLAARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0112] AAVDJK3衣壳的氨基酸序列(序列号16)如下所述。对置换后的NAAARGDQQSLAAR(序列号12)的部位标注下划线。

[0113] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTG
GTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDD
EEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNAAARGDQQSLAARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0114] AAVDJK8衣壳的氨基酸序列(序列号17)如下。对置换后的NAAAPRGDLRPAAR(序列号13)的部位标注下划线。

[0115] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTG
GTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDD
EEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNAAAPRGDLRPAARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0116] 编码AAVDJK2衣壳的碱基序列的1例(序列号18)如下。对改变后的部位标注下划线。

[0117] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGG
AAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGG
GTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTC

CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCT
TGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGG
AGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGA
GACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAAT
GGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCC
CTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACT
GGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACC
AAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG
CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCA
ACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGC
AACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG
GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGC
AGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTAC
CGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTC
CTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACA
GACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG
CAACGCAGCAGCACCACGTGGTGATCTGGCACCAGCAGCAAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCG
TTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGAC
GGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACAC
GCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCC
AAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCC
AACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCAC
CCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA

[0118] 编码AAVDJK1衣壳的碱基序列的1例(序列号19)如下。对改变后的部位标注下划线。

[0119] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGG
AAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGG
GTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTC
CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCT
TGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGG
AGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGA
GACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAAT
GGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCC

CTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACT
GGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACC
AAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG
CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCA
ACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGC
AACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG
GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGC
AGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTAC
CGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTC
CTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACA
GACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG
CAACGCAGCAGCACGTGGTGATACTGCAACTCTGGCAGCAAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCG
TTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGAC
GGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACAC
GCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCC
AAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCC
AACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCAC
CCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA

[0120] 编码AAVDJK3衣壳的碱基序列的1例(序列号20)如下。对改变后的部位标注下划线。

[0121] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGG
AAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGG
GTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTC
CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCT
TGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGG
AGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGA
GACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAAT
GGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCC
CTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACT
GGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACC
AAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG
CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCA
ACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGC
AACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG
GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGC

AGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTAC
CGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTC
CTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACA
GACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG
CAACGCAGCAGCACGTGGTGATCAGCAGTCTCTGGCAGCAAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCG
TTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGAC
GGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACAC
GCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCC
AAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCC
AACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCAC
CCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA

[0122] 编码AAVDJK8衣壳的碱基序列的1例(序列号21)如下。对改变后的部位标注下划线。

[0123] ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGG
AAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGG
GTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTC
CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCT
TGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGG
AGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGA
GACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAAT
GGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGC
ATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAAC
CACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCC
CTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACT
GGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACC
AAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG
CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCA
ACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGC
AACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG
GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGC
AGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTAC
CGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTC
CTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACA
GACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG
CAACGCAGCAGCACCACGTGGTGATCTGCGTCCAGCAGCAAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCG
TTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGAC

GGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACAC
GCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCC
AAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCC
AACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCAC
CCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA

[0124] 编码AAVDJK2衣壳的Rep-Cap质粒碱基序列的1例(序列号22)如下。下划线部分对应于AAVDJK2衣壳。

[0125] CCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCA
TTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTG
ATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGC
CCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAAACCACCG
GGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTCGCGAAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATC
GAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGA
GTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATT
TAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAG
CAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTCAGCCAGGTACATGGAGCT
GGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCT
TCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAA
ACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACT
AAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCA
TCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGG
TGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAA
GATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGT
CCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCA
ACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTT
TGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAAT
TCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGC
GAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTC
TCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCT
TCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCG
TATCAGAAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGT
GGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGG
CTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGA
GCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGG
GAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGAC
AACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAA
CCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGG
CTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAG
CAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGA

ACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACG
AGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACC
ACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG
ATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACT
TTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTC
AACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGT
GTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGGCTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGG
ACGTGTTCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTAC
TGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACGTGCC
TTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCGGCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACT
TGTCTCGGACTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATG
GCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAA
CAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGG
CCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCA
GAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTAC
GGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACGCAGCAGCACCACGTGGTGATCTGGCACCAGCAG
CAAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTAC
CTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGG
ACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAACACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGT
CAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAA
AACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGATCCAGTACACCTCCAACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAA
TACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAATTGCCTGTTAATC
AATAAACCGGTTGATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGAG
GTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTGCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGA
GTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCAAGCCGAATTCTGCAGATATCCAT
CACACTGGCGGCCGCTCGACTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAA
TTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT
GCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC
GTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCG
TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA

AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAT
TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAA
GTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT
CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC
TGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC
GCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCG
CCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG
GTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG
GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT
CCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCA
TTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGT
TCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCG
ATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCT
AAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG
AGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGC
TACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTA
CGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGATCGAG
GTCGACGGTATCGGGGGAGCTCGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAG

[0126] 6.实验结果2

[0127] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0128] 实施例2

[0129] 图2是针对小鼠/人培养角质形成细胞的新AAVDJ变体与已知的AAV的基因导入效率的比较研究试验的结果。作为衣壳质粒,准备了在质粒碱基序列4(序列号22)的骨架质粒中整合了新AAVDJ变体AAVDJK1(序列号19:衣壳碱基序列3)、AAVDJK2(序列号18:衣壳碱基序列2)、AAVDJK3(序列号20:衣壳碱基序列4)、AAVDJK8(序列号21:衣壳碱基序列5)、以及对角质形成细胞具有优异的基因导入效率的已知AAV即AAV2、AAV2K1、AAV2K2、AAV2K3、AAV2K8、AAV6、AAVDJ作为衣壳序列的衣壳质粒(参照Sallach J,Di Pasquale G,Larcher F,Niehoff N,Rubsam M,Huber A,Chiorini J,Almarza D,Eming SA,Ulus H,Nishimura S,Hacker UT,Hallek M,Niessen CM,Buning H.Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy.Mol Ther.2014May;22(5):929-39.、Melo SP,Lisowski L,Bashkirova E,Zhen HH,Chu K,Keene DR,Marinkovich MP,Kay MA,Oro AE.Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly

recombinogenic AAV variant.Mol Ther.2014Apr;22(4):725-33.和Bonafont J,Mencía A,Chacón-Solano E,Srifa W,Vaidyanathan S,Romano R,Garcia M,Hervás-Salcedo R,Ugalde L,Duarte B,Porteus MH,Del Rio M,Larcher F,Murillas R.Correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by homology-directed repair-mediated genome editing.Mol Ther.2021Jun 2;29(6):2008-2018.),使用在CAG启动子下表达GFPNLS的载体质粒、作为辅助质粒的pAD5质粒,按照常规方法进行通过利用磷酸钙法转染293AAV细胞来进行的AAV制作、利用超离心分离的浓缩,得到含有各个AAV的载体溶液。关于小鼠角质形成细胞,使用了从3-5周龄的C57BL/6J Jcl小鼠的背部皮肤按照常规方法在饲养细胞上的培养条件下原代培养的细胞(参照非专利文献2)。关于人角质形成细胞,将市售的细胞即正常人表皮角质形成细胞(成人供体,混合(pooled),产品代码:C12006)(PromoCell,海德堡,德国)在与小鼠角质形成细胞同样的培养条件下维持后使用。关于小鼠/人角质形成细胞,均分别在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。在2天后、4天后、8天后以4个视野拍摄相位差显微镜照片和荧光照片。使用ImageJ软件,在图像上算出角质形成细胞形成菌落的区域的面积。在图像上计数了同区域内的GFPNLS阳性细胞数。算出角质形成细胞区域每单位面积的GFPNLS阳性细胞数。结果显示了,无论是对于小鼠角质形成细胞,还是对于人角质形成细胞,新AAVDJ变体AAVDJK1、AAVDJK2、AAVDJK3、AAVDJK8、尤其AAVDJK2与已知的AAV相比具有高基因导入效率。

[0130] 实施例3

[0131] 图3是针对小鼠/人培养间充质细胞的已知的AAV2、AAV2K2、AAVDJ与新AAVDJK2的基因导入效率的比较研究试验的结果。通过与实施例2同样的方法准备在CAG启动子下表达GFPNLS的具有各衣壳的AAV。小鼠脂肪来源的间充质细胞使用从3-5周龄的C57BL/6J Jcl小鼠的腹股沟部皮肤按照常规方法进行了原代培养的细胞(参照非专利文献2)。关于人真皮成纤维细胞(真皮成纤维细胞为真皮来源的间充质细胞),将市售的细胞即正常人真皮成纤维细胞(幼龄包皮,产品代码:C12300)(PromoCell,海德堡,德国)在与小鼠脂肪来源的间充质细胞同样的培养条件下维持后使用。将小鼠/人间充质细胞分别在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。接连8天,以4个视野拍摄相位差显微镜照片和荧光照片。计数每1张荧光拍摄照片(面积1.99mm^2)的GFPNLS阳性细胞数。在小鼠脂肪来源的间充质细胞中,在新AAVDJK2中没有确认到AAVDJ中所确认到的针对间充质细胞的高基因导入效率。在人成纤维细胞中,在新AAVDJK2中没有确认到AAV2、AAVDJ中所确认到的针对间充质细胞的高基因导入效率。

[0132] [参考例1]

[0133] 图4是针对小鼠背部皮肤的荧光二氧化硅粒子的注入试验的结果。准备了将与AAV相同程度大小的荧光二氧化硅粒子(sicastar(注册商标)-greenF,无修饰(plain),30nm,25mg/ml,Filgen)用磷酸缓冲生理盐水稀释至20倍的液体。在手术用显微镜下,使用29G的注射针,将20μl的稀释液在小鼠背部尽可能接近表层侧的深度进行皮内注射。在注射后0小时、1小时、3小时的时间点回收组织,埋入OCT复合物中进行冷冻。从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。在注入荧光二氧化硅

粒子后立即、经过1小时、3小时后的皮肤组织切片上,所注入的粒子大部分从皮内分布至皮下,而未分布于表皮。即,可知作为以表皮为对象的AAV的投予法,皮内注射虽然是标准的,但从效率、特异性方面考虑并不是优异的方法。

[0134] 实施例4

[0135] 图5是针对小鼠背部皮肤的AAVDJK2与AAVDJ的基因导入效率的比较试验的结果。通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,准备在CAG启动子下表达GFPNLS的AAVDJK2载体和在CAG启动子下表达mCherryNLS的AAVDJ载体,将以相同滴度(10^{11}GC(基因拷贝数)/35μl)包含两种AAV的溶液皮内注射至小鼠背部。注射2天后,一边用荧光立体显微镜观察注入部位,一边采集包含注入部位在内的组织。用4%多聚甲醛固定后包埋在OCT复合物中,制作冷冻切片。对相邻的切片进行HE染色,利用DAPI进行核染色,使用荧光玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。组织学所见上,利用AAVDJK2导入的GFPNLS在表皮中表达较强,在皮下组织中表达较弱,与此相对,利用AAVDJ导入的mCherry在表皮中表达较弱,在皮下组织中表达较强。可知与AAVDJ相比,AAVDJK2对表皮组织具有更高的基因导入效率、特异性。

[0136] 7.对角质形成细胞/表皮组织显示高特异性的启动子的用途

[0137] 本发明的对角质形成细胞/表皮组织显示高特异性的启动子即K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子与已知对角质形成细胞/表皮组织无论组织、细胞种类如何都带来高基因表达的CAG启动子相比,带来更高或同等的基因表达,另一方面,在以表皮附近的间充质细胞为代表的角质形成细胞/表皮组织以外的组织、细胞中仅带来相对低的基因表达,因此可以用作对培养角质形成细胞进行基因治疗时的基因导入载体、对生物体内表皮组织进行基因治疗时的基因导入载体,此外还可以用作这些基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。在针对角质形成细胞/表皮组织的基因治疗及其研究开发中,多数情况下优选将角质形成细胞/表皮组织以外的基因表达(非特异性的基因表达)抑制得较低,因此期待本发明的对角质形成细胞/表皮组织显示高特异性的启动子的有效性的状况较多。

[0138] 本发明的启动子不仅可以是K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子,也可以是对这些碱基序列具有高同一性的序列。这样的同一性通常为80%以上的同一性,优选为90%以上的同一性,更优选为95%以上的同一性,最优选为99%以上的同一性。

[0139] 8.具有对角质形成细胞/表皮组织显示高特异性的启动子的基因导入载体的制造方法

[0140] 本发明的对角质形成细胞/表皮组织显示高特异性的启动子即K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子通过作为AAV、慢病毒载体、裸质粒等的启动子序列使用而制成基因导入载体,从而对角质形成细胞/表皮组织高特异性地表达基因。例如,在以K14SCP3为启动子表达GFPNLS作为目标基因的AAV的情况下,在载体质粒内采用K14SCP3启动子序列(序列号23:启动子碱基序列1),设计质粒(序列号24:质粒碱基序列5),通过与编码衣壳的Rep-Cap质粒、辅助质粒的同时转染,或基于杆状病毒的AAV制造法等制造AAV的一般方法,从而制成表达目标基因的AAV。对于K16SCP3启动子(序列号25:启动子碱基序列2)、K16P5短启动子(序列号26:启动子碱基序列3)也同样。

[0141] K14SCP3启动子序列(序列号23)如下。

[0142] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCATAAGAAGGAGACATGGTGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTG

GTGGGGCACAGAGGAAGCCGGTACTGGGCTCTGCACCCCATTCCCGCTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTC
TCCAGTGAGCACAGCCTCCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGCCTCCCAACAAAAGCATCTGTCCCTCAGCCA
AAACCCCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGGCTGGGCCAGGGTGGGGGGACCATTCTCTGCAGGGAGATTAG
GAGTGTCTGTCAGGGGCGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTTGAGAGTCCTTTGCTGGCAGAT
TTGGGGAGCCCACAGCTCAGATGTCTGTCTCAGCATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCT
TCTCTGGCTTCTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTGGGGTTGGGGGTGACAGAGGGTCCTGCTTCTCTTCTAGGAGCAGT
TGATCCCAGGAAGAGCATTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGATGCGTCAGGCAGC
CCCAGACACGATCACATTCCTCTCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCTAGGGGCTGATGGGAGGGTGGGGTGG
GGGCCGGAAGGGTTTAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGTCCGCCTGGAGACCTCGAGCCGAG
TGGTCGTGCCTCCATAGAA

[0143] pAAV-K14SCP3-GFPNLS质粒碱基序列的1例(序列号24)如下。下划线部分对应于K14SCP3启动子。

[0144] CTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCA
GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAG
GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCA
ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGA
CCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGG
AAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC
CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA

GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG
CCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAG
GGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA
GGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCC
ATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAGTACCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA
TCATATGCTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCATAAGAAGGAGACATGGTGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTGG
TGGGGCACAGAGGAAGCCGGTACTGGGCTCTGCACCCCATTCCCGCTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTCT
CCAGTGAGCACAGCCTCCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGCCTCCCAACAAAAGCATCTGTCCCTCAGCCAA
AACCCCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGGCTGGGCCAGGGTGGGGGGACCATTCTCTGCAGGGAGATTAGG
AGTGTCTGTCAGGGGCGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTTGAGAGTCCTTTGCTGGCAGATT
TGGGGAGCCCACAGCTCAGATGTCTGTCTCAGCATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCTT
CTCTGGCTTCTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTGGGGTTGGGGGTGACAGAGGGTCCTGCTTCTCTTCTAGGAGCAGTT
GATCCCAGGAAGAGCATTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGATGCGTCAGGCAGCC
CCAGACACGATCACATTCCTCTCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCTAGGGGCTGATGGGAGGGTGGGGTGGG
GGCCGGAAGGGTTTAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGTCCGCCTGGAGACCTCGAGCCGAGT
GGTCGTGCCTCCATAGAAGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCT
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATTTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC
GGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACA
CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC
AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGC
TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
CTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTGATCCAAA
AAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTATAAAAGCTTCGAG
GAATTCGAAGCTTCTAGGTACCGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA
GATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCT
ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC
CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCT
GTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCT
GCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACC
TTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC
CTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCCGGGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGA

GTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG
TAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATG
TGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCCTAGAGCATGGCTACG
TAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC
GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCT

[0145] K16SCP3启动子序列(序列号25)如下。

[0146] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCAGAAGAAGGAGACGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTGGCAGG
GCACAGAGGAAGCCAGTACCGGGCCCTGCACCCCATTCCCACTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTCTCCAG
TGAGCACAGCCTTCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGGCTCCCAACAAAAGCATCTGCCCCTCAGCCAAAACC
CCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGACTGGGTCAGGGTGGGGGAACCATTCTCTGCAGGGAGATTAGGAGTG
TCTGTCAGGGGTGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTCGAGAGTCCTTTGCTGGCAGATTTGGG
GAGCCCACAGCACAGGTGTCTGTCTCAGTATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCCTCTCT
GGCTTTTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTTGGGGGTGGGGTGAGAGAGGGTCCTGCTTTTCTTCTAGGAACAGTTGATC
CCAGGAAGAGCAGTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGACGCGTCAGGCAGCCCCAG
ACACGACCACATTCCTCCCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCCAGGGGCTGAGGGGAGGGTGGGGTGGGGGCC
GGAAGGGTTTAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGTCCGCCTGGAGACCTCGAGCCGAGTGGTC
GTGCCTCCATAGAA

[0147] K16P5短启动子序列(序列号26)如下。

[0148] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCAGAAGAAGGAGACGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTGGCAGG
GCACAGAGGAAGCCAGTACCGGGCCCTGCACCCCATTCCCACTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTCTCCAG
TGAGCACAGCCTTCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGGCTCCCAACAAAAGCATCTGCCCCTCAGCCAAAACC
CCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGACTGGGTCAGGGTGGGGGAACCATTCTCTGCAGGGAGATTAGGAGTG
TCTGTCAGGGGTGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTCGAGAGTCCTTTGCTGGCAGATTTGGG
GAGCCCACAGCACAGGTGTCTGTCTCAGTATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCCTCTCT
GGCTTTTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTTGGGGGTGGGGTGAGAGAGGGTCCTGCTTTTCTTCTAGGAACAGTTGATC
CCAGGAAGAGCAGTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGACGCGTCAGGCAGCCCCAG
ACACGACCACATTCCTCCCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCCAGGGGCTGAGGGGAGGGTGGGGTGGGGGCC
GGAAGGGTTTGAGGGCTGGGACTCCCGGGGCCCCATGGGAAAGTGTAGCCTGCAGGCCCATACCTCCCCCTGTGAAT
CACGCCTGGCGGGACAAGAAAGCCCAAAATACCCCAAACAATGAGTTTCCAGTAAAATATGACAGACATGATGAGGT
GGAGGAGAGGAGGGACCTGGCTGGGAGTTGGCGCTAGCCTGTGGGTGATGAAAGCCAAGGGGAATGGAAAGTGCCAG
GCCCGCCTCCTACCCATGAGTATAAAGCACTCGCATCCCTTTCCAATTTACCCGAGCACCTTCTCTTCACTCAGCCA
ACTGCTCGCTC

[0149] K14启动子序列(序列号27)如下。

[0150] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCATAAGAAGGAGACATGGTGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTG
GTGGGGCACAGAGGAAGCCGGTACTGGGCTCTGCACCCCATTCCCGCTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTC
TCCAGTGAGCACAGCCTCCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGCCTCCCAACAAAAGCATCTGTCCCTCAGCCA
AAACCCCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGGCTGGGCCAGGGTGGGGGGACCATTCTCTGCAGGGAGATTAG
GAGTGTCTGTCAGGGGCGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTTGAGAGTCCTTTGCTGGCAGAT

TTGGGGAGCCCACAGCTCAGATGTCTGTCTCAGCATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCT
TCTCTGGCTTCTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTGGGGTTGGGGGTGACAGAGGGTCCTGCTTCTCTTCTAGGAGCAGT
TGATCCCAGGAAGAGCATTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGATGCGTCAGGCAGC
CCCAGACACGATCACATTCCTCTCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCTAGGGGCTGATGGGAGGGTGGGGTGG
GGGCCGGAAGGGTTTGCTTTGGGAGGTTGTCTGGGAGATTGCTGAAGTTTTGATATACACACCTCCAAAGCAGGACC
AAGTGGACTCCTAGAAATGTCCCCTGACCCTTGGGGCTTCAGGAGTCAGGGACCCTCGTGTCCACCTCAGCCTTGCC
CTTGGCACAGCCCAGCTCCACTCCAGCCTCTACTCCTCCCCAGAACATCTCCTGGGCCAGTTCCACAAGGGGCTCAA
ACGAGGGCGCCTGAGCTGCCCACACTAGGGATGTTCTGGGGGTCTGAGAAGATATCTGGGGCTGGAAGAATAAAAGG
CCCCCCTAGGCCTGTTCCTGGATGCAGCTCCAGCCACTTTGGGGCTAAGCCTGGGCTATAACAATGCCAACGAGGCT
TCTTGCCATACTCGGTTTACAAAACCCTTTCACATACATTGTCGCATTGGATTCTCAGAGCTGACTGCACTAAGCAG
AATAGATGGTATGACTCCCACTTTGCAGATGAGAACACTGAGGCTCAGAGAAGTGCCAAGCCCTGGGTCACAGAGGC
GTAAATGGCAGAGCCAGGACCCACCTGACTCCAGGCTGTTTCCTGGCCTCCATGAGGCCACCTGCCCTATGGTGTGG
TGGATGTGAGATCCTCACCATAGGGAGGAGATTAGGGTCTGTGCTCAGGGATGGGGAGAGCTGCCTGGATTTCTCTT
TGATGGGGATGTTGGGGTGGGAATCACGATACACCTGACTAGCTGGGTGTATTTCAGGGATGGGACAGACTTCTCAG
CACAGCATGGGAGGTCAGGCCTGGGAGGGCCCCCCAGACCTCCTTGTCTCTAATAGAGGGTCATGGTGAGGGAGGCC
TGTCTGTGCCCAAGGTGACCTTGCCATGCCGGTGCTTTCCAGCCGGGTATCCATCCCCTGCAGCAGCAGGCTTCCTC
TACGTGGATGTTAAAGGCCCATTCAGTTCATGGAGAGCTAGCAGGTAACTAGGTTTAAGGTGCAGAGGCCCTGCTCT
CTGTCACCCTGGCTAAGCCCAGTGCGCGGGTTCCTGAGGGCTGGGACTCCCAGGGTCCGATGGGAAAGTGTAGCCTG
CAGGCCCACACCTCCCCCTGTGAATCACGCCTGGCGGGACAAGAAAGCCCAAAACACTCCAAACAATGAGTTTCCAG
TAAAATATGACAGACATGATGAGGCGGATGAGAGGAGGGACCTGGCTGGGAGTTGGCGCTAGCCTGTGGGTGATGAA
AGCCAAGGGGAATGGAAAGTGCCAGACCCGCCCCCTACCCACGAGTATAAAGCACTCGCATCCCTTTCCAATTTACC
CGAGCACC

[0151] K14短启动子序列(序列号28)如下。

[0152] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCATAAGAAGGAGACATGGTGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTG
GTGGGGCACAGAGGAAGCCGGTACTGGGCTCTGCACCCCATTCCCGCTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTC
TCCAGTGAGCACAGCCTCCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGCCTCCCAACAAAAGCATCTGTCCCTCAGCCA
AAACCCCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGGCTGGGCCAGGGTGGGGGGACCATTCTCTGCAGGGAGATTAG
GAGTGTCTGTCAGGGGCGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTTGAGAGTCCTTTGCTGGCAGAT
TTGGGGAGCCCACAGCTCAGATGTCTGTCTCAGCATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCT
TCTCTGGCTTCTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTGGGGTTGGGGGTGACAGAGGGTCCTGCTTCTCTTCTAGGAGCAGT
TGATCCCAGGAAGAGCATTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGATGCGTCAGGCAGC
CCCAGACACGATCACATTCCTCTCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCTAGGGGCTGATGGGAGGGTGGGGTGG
GGGCCGGAAGGGTTTGAGGGCTGGGACTCCCAGGGTCCGATGGGAAAGTGTAGCCTGCAGGCCCACACCTCCCCCTG
TGAATCACGCCTGGCGGGACAAGAAAGCCCAAAACACTCCAAACAATGAGTTTCCAGTAAAATATGACAGACATGAT
GAGGCGGATGAGAGGAGGGACCTGGCTGGGAGTTGGCGCTAGCCTGTGGGTGATGAAAGCCAAGGGGAATGGAAAGT
GCCAGACCCGCCCCCTACCCACGAGTATAAAGCACTCGCATCCCTTTCCAATTTACCCGAGCACCTTCTCTTCACTC
AGCCAACTGCTCGCTCG

[0153] K16P5启动子序列(序列号29)如下。

[0154] CTCCGGAGCTTCTATTCCTGATCCCTGCAGAAGAAGGAGACGGTGGTGGTGGTGGGTGGGGGTGGCAGG

GCACAGAGGAAGCCAGTACCGGGCCCTGCACCCCATTCCCACTCCCAGATCCCTCTGGACACAGCATTTTTCTCCAG
TGAGCACAGCCTTCCCTTGCCCCACAGCCAACAGCAACATGGCTCCCAACAAAAGCATCTGCCCCTCAGCCAAAACC
CCTGTTGCCTCTCTCTGGGGAAATTGTAGGACTGGGTCAGGGTGGGGGAACCATTCTCTGCAGGGAGATTAGGAGTG
TCTGTCAGGGGTGGGTGGAGCGGGGTGGGGCCCTGGCTTACTCACATCCTCGAGAGTCCTTTGCTGGCAGATTTGGG
GAGCCCACAGCACAGGTGTCTGTCTCAGTATTGTCTTCCAAGCTCCTAGGCCACAGTAGTGGGGGGCTCCCCTCTCT
GGCTTTTTCTTTGGTGACAGTCAAGGTTGGGGGTGGGGTGAGAGAGGGTCCTGCTTTTCTTCTAGGAACAGTTGATC
CCAGGAAGAGCAGTGGAGCCTCCAGCAGGGGCTGTTGGGGCCTGTCTGAGGAGATAGGACGCGTCAGGCAGCCCCAG
ACACGACCACATTCCTCCCAACATGCCTGCCGGGGTCTGTGGAGCCCAGGGGCTGAGGGGAGGGTGGGGTGGGGGCC
GGAAGGGTTTGCTTTGGGAGGTTGTCTGGGAGATTGCTGAAGTTTTGATATACACACCTCCAAAGCAGGACCAAGTG
GACTCCTAGAAATGTCCCCTGACCCTTGGGGCTTCAGGAGTCAGGGACCCTTGTGTCCACTTCAGCCTTGCCCTTGG
CACAGCCTGGCACCACTCCAGCTTCTACTCCTCCCCAGAACATCTCCTGGGCCAGTTCCACAAGGGGCTCAAACGAG
GGCACCTGAGCCAGACTTCTGCCTACACTAGGGATGTTCTGGGGGTCTGAGAGGATATCTGGGGCTGGAAGAAAAAA
AGGCCCCCCTAGGCCTGTTCCTGGATGCAGCTCCATCCACTTTGGGGCTAAGCCTGGGCTACAACAATGCCAACCAG
GCTTCTTGCCATACTCGGTTTACAAAAGCCTTTCACATACGCTGTCGCATTGGCTTCTCACAGCTGACTGCAGTAGG
CAGAGTAGATGGTATGACTCCCACTTTGCAGATGAGAACACTGAGGCTCAGAGAAGCGCCAAGCCCTGGGTCACGGG
GGCGTAAATGGCAGAGCCAGGACCCACCTGACTCCAGGCTGTTTCCTGGCCTCCATGAGGCCACCCGCCCTATGGTG
TGGTGGATGTCAGATCCTCACCGTAGGGAGGAAATTAGGGTCTGTGCCCGGGGCTGGGGAGAGCTGCCTAGATTTCT
CTTTGATGGGGGTGTTGGGGTGGGAATCACCATACACCTGACTGGCTGAGTGTATTTCAGGGATGGGACAGGCTTCT
CAGCACAGCATGGCAGGTCAGGCCTGGGAGGGCCCCCCAGACCTCCTTGTCTCTAACAGCGGGTCATGGTGAGGGAG
GCCTCTCTGTGCCCAAGGTGACCTTGCCATGCCGGTGCTCTCCAGCTGGGTATCTGTCCCCTGCAGTGGTGGGCTTC
CTCTAAGTGGATGGTAAAGGCCCATCCAGTTCATGGAGAGCTAGCAGGTCACCAGGTTTAAGGTGCAGAGGCCCTGC
TCTCTGTCACCCTGGCTGAGCCCAGTGTGCGGGTTCCTGAGGGCTGGGACTCCCGGGGCCCCATGGGAAAGTGTAGC
CTGCAGGCCCATACCTCCCCCTGTGAATCACGCCTGGCGGGACAAGAAAGCCCAAAATACCCCAAACAATGAGTTTC
CAGTAAAATATGACAGACATGATGAGGTGGAGGAGAGGAGGGACCTGGCTGGGAGTTGGCGCTAGCCTGTGGGTGAT
GAAAGCCAAGGGGAATGGAAAGTGCCAGGCCCGCCTCCTACCCATGAGTATAAAGCACTCGCATCCCTTTCCAATTT
ACCCGAGCACC

[0155] 9.实验结果3

[0156] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0157] 实施例5

[0158] 图6是对于小鼠/人培养角质形成细胞和间充质细胞,将具有AAVDJK2衣壳的AAV作为载体,进行基因导入时的基因表达的比较研究试验的结果,该AAVDJK2衣壳通过新开发的K14SCP3启动子(序列号23)、K16SCP3启动子(序列号24)、K16P5短启动子(序列号25)和已知的CAG启动子、K14启动子(序列号27)、K14短启动子(序列号28)、K16P5启动子(序列号29)表达GFPNLS。通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,准备在各启动子下表达GFPNLS的AAVDJK2载体。通过实施例2的方法准备小鼠培养角质形成细胞,通过实施例3的方法准备小鼠脂肪来源的间充质细胞。将小鼠角质形成细胞在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。在1天后、3天后更换培养基。在2天后、4天后以4个视野拍摄相位差显微镜照片和荧光照片。使用ImageJ软件,在图像上算出角质形成细胞形成菌落的区域的面积。在图像上计

数同区域内的GFPNLS阳性细胞数。算出角质形成细胞区域每单位面积的GFPNLS阳性细胞数。结果可知,对于小鼠培养角质形成细胞,K14SCP3启动子具有大于CAG启动子、K14启动子、K14短启动子的基因导入效率,此外,K16SCP3启动子、K16P5短启动子具有大于K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子的基因导入效率。

[0159] 将小鼠角质形成细胞在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。在1天后、3天后更换培养基,在4天后将角质形成细胞用与传代同样的方法进行胰蛋白酶处理,制成悬浮液,使其通过35μm过滤器后,进行旋转降速(spin down),以加入有5%FBS和2mM的EDTA的磷酸缓冲生理盐水为缓冲液准备了单一细胞悬浮液。使用FACSMelody细胞分选仪(BD,USA)和FlowJo(BD,USA)进行流式细胞术分析,采集以GFP表达阳性细胞的比例和GFP的荧光强度为变量的图(plot)。其结果可知,同样地K14SCP3启动子具有大于CAG启动子、K14启动子、K14短启动子的基因导入效率,此外,K16SCP3启动子、K16P5短启动子具有大于K14启动子、K14短启动子、K16P5启动子的基因导入效率。

[0160] 将小鼠脂肪来源的间充质细胞分别在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。在1天后、3天后更换培养基。在2天后、4天后以4个视野拍摄相位差显微镜照片和荧光照片。以4个视野拍摄相位差显微镜照片和荧光照片。计数每1张荧光拍摄照片(面积$1.99mm^{2}$)的GFPNLS阳性细胞数。可知包含新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子的角蛋白特异性启动子的基因导入效率远低于CAG启动子。

[0161] 将小鼠脂肪来源的间充质细胞在24孔板中培养,在达到50%汇合度的阶段,将培养基更换为含有1.0×10^{9}GC/孔的AAV的培养基。对于各AAV分别采用4孔,在相同条件下进行操作。在1天后、3天后更换培养基,在4天后将小鼠细胞来源的间充质细胞用与传代同样的方法进行胰蛋白酶处理,制成悬浮液,使其通过35μm过滤器后,进行旋转降速(spin down),以加入有5%FBS和2mM的EDTA的磷酸缓冲生理盐水为缓冲液准备了单一细胞悬浮液。使用FACSMelody细胞分选仪(BD,USA)和FlowJo(BD,USA)进行流式细胞术分析,采集以GFP表达阳性细胞的比例和GFP的荧光强度为变量的图。可知包含新的K14SCP3启动子、K16SCP3启动子、K16P5短启动子的角蛋白特异性启动子的基因导入效率远低于CAG启动子。总之,可知新启动子对角质形成细胞具有高基因导入效率和高特异性。

[0162] 实施例6

[0163] 图7是将在K14SCP3启动子下表达GFPNLS的AAVDJK2皮内注射至小鼠背部皮肤的基因导入试验的结果。通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在K14SCP3启动子下表达GFPNLS的AAVDJ2载体。使用剃刀对将10μl的类固醇康宁克通A(40mg/ml)皮下注射至腹部的小鼠的背部皮肤进行剃毛后,皮内注射AAVDJK2-K14SCP3-GFPNLS10^{11}GC/35μl的病毒液。在2天后采集包含注入部位在内的周围皮肤组织,用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,用30%蔗糖/磷酸缓冲生理盐水置换,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μl的厚度每200μl收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。在表皮组织上一致地确认到高GFPNLS表达,另一方面,若除去毛囊的表皮组织,则从真皮到皮下组织的GAPNLS表达细胞被抑制为低频率,可知以AAVDJK2为

衣壳、以K14SCP3为启动子的AAV作为对表皮组织具有高效率、特异性的基因导入载体发挥作用。

[0164] 10.在生物体内诱导皮肤附属器的方法的用途

[0165] 皮肤附属器由毛囊、脂腺、汗腺等构成,起到免受机械障碍的保护、保温、保湿、体温调节等作用。皮肤附属器在胎儿期、器官产生的过程中通过上皮组织与间充质组织的相互作用而形成(参照非专利文献4)。作为由皮肤附属器的缺损、障碍、功能失调带来的代表性的状态,有脱发症、皮脂缺乏症等。除了体温调节障碍、通过皮肤干燥带来瘙痒感以外,还成为整容障碍的原因。特别是,在生理上的年龄增长变化的过程中也会带来这些状态的情况较多。在临床上难以将失去的皮肤附属器再生,通常需要从身体其他部位通过植皮术、皮瓣形成术等移植现有的附属器。对此,如果能够在生物体内诱导皮肤附属器的再生、新生,则对于皮肤溃疡面那样的皮肤和皮肤附属器缺损的病症、包括脱发症、皮脂缺乏症、伴随这些的年龄增长性变化在内的各种皮肤附属器功能降低的状态,能够成为诱导皮肤附属器的再生、新生、功能提高而实现充足的皮肤附属器功能的治疗法,此外还可以用作以皮肤附属器的再生、新生、功能提高为目的的药物创新研究、生物学研究工具。

[0166] 11.在生物体内诱导皮肤附属器的方法

[0167] 本发明的在生物体内诱导皮肤附属器的方法的特征在于,包括:通过在不具有皮肤附属器诱导能力的体细胞中导入基因、投予蛋白质、投予化合物,从而赋予皮肤附属器诱导能力的工序。以下,将在基因导入中所导入的基因称为“导入基因”。在此,“导入基因”不仅包括编码蛋白质的基因,还包括微RNA等非编码RNA。

[0168] 赋予皮肤附属器诱导能力的基因至少包含以下编码蛋白质的基因。DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、cMYC基因、LEF1基因、SOX2基因、HOXC4基因、HOXC9基因、HOXC13基因、JARID2基因、HEY1基因、HEY2基因、FOXO1基因、FOXD1基因、EGR3基因、MEF2C基因、LHX2基因、PRRX1基因、PRRX2基因、CREB3基因、ETV1基因、TBX6基因、MSX2基因、PRDM1基因、SHH基因。

[0169] 赋予皮肤附属器诱导能力的蛋白质至少包含以下基因所编码的蛋白质。DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、cMYC基因、LEF1基因、SOX2基因、HOXC4基因、HOXC9基因、HOXC13基因、JARID2基因、HEY1基因、HEY2基因、FOXO1基因、FOXD1基因、EGR3基因、MEF2C基因、LHX2基因、PRRX1基因、PRRX2基因、CREB3基因、ETV1基因、TBX6基因、MSX2基因、PRDM1基因、SHH基因。

[0170] 关于本发明中使用的任一个基因,其碱基序列均为公知(表1)。另外,在本说明书中,NCBI是美国国家生物工学信息中心(National Center for Biotechnology Information)的简称,表1的登录号也登记在NCBI提供的数据库中。

[0171]

基因	人	小鼠	基因	人	小鼠	基因	人	小鼠
	参考序列	参考序列		参考序列	参考序列		参考序列	参考序列
DNP63A	NM_001114980.2	NM_011641.2	MEF2C	NM_001131005.2	NM_001170537.1	LHX2	NM_004789.4	NM_001290646.1
GRHL2	NM_001330593.2	NM_026496.4		NM_001193347.1	NM_001347564.1			NM_010710.4
	NM_024915.4			NM_001193348.1	NM_001347566.1	PRRX1	NM_006902.5	NM_001025570.1
TFAP2A	NM_001032280.3	NM_001122948.2		NM_001193349.3	NM_001347567.1		NM_022716.4	NM_011127.2
	NM_001042425.3	NM_001301674.2		NM_001193350.2	NM_001347568.1			NM_175686.3
	NM_001372066.1	NM_011547.5		NM_001308002.3	NM_001347569.1	ETV1	NM_001163147.2	NM_001163154.1
cMYC	NM_001354870.1	NM_001177352.1		NM_001363581.2	NM_001347571.1		NM_001163148.2	NM_001347379.1
	NM_002467.6	NM_001177353.1		NM_001364329.2	NM_001347572.1		NM_001163149.2	NM_007960.5
		NM_001177354.1		NM_001364330.2	NM_001347573.1		NM_001163150.2	
		NM_010849.4		NM_001364331.2	NM_001347574.1		NM_001163151.2	
LEF1	NM_001130713.3	NM_001276402.1		NM_001364332.2	NM_001347575.1		NM_001163152.2	
	NM_001130714.3	NM_001276403.1		NM_001364333.2	NM_001347576.1		NM_001370555.1	
	NM_001166119.2	NM_001379059.1		NM_001364334.2	NM_001347577.1		NM_001370556.1	
	NM_016269.5	NM_001379060.1		NM_001364335.2	NM_001347578.1		NM_004956.5	
		NM_001379061.1		NM_001364336.2	NM_001347579.1	cMYC	NM_001354870.1	NM_001177352.1
		NM_001379062.1		NM_001364337.2	NM_001347580.1		NM_002467.6	NM_001177353.1
		NM_010703.4		NM_001364338.2	NM_001347581.1			NM_001177354.1
SOX2	NM_003106.4	NM_011443.4		NM_001364339.2	NM_025282.3			NM_010849.4
HOXA9	NM_152739.4	NM_001277238.1		NM_001364340.2		TBX6	NM_004608.4	NM_011538.2
		NM_010456.3		NM_001364341.2		MSX2	NM_001363626.2	NM_013601.2
HOXC4	NM_014620.6	NM_013553.2		NM_001364342.2			NM_002449.5	
	NM_153633.3			NM_001364343.2		SHH	NM_000193.4	NM_009170.3
HOXC9	NM_006897.3	NM_008272.3		NM_001364344.2			NM_001310462.2	
HOXC13	NM_017410.3	NM_010464.2		NM_001364345.2		PRDM1	NM_001198.4	NM_007548.4
JARID2	NM_001267040.1	NM_001205043.1		NM_001364346.2			NM_182907.3	
	NM_004973.4	NM_001205044.1		NM_001364347.2				
		NM_001360281.1		NM_001364348.2				
		NM_021878.3		NM_001364349.2				
HEY1	NM_001040708.2	NM_010423.2		NM_001364350.2				
	NM_001282851.2			NM_001364352.2				
	NM_012258.4			NM_001364353.2				
HEY2	NM_012259.3	NM_013904.1		NM_001364354.2				
FOXO1	NM_002015.4	NM_019739.3		NM_001364355.2				
FOXD1	NM_004472.3	NM_008242.2		NM_001364356.2				
EGR3	NM_001199880.2	NM_001289925.2		NM_001364357.2				
	NM_001199881.2	NM_001289927.1		NM_002397.5				
	NM_004430.3	NM_018781.4	CREB3	NM_006368.5	NM_013497.4			

[0172] 这些基因的大部分来源在包括人在内的哺乳动物中共同存在,可以使用任意的哺乳动物来源的基因,优选根据导入的体细胞的来源适当选择。例如,在以人为对象的情况下,上述导入基因、蛋白质优选为人来源。另外,上述导入基因、蛋白质除了野生型基因、蛋白质以外,也可以是氨基酸序列中的数个(例如为1～10个,优选为1～6个,进一步优选为1

～4个,更优选为1～3个,特别优选为1或2个)氨基酸被置换、缺失和/或插入、并且编码具有与野生型基因产物同等功能的变异基因产物的变异基因。另外,也可以使用以编码与各个基因所编码的氨基酸同样的氨基酸的方式变更/优化密码子而得到的序列。

[0173] 在本发明中,上述导入基因可以基于公知的序列信息按照常规方法制备。例如,从哺乳动物来源的细胞中提取RNA,按照常规方法进行克隆,由此可以制备目标基因的cDNA。另外,也可以作为人工基因合成。合成人工基因时,也可以根据导入的体细胞的来源动物进行密码子的优化。

[0174] 在本发明中,作为要被诱导为具有皮肤附属器诱导能力的细胞的“体细胞”,对其种类没有特别限制,可包括来源于任何组织或部位的体细胞。特别是,作为本发明中可被期待作为诱导起源的体细胞,例如可例示来源于皮肤、皮下脂肪、肌肉、筋膜、血细胞等组织的体细胞,更具体而言,可例示皮肤成纤维细胞、皮下脂肪组织来源的间充质细胞(皮下脂肪细胞)、脂肪细胞、肌肉细胞、筋膜细胞、组织单核细胞、组织巨噬细胞。

[0175] 上述导入基因向体细胞的导入可以通过向动物细胞的转染中通常使用的方法进行。具体而言,作为将上述导入基因导入体细胞的方法,可例示使用载体的方法、包含将脂质纳米粒子等适当的递送法并用的基于mRNA的方法等。其中,从导入效率的观点出发,优选使用载体的方法。在使用载体将上述导入基因导入体细胞的情况下,作为载体,可以使用病毒载体、非病毒载体(包括质粒(DNA)载体)、人工病毒等。从基因导入效率的观点出发,优选使用腺相关病毒和逆转录病毒、慢病毒等病毒载体。从安全性的观点出发,优选使用基于mRNA的方法。需要说明的是,当上述导入基因为多个时,可以分别整合到不同的载体、mRNA中,也可以在1个载体、mRNA中整合2种以上的导入基因。

[0176] 关于上述蛋白质向体细胞的投予,可以根据蛋白质的性质通过蛋白质本身的投予来进行,此外也可以通过基于细胞穿透肽的蛋白质转染法来进行。

[0177] 在本发明中,通过向存在于生物体内的体细胞导入基因、投予蛋白质、投予化合物,能够从生物体内的体细胞诱导具有皮肤附属器诱导能力的细胞,赋予皮肤附属器的再生、新生。作为导入基因、蛋白质,可以是在具有皮肤附属器诱导能力的上皮细胞中表达相对强的基因、蛋白质,也可以是在具有皮肤附属器诱导能力的间充质细胞中表达相对强的基因、蛋白质,但也可以将双方基因、蛋白质同时导入、投予。

[0178] 本发明的在生物体内诱导皮肤附属器的方法的特征在于,包括:通过在不具有皮肤附属器诱导能力的体细胞中导入基因、投予蛋白质、投予化合物,从而赋予皮肤附属器诱导能力的工序。本发明不仅用于皮肤溃疡面那样的皮肤和皮肤附属器自身缺损的病症,而且对于包括脱发症、皮脂缺乏症、伴随这些的年龄增长性变化在内的各种皮肤附属器功能降低的状态使用,能够在数量上、功能上对皮肤附属器功能降低的状态赋予改善,但在以不具有遗传异常的野生型小鼠为代表的实验动物中,难以制作脱毛、皮脂缺乏等皮肤附属器功能定量降低的状态,难以准确地评价基于治疗性干预的改善程度。

[0179] 因此,在本发明的通过在不具有皮肤附属器诱导能力的体细胞中导入基因、投予蛋白质、投予化合物从而赋予皮肤附属器诱导能力的效果的试验中,采用了在通过腔室与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上新诱导带有皮肤附属器的皮肤组织的试验。如非专利文献2中确认的那样,在与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上,生理上连皮肤/表皮组织都无法再生,因此,明确了所诱导的皮肤所伴随的皮肤附属器是由本发明的效果带来的。

[0180] 12.实验结果4

[0181] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0182] 实施例7

[0183] 图8是在小鼠背部筋膜上安装腔室而制作的、与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上,使用AAV进行基因导入而诱导带有皮肤附属器的皮肤的试验的结果。通过在4-5周龄的C57BL/6J Jcl小鼠的背部制作皮肤溃疡,将腔室缝合固定于深筋膜后,将周围皮肤与腔室缝合,从而制作与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面。在通过腔室与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上,生理上皮肤/表皮结构不会再生,溃疡面不会治愈(参照非专利文献2)。基因导入中使用的AAV载体分别用实施例2中记载的浓缩AAV制作法来制作。在安装腔室后,将AAV载体接种到腔室内从而对溃疡面导入基因。每个载体的衣壳、导入基因、滴度分别设为AAVDJ1-DNP63A1×10^{12}GC(基因拷贝数)、AAVDJ1-GRHL2 1×10^{11}GC、AAVDJ1-TFAP2A5×10^{11}GC、AAVDJ1-cMYC 5×10^{11}GC、AAVDJ1-LEF12×10^{11}GC。在安装腔室、初次投予AAV后第9天,将AAVDJ-FOXD1 2.5×10^{11}GC、AAVJD-PRDM1 2.5×10^{11}GC、AAVDJ1-LEF1 1×10^{11}GC、AAVDJ1-SHH 5×10^{10}GC的AAV载体接种到腔室内从而对溃疡面导入基因。在溃疡面,从安装腔室、初次投予AAV后第21天开始观察到表皮组织被诱导,在第28天的时间点清楚地观察到在溃疡面的一部分形成有表皮组织,确认到毛发从一部分萌出。使用立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)拍摄溃疡面后,采集包含溃疡面的组织,用4%多聚甲醛固定后包埋在OCT复合物中,制作冷冻切片。对于切片,按照常规方法使用细胞角蛋白14抗体(ab181595,Abcam)、二次抗体进行免疫染色后,使用DAPI Fluoromount-G(Southern Biotech)进行核染色、封入。使用荧光玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)、共聚焦显微镜(Zeiss LSM900)进行荧光图像的读取,然后通过封入剂的缓慢的洗涤来解除封入,对该切片进行苏木精伊红染色后,重新封入,然后使用玻片扫描仪读取组织所见。组织所见上,确认到在溃疡面上新诱导的、与周围独立的表皮部分存在毛囊结构、脂腺结构等皮肤附属器。由于在生理上连表皮结构都无法再生的溃疡面上确认到带有皮肤附属器的皮肤,因此可知通过使用AAV的基因导入能够诱导带有皮肤附属器的皮肤。

[0184] 实施例8

[0185] 图9为在小鼠背部筋膜上安装腔室而制作的、与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面上,使用AAV进行基因导入而诱导带有皮肤附属器的皮肤的试验的结果。除了腔室安装和基因导入的时机、用于基因导入的载体不同以外,利用与实施例7同样的方法进行试验。在安装腔室的次日,将AAV载体接种到腔室内从而对溃疡面导入基因。每个载体的衣壳、导入基因、时机分别设为AVDJ-DNP63A1×10^{12}GC(基因拷贝数)、AAVDJ-GRHL2 1×10^{11}GC、AAVDJ-TFAP2A5×10^{11}GC、AAVDJ-cMYC 5×10^{11}GC、AAVDJ-LEF1 2×10^{11}GC。在初次投予AAV后第9天,将AAVDJ-FOXD1 2.5×10^{11}GC、AAVDJ-PRDM1 2.5×10^{11}GC、AAVDJK2-LEF1 2.5×10^{11}GC、AAVDJ1-SHH 1×10^{11}GC的AAV载体接种到腔室内从而对溃疡面导入基因。在溃疡面,从安装腔室、初次投予AAV后第21天开始观察到表皮组织被诱导,在第28天的时间点清楚地观察到在溃疡面的一部分形成有表皮组织,在第30天的时间点确认到黑色的毛发从一部分萌出。可知通过使用AAV的基因导入,能够在与周围独立的表皮部分诱导伴有黑色毛发的生长的皮肤组织。

[0186] 由实施例7和8可理解,通过将DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、c-MYC基因、

LEF1基因这5个基因、接着将FOXD1基因、PRDM1基因、LEF1基因、SHH基因导入与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面,能够在生物体内诱导带有皮肤附属器的皮肤。如非专利文献2中确认的那样,在与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面,生理上连皮肤、表皮结构都无法再生,因此可知与所诱导的皮肤相伴随的皮肤附属器是由本发明的效果带来的。

[0187] 根据专利文献1(国际公开第2022/244502号),示出了具有皮肤附属器诱导能力的细胞、特别是上皮细胞可以通过对小鼠成体脂肪来源的原代培养间充质细胞导入DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、c-MYC基因和LEF1基因,或者DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因和LEF1基因而诱导,且示出了具有皮肤附属器诱导能力的细胞、特别是间充质细胞可以通过对小鼠成体脂肪来源的原代培养间充质细胞导入表2所示的1或2组中的基因而诱导。通过将这些具有皮肤附属器诱导能力的诱导上皮细胞和具有皮肤附属器诱导能力的诱导间充质细胞混合移植到安装于免疫缺陷动物背部的硅腔室内,能够得到具有皮肤附属器的皮肤组织的重构、再生;并且,由实施例7、8的结果启示:通过对与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面导入DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、c-MYC基因、LEF1基因这5个基因,或者DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、LEF1基因这4个基因,接着导入表中记载的具有毛囊诱导能力的间充质细胞的基因,能够在生物体内诱导带有皮肤附属器的皮肤。

[0188] [表2]

[0189]

第1诱导间充质细胞	第2诱导间充质细胞
SHH LEF1	ETV1 FOXD1 PRDM1
SHH	ETV1 FOXD1 PRDM1
SHH LEF1	ETV1 FOXD1
SHH LEF1	FOXD1 PRDM1
SHH LEF1	ETV1 PRDM1
SHH ETV1 FOXD1 PRDM1	
SHH LEF1 ETV1 FOXD1 PRDM1	
SHH LEF1	
SHH LEF1	PRDM1
SHH	FOXD1 PRDM1
SHH	PRDM1
SHH	FOXD1
SHH	
ETV1 FOXD1 PRDM1	

[0190] 在实施例7和8中,为了明确示出被诱导的皮肤附属器是由本发明的效果带来的,在生理上连周围皮肤/表皮组织都无法确认再生的与周围皮肤隔离的皮肤溃疡面,诱导了皮肤和皮肤附属器的再生。示出了为了诱导具有皮肤附属器诱导能力的细胞、特别是上皮细胞,导入了DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、c-MYC基因和LEF1基因,但在针对包括脱发症、皮脂缺乏症、伴随这些的年龄增长性变化在内的各种皮肤附属器功能降低的状态使用本发明时,由于在治疗对象部位存在皮肤/表皮组织,因此不需要DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因、c-MYC基因和LEF1基因、或者DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因和LEF1基因的全部。特别启示了如非专利文献2中确认的那样,由于DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A

基因和c-MYC基因发挥从间充质细胞诱导表皮细胞的功能,因此在针对治疗对象部位存在皮肤/表皮组织的包括脱发症、皮脂缺乏症、伴随这些的年龄增长性变化在内的各种皮肤附属器功能降低的状态使用本发明的情况下,通过单独导入LEF1基因、或者除了LEF1基因以外还导入DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因和c-MYC基因中的一部分,能够从原本存在于治疗对象部位的皮肤/表皮组织诱导具有皮肤附属器诱导能力的上皮细胞。

[0191] 即,启示了在针对治疗对象部位存在皮肤/表皮组织的包括脱发症、皮脂缺乏症、伴随这些的年龄增长性变化在内的各种皮肤附属器功能降低的状态使用本发明时,通过单独导入LEF1基因、或者除了导入LEF1基因以外还导入DNP63A基因、GRHL2基因、TFAP2A基因和c-MYC基因中的一部分、以及表2所示的1或2组中的基因,能够在数量上、功能上对皮肤附属器功能降低的状态赋予改善。

[0192] 13.提高生物体内基因导入效率的方法的用途

[0193] 本发明的提高生物体内基因导入效率的方法可以在使用基因导入的疾病治疗中用作治疗法,此外还可以用作基因治疗法的研究开发工具。另外,可以用作以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。作为向生物体内的基因导入法,使用了AAV、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、仙台病毒载体等病毒载体、质粒DNA、微环DNA等裸DNA、以及最近的mRNA(也包括以脂质纳米粒子(LNP)为载体的物质)等各种方法,但大多难以以高效率实现基因导入。本发明的提高生物体内基因导入效率的方法是在生物体内基因导入时实现超过以往方法的基因导入效率的方法,因此不仅包括对实施例中列举的皮肤、皮肤溃疡、四肢构成组织、肌肉组织等的适用,还包括对中枢神经、眼神经等脑神经、以眼球、视网膜等为代表的感觉器官、腹腔内脏器、胸腔内脏器等的适用。可以用作针对全身的所有脏器/组织/细胞使用基因导入的基因治疗、基因治疗法的研究开发工具、以基于基因导入的治疗法开发为目的以外的药物创新研究、生物学研究工具。

[0194] 14.提高生物体内基因导入效率的方法

[0195] 本发明的提高生物体内基因导入效率的方法提供如下方法:通过在生物体内导入基因之前、同时或导入后早期全身或局部地并用类固醇,从而实现高基因导入效率、高基因表达。全身投予通过经静脉注射、皮内注射、皮下注射、肌肉内注射、经口投予等一般在类固醇制剂的全身投予中使用的方法来进行。局部投予可通过皮内注射、皮下注射、肌肉内注射、关节内注射、对皮肤的涂布、管腔内散布、滴眼、滴耳、滴鼻等一般在类固醇制剂的局部投予中使用的方法来进行,此外还可以包括:对进行基因导入的局部投予、例如颅内、脑实质时对脑实质的投予(除了注入以外,还包括手术中的局部散布、内窥镜辅助下投予)等作为以往的使用类固醇制剂的治疗法并不是通常采用的、对目标部位的直接投予法。投予的类固醇制剂可包括以如下物质为代表的具有肾上腺皮质激素、类固醇激素作用的所有制剂:甲泼尼龙、甲泼尼龙琥珀酸钠、醋酸甲泼尼龙、氢化可的松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、丁酸氢化可的松、丁酸丙酸氢化可的松、泼尼松龙、醋酸泼尼松龙、泼尼松龙磷酸钠、泼尼松龙琥珀酸钠、泼尼松龙醋酸戊酸酯、氯倍他松丁酸酯、氟米松、曲安西龙、曲安奈德、阿氯米松丙酸酯、地塞米松、地塞米松磷酸钠、地塞米松间磺基苯甲酸钠、地塞米松棕榈酸酯、地塞米松丙酸酯、地塞米松戊酸酯、地塞米松培酯(dexamethasone cipecilate)、倍他米松、倍他米松磷酸钠、倍他米松戊酸酯、倍他米松二丙酸酯、倍他米松丁酸丙酸酯、醋酸氟轻松(fluocinolone acetonide)、双氟可龙戊酸酯、氟氢缩松

(fludroxycortide)、醋酸氟轻松(fluocinonide)、布地奈德、双氟拉松乙酸酯、安西奈德、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、丙酸倍氯米松、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松、二氟泼尼酯、丙酸氯倍他索、醋酸可的松、环索奈德、丙酸地泼罗酮、醋酸氟氢可的松、卤倍他索丙酸酯。投予类固醇制剂的方法(包括用法、用量、次数、时间、期间等)是根据投予的制剂、以基因导入为目的的脏器/组织/细胞、以基因导入为目的的作用等而分别优化的事项。本发明包括通过在生物体内基因中并用类固醇来提高基因导入效率、基因表达的所有投予方法。

[0196] 15.实验结果5

[0197] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0198] 实施例9

[0199] 图10是关于类固醇对于针对皮肤溃疡面的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验的图解,图11是该试验中投予AAV后第7天的溃疡面的可见光和荧光观察下的立体显微镜所见,图12是该试验中投予AAV后第7天的组织学所见。为了调查类固醇投予对于利用AAV向皮肤溃疡面导入基因时的基因导入效率的影响,在小鼠背部制作皮肤溃疡面,制作安装有硅腔室的模型动物。硅腔室通过Du Z,Shen Q,Mito D,Kato M,Okazaki M,Kurita M.Optimized3D-printed template design for production of silicone skin chambers.J Dermatol Sci.2022Jan;105(1):55-57.中记载的方法制作、安装。在安装硅腔室时,制作了类固醇未投予组、将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、将10μl的康宁克通投予腔室内的局部投予组。AAV载体使用了向载体家(Vector builder)公司定制、购买的在CAG启动子下表达GFP的AAVDJ病毒载体。在安装腔室、投予类固醇的次日,将AAVDJ-CAG-GFP病毒10^{11}GC/100μl接种到各个动物的腔室内。在投予AAV后第7天,用荧光立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)观察皮肤溃疡面,结果在远端投予组中,确认到与类固醇未投予组、局部投予组相比更强的GFP表达。接着,采集溃疡面的组织,用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,用30%蔗糖/磷酸缓冲生理盐水置换,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。对于各个切片准备相邻的切片,进行苏木精伊红染色。使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。组织所见上,在远端投予组中确认到大量的GFP阳性细胞。为了定量地比较研究各组的组织所见,对溃疡中央部分的放大图像上的GFP阳性细胞数进行计数。此时,以相邻的苏木精伊红染色所见为参照,分类为表层(皮下脂肪组织上的筋膜上)、脂肪层(皮下脂肪组织)、肌层(斜方肌等肌肉),对各个区域的GFP阳性细胞数进行计数。对于各个实验动物/组织,进行5个切片的计数,求出平均值。使用t-test探讨各组3只动物的平均值的差异。关于全部区域的GFP阳性细胞数,在远端投予组中,确认到与无类固醇时相比显著多的GFP阳性细胞。特别是限于深部的组织(脂肪层+肌层)时,在远端投予组中,确认到与无类固醇组、局部投予组相比显著多的GFP阳性细胞。

[0200] 实施例10

[0201] 图13是关于不同浓度的类固醇对于针对皮肤溃疡面的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果。制作了类固醇未投予组、将1μl、10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、将1μl、10μl的康宁克通投予腔室内的局部投予组,除此之外,用与实施例9同样的方法进行直至组织所见观察的试验。组织所见上,在远端投

予组中在10μl时确认到大量GFP阳性细胞,而在局部投予组中在1μl时确认到大量GFP阳性细胞。特别是在皮肤溃疡面那样的存在炎症的局部,由于类固醇具有抗炎作用,因此设想到细胞数本身会根据作用浓度而变化,为了提高基因导入效率,需要根据远端、局部等投予方法来研究最佳的投予量。

[0202] 实施例11

[0203] 图14是关于类固醇投予对于针对小鼠背部皮肤的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果。制作了类固醇未投予组、将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组。作为AAV载体,准备以AAVDJK2为衣壳、在K14SCP3启动子下表达GFPNLS的AAV。对远端投予组投予类固醇1天后,对各组小鼠的背部皮肤进行剃毛,然后皮内注射了AAVDJK2-K14SCP3-GFPNLS10^{11}GC/35μl。在注入AAV后第2天,一边用荧光立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)观察注入部位,一边采集包含周围皮肤在内的组织,用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,用30%蔗糖/磷酸缓冲生理盐水置换,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。准备与各个切片相邻的切片,进行苏木精伊红染色。使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。组织所见上,在类固醇远端投予组中,高效率、连续地以表皮组织为中心确认到GFPNLS阳性细胞,而在类固醇未投予组中,GFPNLS细胞呈低频率零散分布。可知通过类固醇的作用,基于AAV的向皮肤的基因导入效率提高。

[0204] 实施例12

[0205] 图15是关于不同浓度的类固醇对于针对皮肤的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果。制作了将10μl、0.1μl、0.01μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)分别注入腹部皮下的远端投予组,除此之外,用与实施例11同样的方法进行试验。组织所见上,在将10μl、0.1μl的康宁克通A远端投予的动物中,以表皮组织为中心确认到GFPNLS阳性细胞,而将0.01μl的康宁克通A远端投予的动物的所见中,与无类固醇的动物的所见没有确认到大的差异,可知如果类固醇的量减少(0.01μl),则由类固醇带来的基因导入效率提高效果减少。

[0206] 实施例13

[0207] 图16显示出在小鼠中进行上肢切断后,以避免小鼠自身对残端部的侵袭、尽可能地保持局部的安静为目的,在切断之前将左上肢向背侧移位的手术操作。按照左段从上至下、中段从上至下、右段从上至下的顺序示出各阶段的手术方法。在利用异氟烷实施吸入麻醉后,将牵引线挂在左手部,使上肢向侧方屈曲外展,确保手术姿势。在腋窝前面纵向切开皮肤,用双极电刀切离肩关节前侧的肌肉体,使肩关节的关节囊露出。从关节囊前侧进入关节内,沿上下方向推进关节囊的切离,抓住肩胛骨残端。一边牵引肩胛骨一边剥离周围的肌群并切除肩胛骨。在将连接肱骨和胸壁的大圆肌等肌肉体切离后,向上肢根部分的背侧皮肤延长皮肤切口。将体位变换为右侧俯卧位,将连接肱骨和胸壁的肌群切离而使上肢游离。在一系列组织切离过程中,保留臂神经丛和向上肢的主干动静脉。使游离的上肢向背侧移位,一边将肩关节周围的三角肌的一部分等腹侧肌肉体固定于胸壁一边进行皮肤缝合。在皮肤缝合时,对剩余皮肤进行适当修整。通常4-6针即可封闭创部。通过一系列的操作,左上肢在保留主要的神经血管的状态下移位到背侧。

[0208] 在本实施例中,对于小鼠制作了上肢切断模型动物,可以通过在将非人哺乳动物的上肢移位之后在上臂/前臂/手/手指平面对上肢进行切断,或者在将非人哺乳动物的上肢移位之后在前臂平面对上肢进行切断,从而制作上肢切断模型动物。上肢切断模型动物优选在保持上肢主干神经、动静脉的状态下进行。上肢移位可以在肩关节进行,也可以伴随肩胛骨的切除。通过将待测物质应用于这样的上肢切断模型动物并研究对切断部位的影响,能够实现医药物质的筛选方法。特别是医药物质可以是以基因导入为目的的基因导入载体,也可以是用于切断的组织的再生的物质。作为非人哺乳动物,例如包括兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠或小鼠。

[0209] 实施例14

[0210] 图17是关于类固醇投予对于针对通过实施例13的手术方法将左上肢向背侧方移动后在前臂部分切断的小鼠前臂切断残端的基于AAV、逆转录病毒的基因导入效率产生的影响的试验的结果。采集前臂的组织后,用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,或者一并将相邻切片用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。前臂切断组织在组织所见上,在中央部分在骨、周围存在肌肉,皮肤和皮下脂肪覆盖其外侧。在基于AAV的基因导入中,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,准备具有AAVDJ衣壳且在CAG启动子下表达GFPNLS的AAV。准备了类固醇未投予组、将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组、将5μl的康宁克通A(40mg/ml)注入切断端部的局部投予组。在将左上肢向背侧移位的次日,在前臂上对上肢进行切断,在其1小时后,根据设定投予类固醇。次日,对于各动物每2小时隔开间隔地各注入3μl的AAVDJ-CAG-GFPNLS10^{11}GC/9μl,分3次注入到切断局部。AAV注入1周后回收组织。荧光组织观察上,通过类固醇的局部投予、远端投予,切断部组织的GFPNLS阳性细胞数均增加。可知通过类固醇的使用,在使用AAV进行基因导入时,在构成四肢切断部的皮下、筋膜、肌肉、骨膜等广泛的组织/细胞中确认到显著的基因导入效率的提高。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码GFPNLS的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液(参照非专利文献2)。对于每1只动物,使用通过聚乙二醇浓缩将2ml的逆转录病毒液浓缩至100μl的病毒浓缩液。在将左上肢向背侧移位的次日,在前臂上对上肢进行切断,在其1小时后初次注射病毒液,并且在远端投予组中将康宁克通A(40mg/ml)10μl注入皮下腹部,在局部投予组中将康宁克通A(40mg/ml)5μl混合注入到病毒液中。对于每1只动物,以3小时间隔经2天分成10次注射逆转录病毒。在注入病毒液1周后回收组织。荧光组织观察上,通过类固醇的局部投予、远端投予,切断部组织的GFPNLS阳性细胞数均增加。可知通过类固醇的使用,在使用逆转录病毒导入基因时,在构成四肢切断部的组织/细胞中确认到基因导入效率的提高。

[0211] 实施例15

[0212] 图18是关于类固醇投予对于针对小鼠大腿前面肌肉的基于mRNA的基因导入效率产生的影响的试验结果。试验中使用的mRNA使用了委托Arcalis公司制造的eGFP mRNA。关于Lipofectamine 2000转染试剂,按照附带说明书中记载的方法,使用1μg的mRNA、1.2μl的

lipofectamine、共计100μl的Opti-MEM培养基制作复合体,将其中的50μl作为每1个肌肉体的mRNA转染用的复合体试剂。在试验中使用裸鼠(BALB/cAJcl-nu/nu)。准备了mRNA转染前的类固醇未投予组、前一天将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组。在即将注入之前准备mRNA转染用复合体试剂,在5-15分钟后注入大腿前面的肌肉体。在注入12小时后的时间点使动物安乐死后,切除肌肉体,用荧光立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)观察肌肉体表面,结果在远端投予组中存在确认到强绿色荧光的部位。用4％多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),以与肌纤维方向正交的切断面从冷冻组织以10μm的厚度收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。进行相邻切片的苏木精伊红染色。对于所制作的组织切片,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取,结果在远端投予组中在肌肉体的一部分确认到强的GFP信号,观察到信号以离心性扩散,而在类固醇未投予组中,仅观察到弱的信号。可知在利用mRNA向生物体内组织的基因导入中,通过使用类固醇,基因导入效率也提高。

[0213] 实施例16

[0214] 图19是关于类固醇投予对于针对体外培养细胞的基于AAV的基因导入效率产生的影响的试验结果。使用293AAV细胞(Cell Biolabs公司)作为培养细胞。AAV载体使用了向载体家(Vector builder)公司定制、购买的在CAG启动子下表达GFP的AAVDJ病毒载体。293AAV细胞是按照常规方法在加入有10％牛新生儿血清的DMEM培养基中进行培养。24孔板的每1孔接种1.5×10^5细胞。在第1天,培养基更换为包含1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml、1mg/ml的康宁克通A的培养基。在第2天,将培养基的一半量更换为包含10^{10}GC/孔的AAV的培养基。在第3天,将全部培养基更换为不含类固醇、AAV的培养基。在第6天,用荧光显微镜(IX73,奥林巴斯)拍摄相位差、荧光观察下的照片。在绿色荧光观察图像中观察到GFP阳性细胞,在红色荧光观察图像中观察到非特异性的荧光表达。在1、10μg/ml类固醇的存在下,确认到与无类固醇相比更高的GFP阳性细胞,而在100μg/ml、1mg/ml类固醇存在下,由于对细胞的类固醇作用,细胞数、阳性细胞数减少。可知在适当浓度的类固醇的存在下,体外培养细胞中的基于AAV的基因导入效率提高。

[0215] 实施例17

[0216] 图20是关于类固醇投予对于皮下注射的荧光二氧化硅粒子的动态产生的影响的试验结果。制作了类固醇未投予组、将10μl的作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml)注入腹部皮下的远端投予组。在类固醇投予的次日,对小鼠背部进行较大面积剃毛,皮下注射具有与AAV相同程度的大小的发出红色荧光的荧光二氧化硅粒子(sicastar(注册商标)-redF,无修饰(plain),30nm,25mg/ml)30μl。在注入后,立即、1、3、6、9、12、18、直至24小时后,使用荧光立体显微镜(Axio Zoom.V16,Zeiss)进行局部观察,分析类固醇对荧光二氧化硅粒子的局部滞留产生的影响。根据曝光时间(30msec)经时拍摄荧光显微镜图像,比较图像上的红色荧光信号,结果可知,在类固醇未投予组中,从早期就确认到红色荧光信号的减弱,而在远端投予组中,红色荧光信号相对较强地残留。另外,对在经过24小时的时间点以更长的曝光时间进行拍摄的图像进行比较研究,可知在无类固醇的动物中,弱荧光信号在更宽的范围内扩散。为了在组织内更详细评价荧光二氧化硅粒子的扩散状态,在经过24小时的时间点采集皮肤组织,迅速地将组织埋入OCT复合物中并冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,

Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094)从冷冻组织以10m的厚度收集切片,用磷酸缓冲生理盐水洗涤后,用DAPI进行核染色。进行相邻切片的苏木精伊红染色。使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)作为图像文件读取。组织所见上也是。在远端投予组中,在更有限的区域中观察到更强的荧光信号,而在无类固醇的动物中,弱荧光信号在更宽的范围内扩散。可知在注射了类固醇的动物中,与无类固醇的动物相比,二氧化硅粒子向周围组织的扩散得到抑制,更明显地局部滞留。

[0217] 在本发明中,通过在生物体内导入基因之前、同时或导入后早期全身或局部地并用类固醇,能够实现高基因导入效率、高基因表达。在使用病毒载体的基因治疗中,为了抑制针对病毒载体的现有的免疫反应、伴随反复治疗而产生的免疫反应,且能够进行高效的基因导入,有时使用了类固醇(参照Yanda MK,Tomar V,Cebotaru CV,Guggino WB,Cebotaru L.Short-Term Steroid Treatment of Rhesus Macaque Increases Transduction.Hum Gene Ther.2022Feb;33(3-4):131-147.)。如实施例9、实施例10、实施例11、实施例12、实施例14、实施例15所示,本发明的效果在初次基因导入时已得到证实,因此没有将基于反复治疗的免疫反应的抑制作为主要的作用机理。另外,在实验动物饲养环境中,AAV非特异性地感染实验动物,对AAV具有已存在的免疫反应的可能性低。即,本发明仅是已指出的现有免疫反应的抑制所带来的效果的可能性低。进而,在实施例14中的基于逆转录病毒载体、实施例15中的基于mRNA的基因导入试验中,没有通过外源性的逆转录病毒、外源性的mRNA投予而诱发现有的免疫反应的可能性,可知本发明中的类固醇投予与已知的类固醇使用方法不同,新颖性高。

[0218] 根据实施例16,在培养细胞中也可确认到通过类固醇的作用而提高基因导入的效率、实现高基因表达。即,启示了该效果是由对全身性免疫系统的影响等以外的、细胞水平上的类固醇作用带来的。有可能抑制了伴随外源性的基因导入而诱导的细胞内源性cGAS-STING通路。

[0219] 根据实施例17可知,通过类固醇的投予,皮下投予的荧光二氧化硅粒子的局部滞留倾向提高,注入局部的清除率降低。从改善炎症性浮肿的情况也可知,类固醇对末梢组织内的体液循环产生影响,因此启示:通过增加对末梢投予的基因导入载体的局部滞留时间、降低局部清除率、增加作用机会、增加作用时间等,提高基因导入效率。

[0220] 类固醇是在细胞水平、个体水平上带来多方面的作用的生理活性物质,因此通过作为类固醇的特征性作用的个体水平上的抗炎、抗免疫作用,抑制使基因导入载体的作用减弱的生物体反应、提高生物体内的基因导入效率,在本发明中,启示了通过在生物体内导入基因之前、同时或导入后早期全身或局部地并用类固醇而能够实现高基因导入效率、高基因表达的机理涉及多方面。

[0221] 16.四肢切断部组织的再生方法的用途

[0222] 在哺乳类中,在被切断的四肢残端发生创伤治愈。即,骨残端、肌肉残端、皮肤/皮下组织通过一期创伤治愈或二期创伤治愈来发生瘢痕治愈,不发生功能性的组织再生。相对于此,在本发明中,在哺乳类的四肢切断部中,通过加入基因导入、蛋白质的投予、化合物的投予、细胞治疗等干预从而产生功能性的组织再生,因此能够提供与医疗(治疗法)、生物学、组织再生学技术或将来的技术开发相关的模型。哺乳类包括例如人、猴、大鼠或小鼠。特别是作为研究开发的模型,优选为小鼠。

[0223] 在本发明中,“在哺乳类中四肢切断部的组织再生”是指在切断四肢时的骨残端切断面、肌肉残端切断面、皮肤/皮下组织切断面上再生了通过生理上产生的一期创伤治愈、二期创伤治愈无法再生的组织。是指超出生理上范围的以脂肪组织的新生/增生、骨组织的新生/增生、软骨组织的新生/增生、肌肉组织的新生/增生、四肢样结构物的再生等为代表的四肢末梢组织中所含的各种组织的新生/增生/再生。

[0224] 本发明中的“用于开发在哺乳类中使四肢切断部的组织再生的方法的模型”是指,可以作为基于基因治疗、蛋白质/化合物等的投予的医疗(治疗法)研究开发、药物创新/生物学研究的方法使用的研究开发的模型。

[0225] 17.使四肢切断部组织再生的方法

[0226] 本发明包括:在哺乳类中使四肢切断部的组织再生的方法、以及可成为用于开发该方法的模型的动物模型(包括制作模型的实验手术方法、切断方法)、导入基因/投予的蛋白质/投予的化合物、辅助性地使用的生理活性物质、基因导入方法/物质投予方法。

[0227] 在本发明中,作为用于研究针对哺乳类中的切断四肢残端部的基因导入、蛋白质、化合物的投予对组织再生的影响的动物模型,开发了小鼠前臂切断模型。通过实施例13中记载的手术操作,在小鼠中进行上肢切断后,能够避免小鼠自身对残端部的侵袭,尽可能地保持局部的安静。

[0228] 图21显示裸鼠前臂切断部的残端处理方法的图解。在比存在于裸鼠前臂的皮肤表面上的伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物更近端的平面进行前臂切断。关于切断部,单纯地横向切断,或者在切断后施加残端部的周围皮肤切除,或者在切断时将神经保留得较长。切断后的创面设为开放创口,或者将周围的皮肤用手指压接或缝合。在从残端部分的出血多的情况下,可以通过安装硅帽来止血。

[0229] 通过本发明的实施例13中记载的手术操作、以及图21中以图解的方式图示的切断残端的处理方法,提供用于开发哺乳类的四肢切断部位的再生法的研究开发平台。

[0230] 本发明的在哺乳类中使四肢切断部的组织再生的方法的特征在于,包括:在不具有生理上不发生的组织再生能力的切断部的体细胞(也包括以切断为契机而局部迁移的血液系统的细胞等)中导入如下物质或使其发挥作用的工序,所述物质是:在具有切断的四肢末梢部分的组织再生能力的细胞(例如,在哺乳类胎儿期的肢芽、侧板中胚层(Lateral plate mesoderm)中存在的细胞、墨西哥钝口螈(Ambystoma mexicanum)、日本蝾螈(Cynops pyrhogaster)、非洲爪蟾(Xenopus laevis)等生理上具有更高的组织再生能力的两栖类的细胞)中表达相对强的、或者作为各个细胞的分化/产生过程中的主调控基因发挥作用的基因/蛋白质;在发生组织再生的环境(例如,在哺乳类胎儿期的肢芽、侧板中胚层(Lateral plate mesoderm)、墨西哥钝口螈(Ambystoma mexicanum)、日本蝾螈(Cynops pyrhogaster)、非洲爪蟾(Xenopus laevis)等生理上具有更高的组织再生能力的两栖类的四肢切断后的组织再生部)中强烈发挥作用的细胞因子、激素、以及具有与它们同等/类似的功能的化合物。以下,将导入的基因/蛋白质称为“导入基因/导入蛋白质”。将发挥作用的蛋白质称为“作用蛋白质”,将发挥作用的化合物称为“作用化合物”。

[0231] 导入基因、导入蛋白质、作用蛋白质、作用化合物可以多种并行使用,也可以将如下物质组合:在具有组织再生能力的细胞中表达相对不强、或者在各个细胞的分化/产生过程中不作为主调控基因发挥作用的基因、蛋白质;在发生组织再生的环境中不强烈地发挥

作用的细胞因子、激素、以及不具有与它们同等/类似的功能的化合物。

[0232] 本发明中的在具有组织再生能力的细胞中表达相对较强的或者在各个细胞的分化/产生过程中作为主调控基因发挥作用的基因、蛋白质,在发生组织再生的环境中较强地发挥作用的细胞因子、激素至少包含表3中记载的基因和由基因编码的蛋白质。

[0233] [表3]

[0234]

BMP2	HMGB3	Sp8	NR2C2	WNT3A
BMP4	HMGN1	SP9	TBX15	WNT5A
BMP5	HMGN2	STMN1	BCL11A	ZIC3
BMP7	HOXA10	TRIM69	SMARCA1	POU5F1
BMP9	HOXA9	XB5727893	SMARCA4	SOX2
FGF2	HSPA8	ZNF326	CIRBP	KLF4
FGF4	LEF1	TBX5	LIN28A	cMYC
FGF8	MARCKSL1	TCF7L2	HOXB9	PBX1
FGF10	MEIS1	NFIB	SALL4	
FGF20	MSX1	SHOX2	FOXD1	
SHH	MSX2	ZNF449	PRDM1	
RSPO2	MYCN	EGR1	EGR3	
BRCA1	nAG	HDAC1	WNT7A	
DNMT1	PRDX1	POLE4	IL6	
E2F8	PRDX2	ATF1	FOXA1	
ETV2	Prod1	PPARD	FOXA2	
GTF2F1	PRRX1	TIMELESS	MBD4	
HAND2	SAP30	TFDP1	NR2F2	
HDAC2	SMC3	TFDP2	PA2G4	
HMGB2	SNRPF	KAZALD1	SPDEF	

[0235] 这些基因的多数来源在包括人在内的哺乳动物中共同存在,可以使用任意的哺乳动物来源的基因,优选根据导入的体细胞的来源适当选择。例如,在以人为对象的情况下,上述导入基因、蛋白质优选为人来源。另外,上述导入基因、蛋白质除了野生型基因、蛋白质以外,也可以是对氨基酸序列中的数个(例如为1～10个,优选为1～6个,进一步优选为1～4个,更优选为1～3个,特别优选为1或2个)氨基酸被置换、缺失和/或插入并且具有与野生型基因产物同等的功能的变异基因产物进行编码的变异基因。另外,也可以使用以对与各个基因所编码的氨基酸同样的氨基酸进行编码的方式变更/优化了密码子的序列。

[0236] 在本发明中,上述导入基因可以基于公知的序列信息按照常规方法制备。例如,从哺乳动物来源的细胞中提取RNA,按照常规方法进行克隆,由此可以制备目标基因的cDNA。另外,也可以作为人工基因合成。人工基因合成时,也可以根据导入的体细胞的来源动物进行密码子的优化。

[0237] 18.实验结果6

[0238] 以下,基于实施例等对本发明进行详细说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0239] 实施例18

[0240] 图22是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,然后将切断面设为开放创口的试验的结果。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第5天,在存在于前臂的皮肤表面上的伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物的近端进行横向切断,切断面设为开放创口,每7天在手术用显微镜(三光鹰器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片,并且观察经过,直至切断后第70天。采集前臂的组织后,用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,骨的残端部分被皮质骨封闭,软组织通过周围皮肤的收缩封闭而治愈。未确认到四肢切断部中的显著的组织再生。

[0241] 实施例19

[0242] 图23是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,然后将切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果。利用逆转录病毒进行POLE4、NFIB、PPARD、FGF10、FGF20、FGF2的基因导入,利用AAVDJ1进行PRRX1、HDAC2的基因导入,利用AAVDJ进行LEF1、SHH的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,对于POLE2、NFIB、PPARD使用通过聚乙二醇浓缩将2ml的逆转录病毒液浓缩至共计500μl的病毒浓缩液,对于FGF10、FGF20、FGF2使用通过聚乙二醇浓缩将1ml的逆转录病毒液浓缩至共计500μl的病毒浓缩液。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达各基因的具有指定衣壳的AAV并使用。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第5天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物的近端设定为切断高位。在切断预定线部分注入初次的逆转录病毒后,进行横向切断,切断面设为开放创口。关于逆转录病毒,在即将切断前的初次注入至切断后第5天的期间分10次进行局部注入。关于AAVDJ-SHH,在切断后立即局部注入1次2.5×10^{11}GC/8μl的病毒液。将分别包含1.0×10^{12}GC的AAVDJ-LEF1、AAVDJ1-PRRX1、AAVDJ1-HDAC2的18μl的病毒液在切断当日每次2μl进行2次创面涂布后,次日注入2次、在第2天注入3次来进行局部注入。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。在切断后第36天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,在前端部分形成有墨西哥钝口螈(Ambystoma mexicanum)、日本蝾螈(Cynops pyrhogaster)、非洲爪蟾(Xenopus laevis)等在生理上具有更高的组织再生能力的两栖类的四肢切断残端部所确认到的芽基(blastema)样软组织块,确认到骨朝向组织内轴向延伸。

[0243] 实施例20

[0244] 图24是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,然后将切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果。利用逆转录病毒进行PRDX2、POLE4、NFIB、PPARD、

FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、SHH的基因导入,利用AAVDJ1进行PRRX1、HDAC2的基因导入,利用AVDJ进行LEF1的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,PRDX2、POLE2、NFIB、PPARD、FGF10、FGF20、FGF2、BMP5均使用了通过聚乙二醇浓缩将1ml的逆转录病毒液浓缩至共计400μl的病毒浓缩液。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达各基因的具有指定衣壳的AAV并使用。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第2天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。在切断预定线部分,作为初次的逆转录病毒,注入100μl的逆转录病毒液后,注入分别包含1.0×10^{11}GC的AAVDJ-LEF1、AAVDJ1-PRRX1、AAVDJ1-HDAC2的5μl溶液,进行横向切断,切断面设为开放创口,安装硅帽以止血。次日注入分别包含1.0×10^{11}GC的AAVDJ-LEF1、AAVDJ1-PRRX1、AAVDJ1-HDAC2的5μl溶液2次。从第2天至第5天1天1次向前端部分注入逆转录病毒液。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。在切断后第40天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,在骨残端的远端部分确认到伴有芽基样软组织块和从内部起的丰富的骨小梁结构的骨组织新生。

[0245] 实施例21

[0246] 图25是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,然后将切断面设为开放创口,进行基因导入的试验的结果。在残端部中央利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的基因导入。在残端部外侧利用逆转录病毒进行SHH的基因导入。在残端部利用AAVDJK2进行FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,对于FGF10、FGF20、FGF2、SHH使用以4ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液,对于NFIB、PPARD、POLE4使用以12ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在K14启动子下表达FGF8的具有AAVDJK2衣壳的病毒并使用。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第2天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。在切断预定线部分注入表达FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的逆转录病毒液后,进行横向切断,切断面设为开放创口,再次注入表达FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的逆转录病毒液后,在前臂前外侧部注入表达SHH的逆转录病毒液。在切断前后所注入的表达FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的逆转录病毒液为20μl,表达SHH的逆转录病毒液为2μl。然后,将表达FGF10、FGF20、FGF2、NFIB、PPARD、POLE4的逆转录病毒液各4μl在包括切断前后在内的直至切断第5天的期

间局部注入18次。将表达SHH的逆转录病毒液各2μl在包括切断后在内的直至切断第3天的期间向前外侧局部注入11次。关于在K14启动子下表达FGF8的AAVDJK2,将包含1.0×10^{11}GC的2μl溶液在切断后第5天至第23天的期间局部注入7次。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。切断后经过3周后开始,前端部的形状变为平坦,从腹侧观察时,看到分支的白色结构物。在切断后第28天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,在软组织块中与白色结构物的位置一致地确认到骨髓细胞聚集存在。

[0247] 实施例22

[0248] 图26是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,作为前20次的局部注入量,对于FGF10、FGF20、FGF2,使用以4ml表达OCT4的逆转录病毒液24ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。作为后16次局部注入量,使用以表达OCT4的逆转录病毒液24ml的病毒浓缩液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。AAV使用了向载体家公司定制、购买的在CAG启动子下分别表达SHH、FGF8的具有AAVDJ衣壳的AAV。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的次日,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位,在切断预定线的前臂外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在前臂内侧部分局部注入AAVDJ-FGF8 1.0×10^{11}GC/2μl。进而次日,在表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4的逆转录病毒浓缩液20μl中混合注入5μl作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml),向包括皮下和肌肉内、骨周围组织在内的部位注入的同时,在预定切断高位进行前臂切断后,用手指压接前臂前后面的皮肤,闭合创面。然后直至切断第4天为止,将该逆转录病毒浓缩液10μl局部注入20次。接着,从切断第5天至切断第10天为止,将表达OCT4的逆转录病毒浓缩液10μl局部注入16次。在切断后第6天、第13天、第20天,在切断端外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在切断端内侧部分局部注入AAVDJ-FGF81.0×10^{11}GC/2μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断后经过10周左右起,在前端部出现突起状的结构,然后前端部继续伸长。在切断后第105天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,确认到在伸长的组织内沿轴向纵贯的细胞结构。

[0249] 实施例23

[0250] 图27是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,作为前20次局部注入量,对于FGF10、FGF20、FGF2使用以4ml表达OCT4、SOX2的逆转录病毒液12ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。作为后16次局部注入量,使用以表达OCT4、SOX2的逆转录病毒液12ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。AAV使用了向载体家公司定制、购买的在CAG启动子下分别表达SHH、FGF8的具有AAVDJ衣壳的AAV。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的次日,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位,在切断预定线的前臂外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在前臂内侧部分局部注入AAVDJ-FGF8 1.0×10^{11}GC/2μl。进而次日,在表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2的逆转录病毒浓缩液20μl中混合注入5μl作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml),向包括皮下和肌肉内、骨周围组织在内的部位注入的同时,在预定切断高位进行前臂切断后,用手指压接前臂前后面的皮肤,闭合创面。然后直至切断第4天为止,将该逆转录病毒浓缩液10μl局部注入20次。接着,从切断第5天至切断第10天为止,将表达OCT4、SOX2的逆转录病毒浓缩液10μl局部注入16次。在切断后第6天、第13天、第20天,在切断端外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在切断端内侧部分局部注入AAVDJ-FGF8 1.0×10^{11}GC/2μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断后经过8周左右起,在前端部出现突起状的结构,然后前端部以分支的形状继续伸长。在切断后第70天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,确认到在伸长的分支部内沿轴向纵贯的细胞结构。

[0251] 实施例24

[0252] 图28是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入,从残端部内侧至前端部利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,作为前20次局部注入量,对于FGF10、FGF20、FGF2使用以4ml表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒液8ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。作为后16次局部注入量,使用以表达

OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒液8ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。AAV使用了向载体家公司定制、购买的在CAG启动子下分别表达SHH、FGF8的具有AAVDJ衣壳的AAV。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的次日,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位,在切断预定线的前臂外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在前臂内侧部分局部注入AAVDJ-FGF8 1.0×10^{11}GC/2μl。进而次日,在表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒浓缩液20μl中混合注入5μl作为类固醇的康宁克通A(40mg/ml),向包括皮下和肌肉内、骨周围组织在内的部位注入的同时,在预定切断高位进行前臂切断后,用手指压接前臂前后面的皮肤,闭合创面。然后直至切断第4天为止,将该逆转录病毒浓缩液10μl局部注入20次。接着,从切断第5天至切断第10天,将表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒浓缩液10μl局部注入16次。在切断后第6天、第13天、第20天,在切断端外侧部分局部注入AAVDJ-SHH 1.0×10^{11}GC/2μl,在切断端内侧部分局部注入AAVDJ-FGF81.0$\times10^{11}$GC/2μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断后经过8周左右起,在前端部出现突起状的结构,然后前端部以分支的形状继续伸长。在切断后第98天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,确认到在伸长的分支部内沿轴向纵贯的与手指的远节指骨类似的形状的由软骨系细胞构成的组织结构、伴有骨新生的骨小梁结构。

[0253] 实施例25

[0254] 图29是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,对于切断面将周围的皮肤用手指压接,进行基因导入的试验的结果,显示了残端部的外观经过和代表性的组织所见、以及放大图像。在残端部利用逆转录病毒进行FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6、SHH的基因导入。在残端部前端利用AAVDJ进行FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,作为前半注入量,对于FGF10、FGF20、FGF2使用以4ml表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒液8ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。对于SHH以6ml的逆转录病毒液为基础,与其他基因表达逆转录病毒分开准备病毒浓缩液。AAV使用了向载体家公司定制、购买的在CAG启动子下表达FGF8的具有AAVDJ衣壳的AAV。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位,在切断预定线皮下局部注入AAVDJ-SHH 2.0×10^{11}GC/6μl。次日,在切断预定线的皮下和肌肉内、骨周围组织中注入表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒浓缩液20μl后,在预定切断高位进行前臂切断,用手指压接前臂前后面的皮肤,闭合创面。之后立即将表达SHH的逆转录病毒浓缩液3μl注入残端附近的外侧皮下。同日在切断后2小时的时间点,在表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒液8μl中混合注入康宁克通A

(40mg/ml)2μl,进行局部注入。从切断次日至第5天将表达FGF10、FGF20、FGF2、OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒液10μl局部注入16次。关于表达SHH的逆转录病毒,从切断次日至切断第3天将病毒液3μl注入残端附近的外侧皮下3次。从切断第6天至切断第8天,将表达OCT4、SOX2、TBX6的逆转录病毒浓缩液8μl局部注入7次。在切断后第6天、第13天、第20天,在切断端前端部局部注入AAVDJ-FGF8 1.0×10^{11}GC/2.5μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片(切断后第21天未进行记录)。在切断后第56天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,在骨残端部的远端形成袋状的结构,在内部确认到与软骨组织和周围的肌肉独立的肌束新生。

[0255] 实施例26

[0256] 图30是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果。在残端部利用逆转录病毒进行HMGB3、DMNT、1HDAC2、PRDX2、FGF10的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,分别使用以6ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ衣壳的AAV并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第7天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。将表达HMGB3、DMNT、1HDAC2、PRDX2、FGF10的逆转录病毒浓缩液30μl局部注入预定切断部位。经过6小时后,局部注入FGF2溶液25μl。1天后、2天后也同样隔开时间地将逆转录病毒、FGF2溶液局部注入预定切断部位。3天后局部注入逆转录病毒浓缩液30μl后,进行横向切断,形成开放创口后,在外侧局部注入AAVDJ-SHH 5.0×10^{11}GC。在切断第1天、第2天,在切断截面上涂布逆转录病毒浓缩液2μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断5周左右起,随时间的推移,前端开始突出、伸长。在切断后第63天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,确认到在骨残端部诱导了伴有与关节内软骨类似的软骨内骨化样组织像的软骨组织。

[0257] 实施例27

[0258] 图31是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,在残端部利用逆转录病毒进行FGF10的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的

基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,分别使用以6ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液80μl。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ1衣壳的病毒并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第10天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。从切断4天前至2天前注入20μl的逆转录病毒浓缩液后,在3-5小时后局部注入20μl的FGF2溶液。切断时,将神经残端保留得较长并进行横向切断,切除残端部周围皮肤后,注入20μl的逆转录病毒浓缩液。在切断第7天在外侧局部注入AAVDJ1-SHH 10^{11}GC。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始突出。在切断后第63天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织所见上,确认到从残端部附近的皮肌层具有连续性地诱导了软骨组织。

[0259] 实施例28

[0260] 图32是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,在残端部利用逆转录病毒进行HMGB3、DMNT1、HDAC2、FGF10的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ进行SHH的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,分别使用以6ml的逆转录病毒液为基础通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液80μl。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ1衣壳的病毒并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第10天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。从切断4天前至2天前注入20μl的逆转录病毒浓缩液后,在3-5小时后局部注入20μl的FGF2溶液。切断时,将神经残端较长地保留并进行横向切断,切除残端部周围皮肤后,注入20μl的逆转录病毒浓缩液。在切断第7天在外侧局部注入AAVDJ1-SHH 10^{11}GC。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始突出。在切断后第63天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读

取。组织所见上,确认到从残端部附近的皮肌层具有连续性地诱导了软骨组织,软骨样组织被覆骨残端部。

[0261] 实施例29

[0262] 图33是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,在残端部利用逆转录病毒进行MSX1、MSX2、LIN28A、MEIS1、FGF10的基因导入。在残端部外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入。在前端部分利用AAVDJK2进行LEF1、FGF8的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,对于MSX1、MSX2、LIN28A分别以8ml的逆转录病毒液为基础,对于MEIS1、FGF10分别以4ml的逆转录病毒液为基础,制作通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液2次并使用。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ1衣壳的病毒、具有在K14启动子下表达LEF1或FGF8的AAVDJK2衣壳的病毒并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第5天(切断8天前),在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。在切断8天前至1天前注入20μl的逆转录病毒浓缩液后,在3-5小时后局部注入20μl的FGF2溶液。切断时,将神经残端保留得较长并进行横向切断,切除残端部周围皮肤后,注入20μl的逆转录病毒浓缩液。切断11天后,在外侧利用AAVDJ1将SHH 5×10^{11}GC/4μl进行基因导入。切断14天后,在前端部分利用AAVDJK2将分别包含5×10^{11}GC的LEF1、FGF8的共计4μl进行基因导入。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始突出。在切断后第56天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织学上确认到诱导了骨残端的轴向延伸,在骨残端部诱导了与关节内软骨类似的伴有软骨内骨化样组织像的软骨组织。

[0263] 实施例30

[0264] 图34是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,在残端部利用逆转录病毒进行MSX1、MSX2、LIN28A、WNT7A、FGF10的基因导入。在切断前一天,在残端部外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入,在全周性皮下利用AAVDJK2进行LEF1的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,对于MSX1、MSX2、LIN28A分别以6ml的逆转录病毒液为基础,对于WNT7A、FGF10分别以8ml的逆转录病毒液为基础,制作通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩

液并使用。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ1衣壳的病毒、具有在K16P5启动子下表达LEF1的AAVDJK2衣壳的病毒并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第4天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。在切断5天前至2天前注入20μl的逆转录病毒浓缩液后,在3-5小时后局部注入20μl的FGF2溶液。在切断前一天,利用AAVDJ1将在CAG启动子下表达SHH的病毒液3.3×10^{10}GC/4μl注入外侧后,利用AAVDJK2将在K16P5启动子下表达LEF1的病毒液1.6×10^{11}GC/10μl全周性地注入皮下。12小时后局部注入20μl的FGF2溶液。在切断前将逆转录病毒液20μl注入切断预定部位后,进行横向切断,切除残端部周围皮肤。切断次日在前端部分注入逆转录病毒液4μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始突出。在切断后第56天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织学上确认到在切断端周围的皮下,肌肉组织的厚度增加而增生。

[0265] 实施例31

[0266] 图35是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在切断预定部位进行基于FGF2注入和病毒液注入的基因导入,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验的结果,在残端部利用逆转录病毒进行LEF1、HDAC2、PRDX2、WNT7A、FGF10的基因导入。在切断前一天,在残端部外侧利用AAVDJ1进行SHH的基因导入,在全周性皮下利用AAVDJK2进行LEF1的基因导入。对于逆转录病毒,使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技)按照常规方法将编码各基因的PMXs逆转录病毒骨架质粒和包装质粒(pCMV-gagpol-PA,pCMV-VSVg)转染至293FT细胞(赛默飞世尔科技),使用更换培养基后的细胞上清液作为逆转录病毒液。对于每1只动物,对于LEF1、HDAC2、PRDX2分别以6ml的逆转录病毒液为基础,对于WNT7A、FGF10分别以8ml的逆转录病毒液为基础,制作通过聚乙二醇浓缩而浓缩的病毒浓缩液并使用。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达SHH的具有AAVDJ1衣壳的病毒、具有在K16P5启动子下表达LEF1的AAVDJK2衣壳的病毒并使用。作为FGF2溶液,使用将Fiblast喷雾制剂(科研制药株式会社)溶解于PBS而成的溶液(500μg/ml)。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第4天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。在切断5天前至2天前注入20μl的逆转录病毒浓缩液后,在3-5小时后局部注入20μl的FGF2溶液。在切断前一天,利用AAVDJ1将在CAG启动子下表达SHH的病毒液3.3×10^{10}GC/4μl注入外侧后,利用AAVDJK2将在K16P5启动子下表达LEF1的病毒液1.6×10^{11}GC/10μl全周性地注入皮下。12小时后局部注入20μl的FGF2溶液。在切断前将逆转录病毒液20μl注入切断预定部位后,进行横向切断,切除残端部周围皮肤。切断次日在前端部分注入逆转录病毒液4μl。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始突出。

在切断后第56天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织学上确认到在切断端周围的皮下,肌肉组织的厚度增加而增生。

[0267] 实施例32

[0268] 图36是将裸鼠的左上肢向背侧移位后,在前臂部横向切断,切断面设为开放创口,切断后也进行基因导入的试验结果,在残端部利用AAVDJ进行LEF1、PRRX1、HDAC2、PRDX2、PPARD、FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、SHH的基因导入。关于AAV,通过实施例2中记载的浓缩AAV制作法,制作在CAG启动子下表达LEF1、PRRX1、HDAC2、PRDX2、PARD、FGF10、FGF20、FGF2、BMP5、SHH的具有AAVDJ衣壳的病毒并使用。通过实施例13的手术方法将4-5周龄的BALB/cAJcl-nu/nu(实验动物中央研究所来源)小鼠的左上肢向背侧移位的第二天,在前臂的皮肤表面上存在伴有平缓突出的伴有发红的皮肤结构物,将该皮肤结构物近端设定为切断高位。横向切断后,切断面设为开放创口,从切断后至第2天,将分别包含5×10^{10}GC表达PRRX1、HDAC2、PRDX2、PPARD、FGF20、FGF2、SHH的AAV、包含5×10^{9}GC表达FGF10的AAV、包含10^{11}GC表达BMP5的AAV的病毒液25μl分10次注入前端部分。切断后每7天在手术用显微镜(三鹰光器株式会社制MM100-YOH)观察下拍摄照片。从切断2周左右起,随时间的推移,前端开始带有圆度地增大。在切断后第70天拍摄照片后,采集前臂的组织,然后用4%多聚甲醛、磷酸缓冲液(ph7.4)固定1晚后,埋入OCT复合物中进行冷冻。使用川本片(SECTION-LAB,Cryofilm type 2C(9),2.5cm C-FP094),从冷冻组织以10μm的厚度每200μm收集切片,进行苏木精伊红染色,使用玻片扫描仪(VS200,奥林巴斯)将得到的玻片作为图像文件读取。组织学上确认到从皮下到深筋膜下的肌肉组织内脂肪组织的增生。

[0269] 在本发明中,如实施例18、实施例19、实施例20、实施例21、实施例22、实施例23、实施例24、实施例25、实施例26、实施例27、实施例28、实施例29、实施例30、实施例31、实施例32中所示的那样,通过实施例13中记载的手术操作、以及图21中作为图解而图示的切断残端的处理方法,提供用于开发哺乳类中的四肢切断部位的再生法的研究开发平台。

[0270] 另外,在本发明中,通过进行哺乳类胎儿期的表达基因、由两栖类再生期的表达基因分析得到的候选基因(表3)向切断残端的基因导入、蛋白质投予、类固醇投予等干预,从而在通常通过皮质骨和周围皮肤的收缩封闭来治愈且未确认到显著的组织再生的残端部(实施例18),能够获得如下的与分支的指状形态再生、包含神经肌肉组织在内的功能性四肢的再生相关的组织再生:在生理上具有更高的组织再生能力的两栖类的四肢切断残端部所确认到的芽基样软组织块的形成(实施例19)、伴有芽基样软组织块和从内部起的丰富的骨小梁结构的骨组织新生(实施例20)、前端部的形状变为平坦且由骨髓细胞引起的分支结构形成(实施例21)、前端部的伸长以及伸长组织内的沿轴向纵贯的细胞结构(实施例22)、前端部在分支的同时伸长以及伸长组织内沿轴向重叠的细胞结构(实施例23)、前端部以分支形状伸长以及在分支伸长组织内沿轴向纵贯的与手指的远节指骨类似的形状的由软骨系细胞构成的组织结构和伴有骨新生的骨小梁结构(实施例24)、在内部伴有软骨结构和独立的肌束新生的袋状结构(实施例25)等。可以作为以针对缺损四肢的再生诱导为目的的治疗法、以及以治疗开发为目的的研究开发法来应用。

[0271] 另外,在本发明中,能够获得如下的明显的软骨组织的再生:伴有与关节内的软骨类似的软骨内骨化样组织像的前端部分的突出、伸长(实施例26)、从残端部附近的皮肌层具有连续性的软骨组织的诱导(实施例27)、骨残端部的软骨样组织的被覆结构(实施例28)、骨残端的轴向延伸、在骨残端部伴有与关节内软骨类似的软骨内骨化样的组织像的软骨组织的诱导(实施例29)等。由于能够得到针对关节软骨的年龄增加引起的变性、变形性关节病等的治疗法、骨残端部的软骨内骨化诱导、以及该部位的伸长,因此可以作为以延长四肢骨为目的的治疗法、以及以将来的治疗开发为目的和以治疗开发为目的的研究开发法来应用。

[0272] 另外,在本发明中,能够获得如下的肌肉组织、脂肪组织的再生:切断端周围的皮下的肌肉组织的增生(实施例30、实施例31)、从切断端部的皮下至深筋膜下的肌肉组织内的脂肪组织的增生(实施例32)等。可以作为针对随年龄增长的皮下脂肪组织的薄化引起的整容性的变化/肌力降低、由外伤、恶性肿瘤切除等各种原因引起的整容性的变化、麻痹性疾病中的肌力变化等的治疗法、以及以将来的治疗开发为目的和以治疗开发为目的的研究开发法来应用。

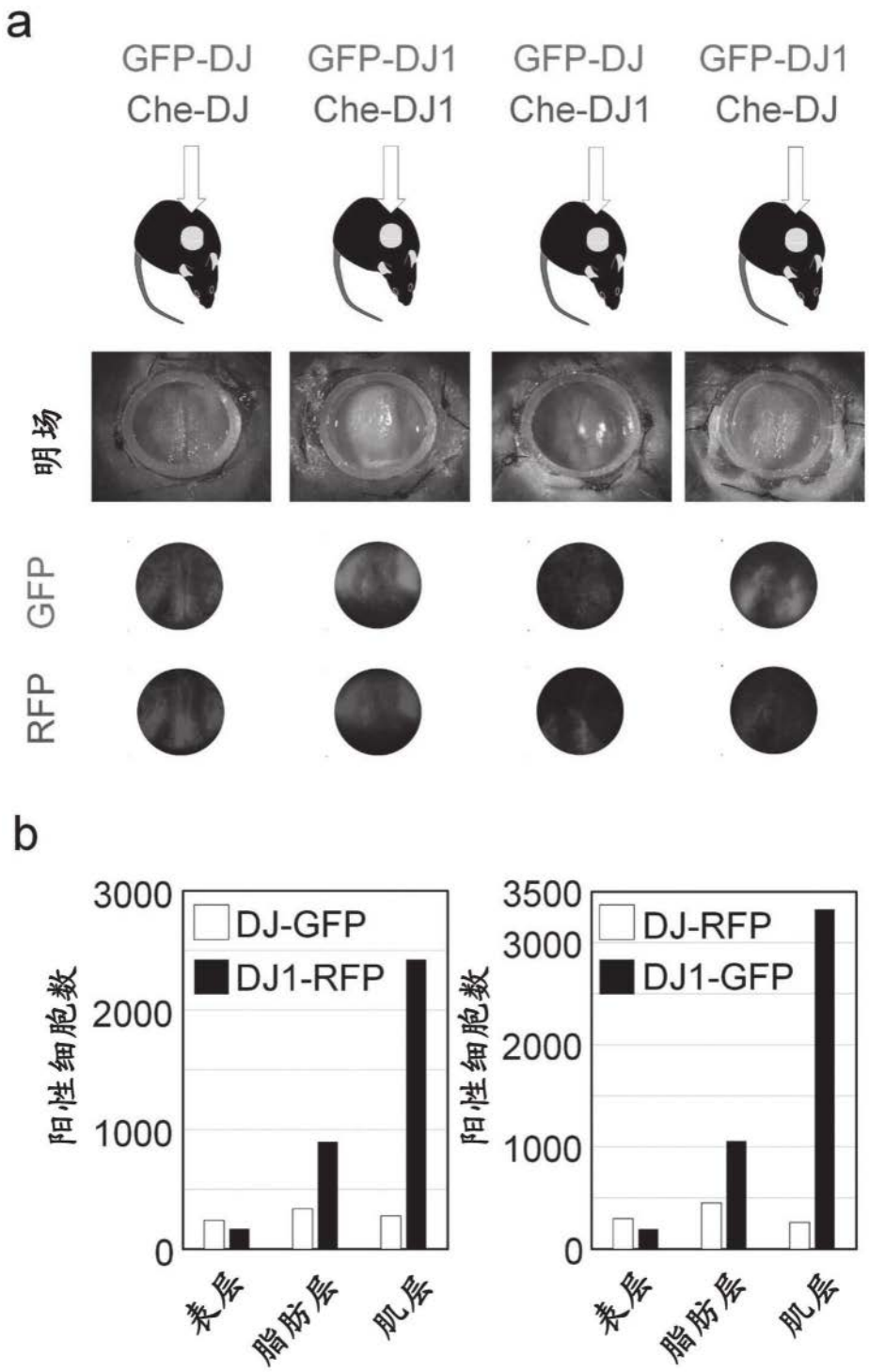

a
GFP-DJ
Che-DJ
GFP-DJ1
Che-DJ1
GFP-DJ
Che-DJ1
GFP-DJ1
Che-DJ
明场
GFP
RFP
b
阳性细胞数
3000
2000
1000
0
DJ-GFP
DJ1-RFP
表层
脂肪层
肌层
阳性细胞数
3500
3000
2000
1000
0
DJ-RFP
DJ1-GFP
表层
脂肪层
肌层

图1

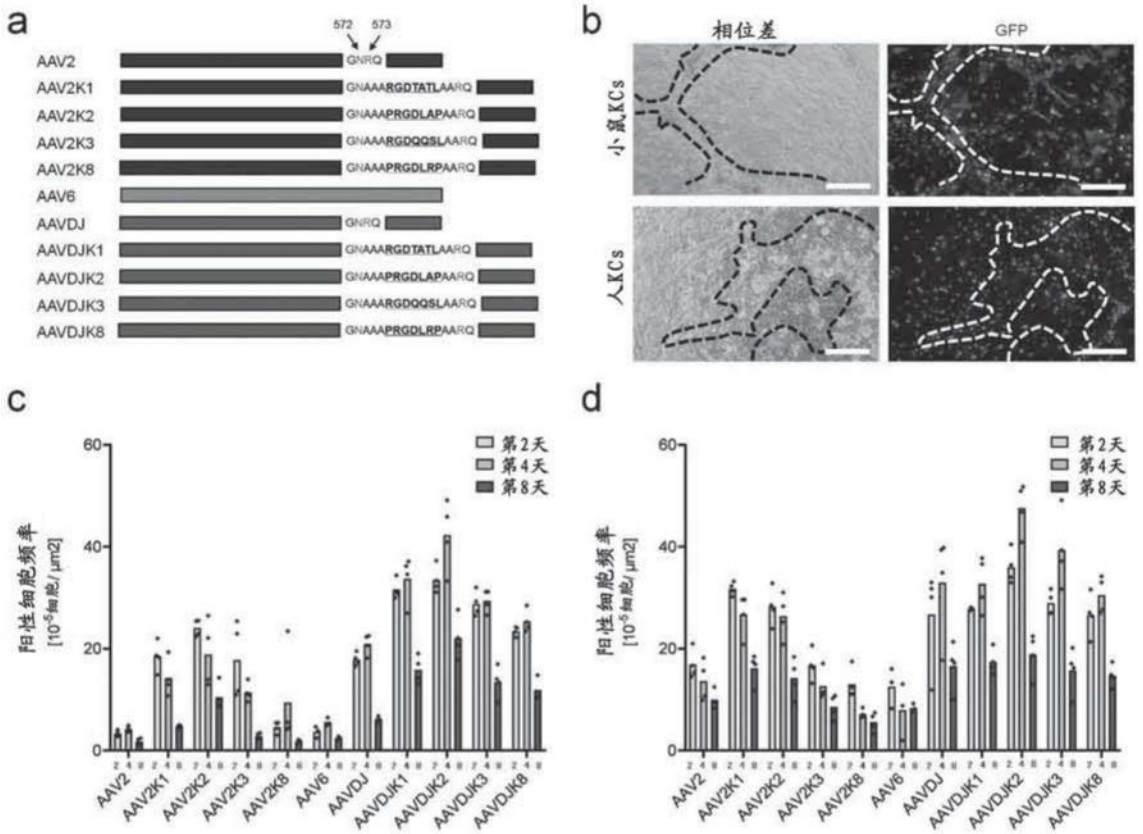

a
572
573
AAV2 GNRQ
AAV2K1 GNAAARGDTATLAARQ
AAV2K2 GNAAAPRGDLAPAARQ
AAV2K3 GNAAARGDQQSLAARQ
AAV2K8 GNAAAPRGDLRPAARQ
AAV6
AAVDJ GNRQ
AAVDJK1 GNAAARGDTATLAARQ
AAVDJK2 GNAAAPRGDLAPAARQ
AAVDJK3 GNAAARGDQQSLAARQ
AAVDJK8 GNAAAPRGDLRPAARQ
b
相位差
GFP
小鼠KCs
人KCs
c
阳性细胞频率
[10⁻⁵细胞/μm2]
第2天
第4天
第8天
AAV2
AAV2K1
AAV2K2
AAV2K3
AAV2K8
AAV6
AAVDJ
AAVDJK1
AAVDJK2
AAVDJK3
AAVDJK8
d
阳性细胞频率
[10⁻⁵细胞/μm2]
第2天
第4天
第8天
AAV2
AAV2K1
AAV2K2
AAV2K3
AAV2K8
AAV6
AAVDJ
AAVDJK1
AAVDJK2
AAVDJK3
AAVDJK8

图2

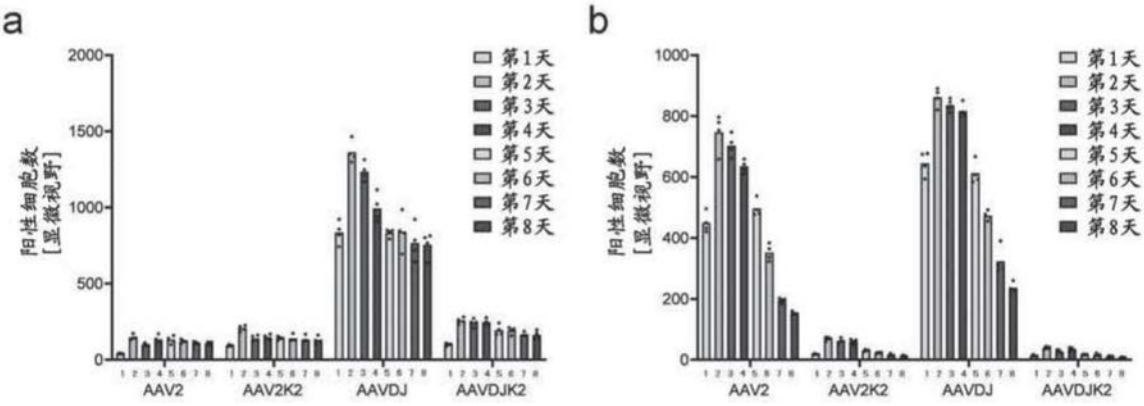

a
阳性细胞数
[显微视野]
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
第8天
AAV2
AAV2K2
AAVDJ
AAVDJK2
b
阳性细胞数
[显微视野]
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
第8天
AAV2
AAV2K2
AAVDJ
AAVDJK2

图3

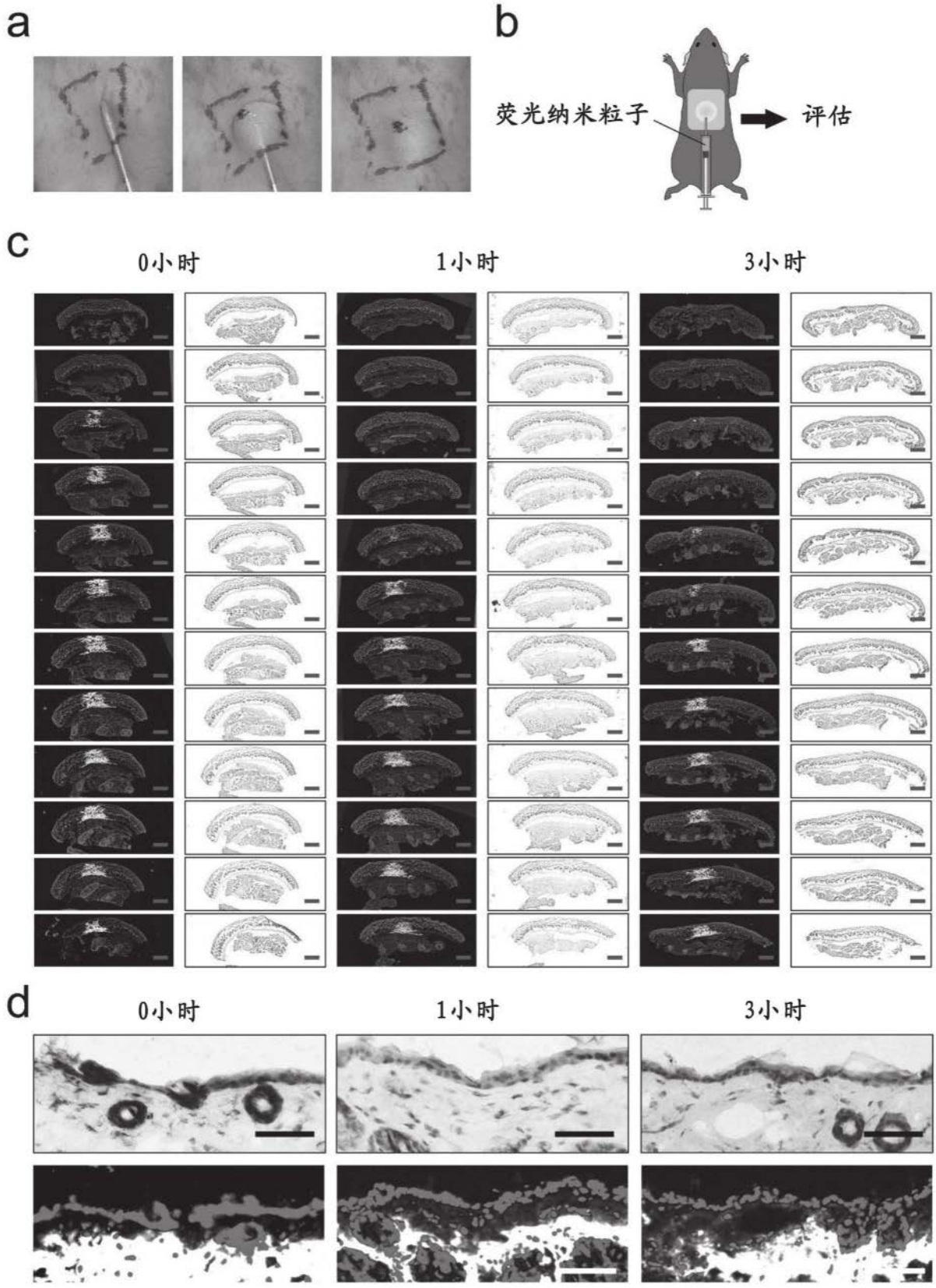


图4

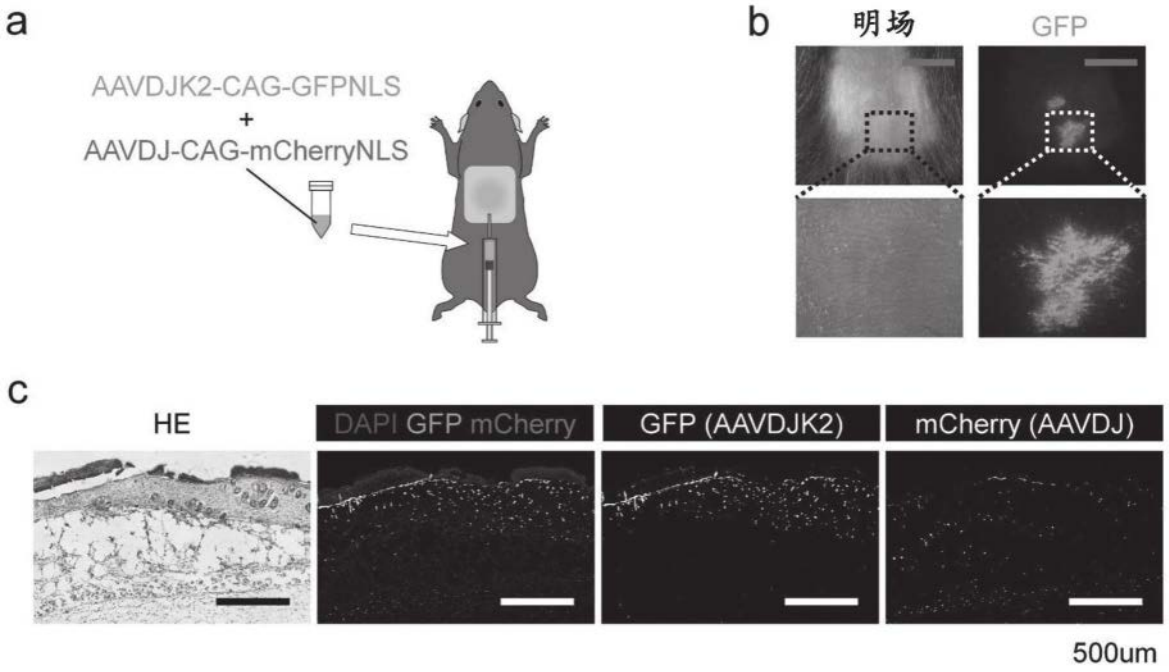

a
AAVDJK2-CAG-GFPNLS
+
AAVDJ-CAG-mCherryNLS
b
明场
GFP
c
HE
DAPI GFP mCherry
GFP (AAVDJK2)
mCherry (AAVDJ)
500um

图5

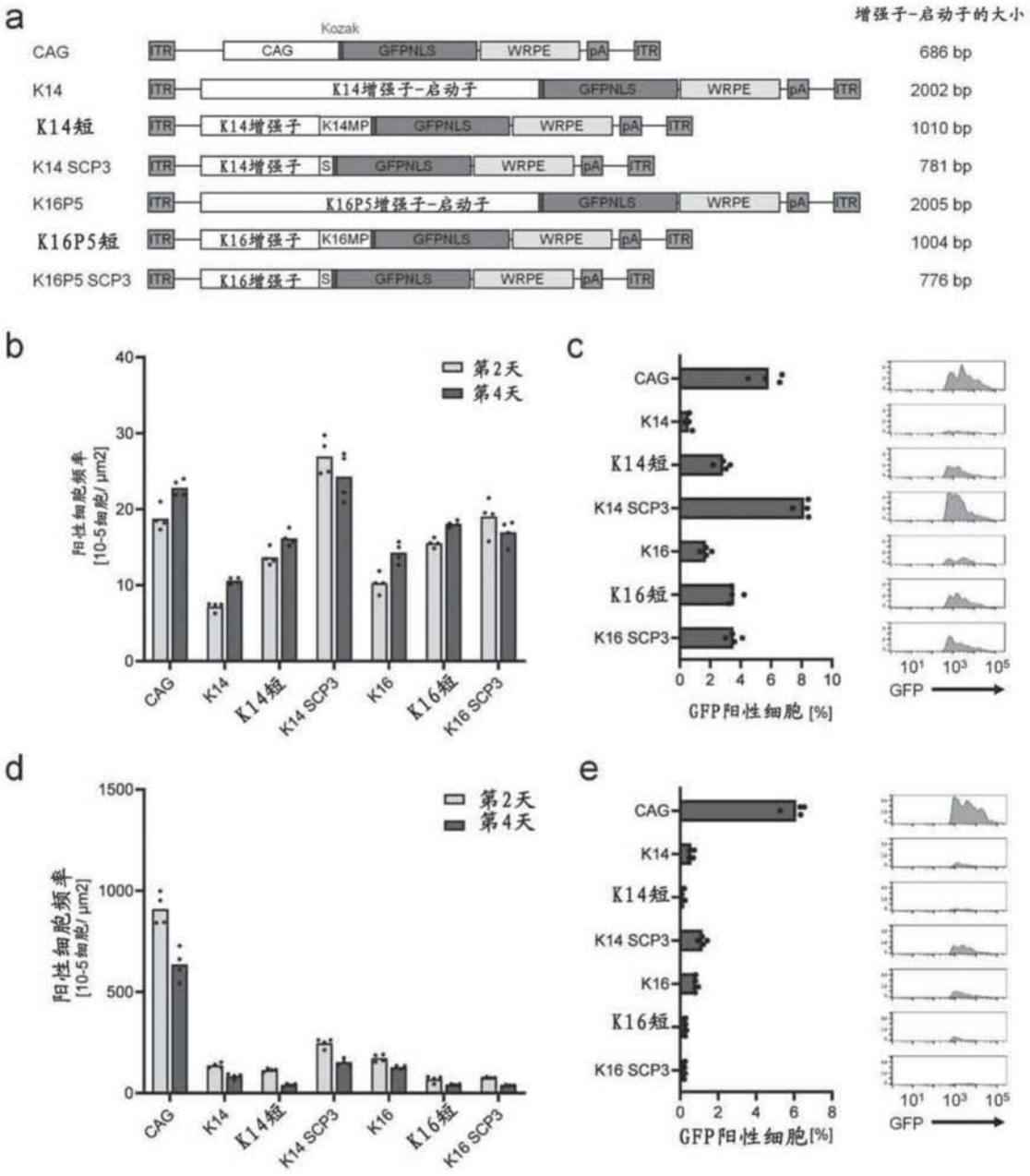

a
增强子-启动子的大小
Kozak
CAG
K14
K14短
K14 SCP3
K16P5
K16P5短
K16P5 SCP3
ITR
CAG
GFPNLS
WRPE
pA
K14增强子-启动子
K14增强子
K14MP
S
K16P5增强子-启动子
K16增强子
K16MP
686 bp
2002 bp
1010 bp
781 bp
2005 bp
1004 bp
776 bp
b
第2天
第4天
阳性细胞频率 [10-5细胞/μm2]
c
GFP阳性细胞 [%]
GFP
d
e

图6

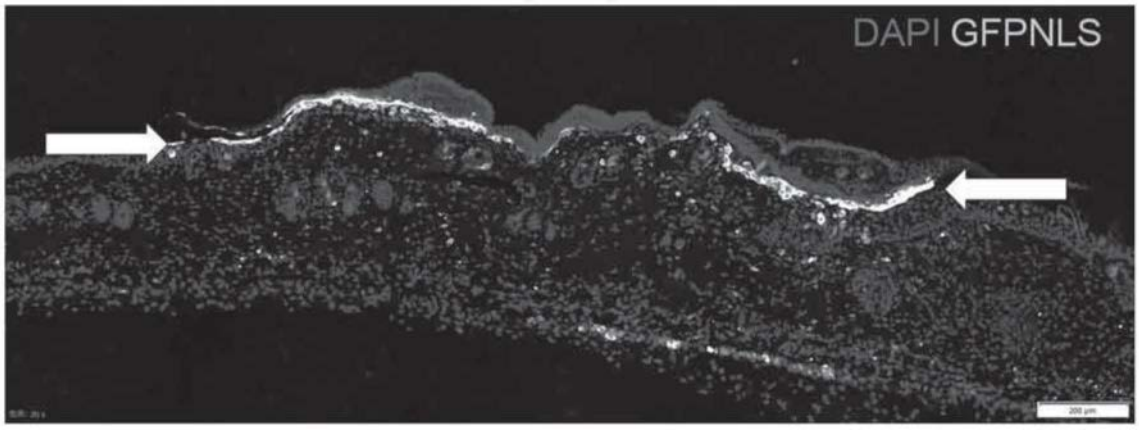


图7

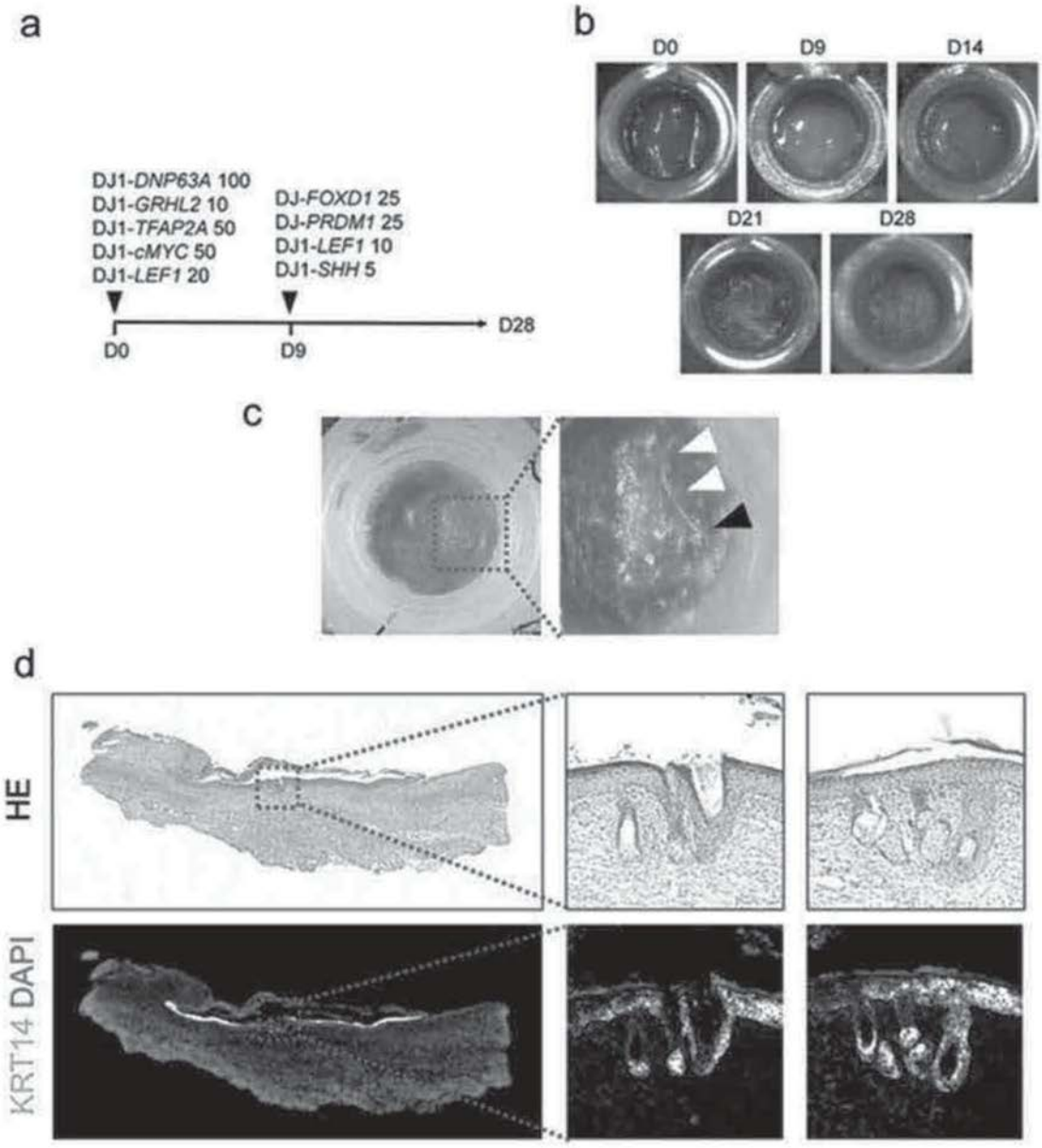

a
DJ1-DNP63A 100
DJ1-GRHL2 10
DJ1-TFAP2A 50
DJ1-cMYC 50
DJ1-LEF1 20
DJ-FOXD1 25
DJ-PRDM1 25
DJ1-LEF1 10
DJ1-SHH 5
D0
D9
D28
b
D0
D9
D14
D21
D28
c
d
HE
KRT14 DAPI

图8

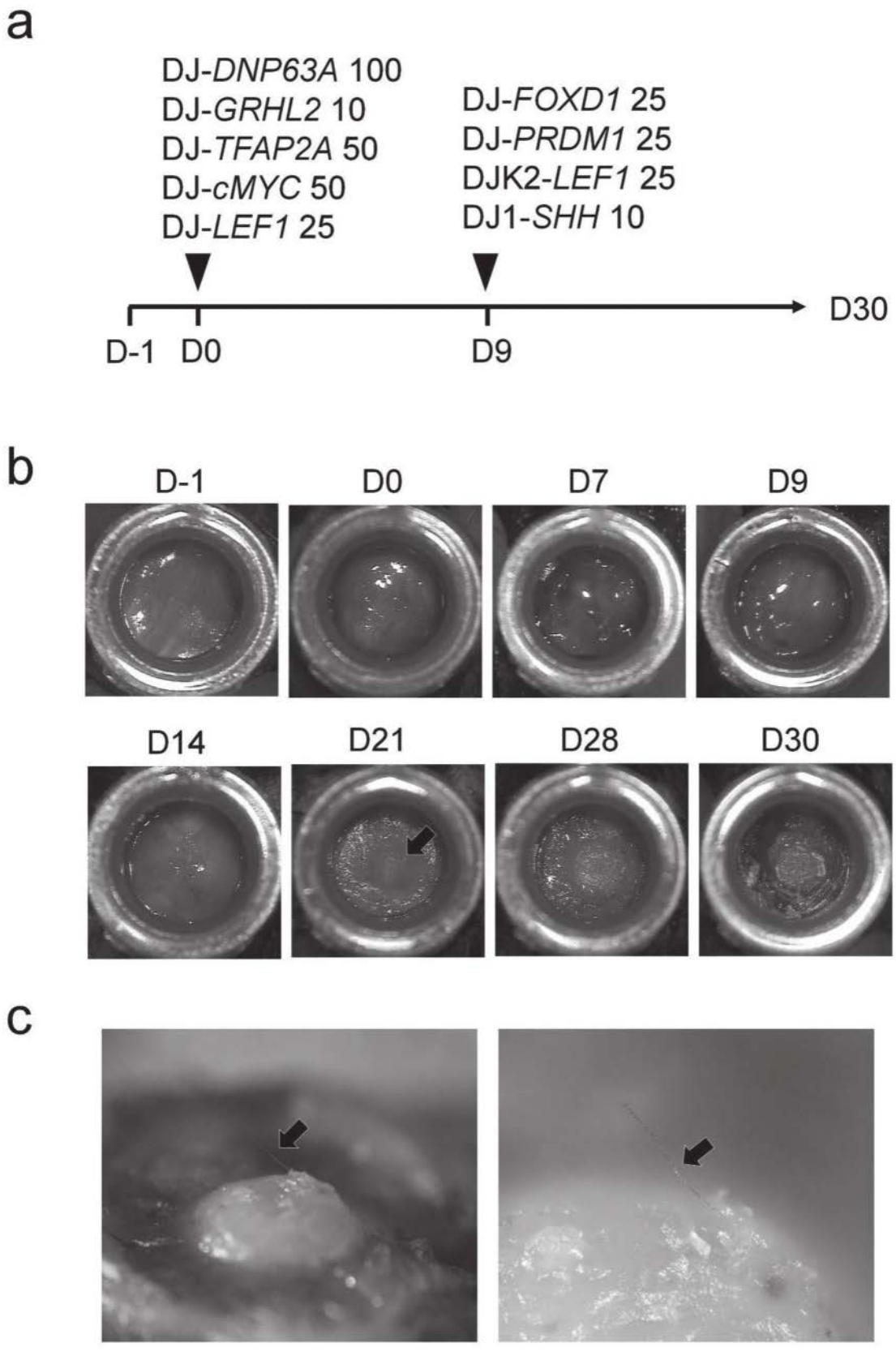

a
DJ-DNP63A 100
DJ-GRHL2 10
DJ-TFAP2A 50
DJ-cMYC 50
DJ-LEF1 25
DJ-FOXD1 25
DJ-PRDM1 25
DJK2-LEF1 25
DJ1-SHH 10
D-1
D0
D9
D30
b
D-1
D0
D7
D9
D14
D21
D28
D30
c

图9

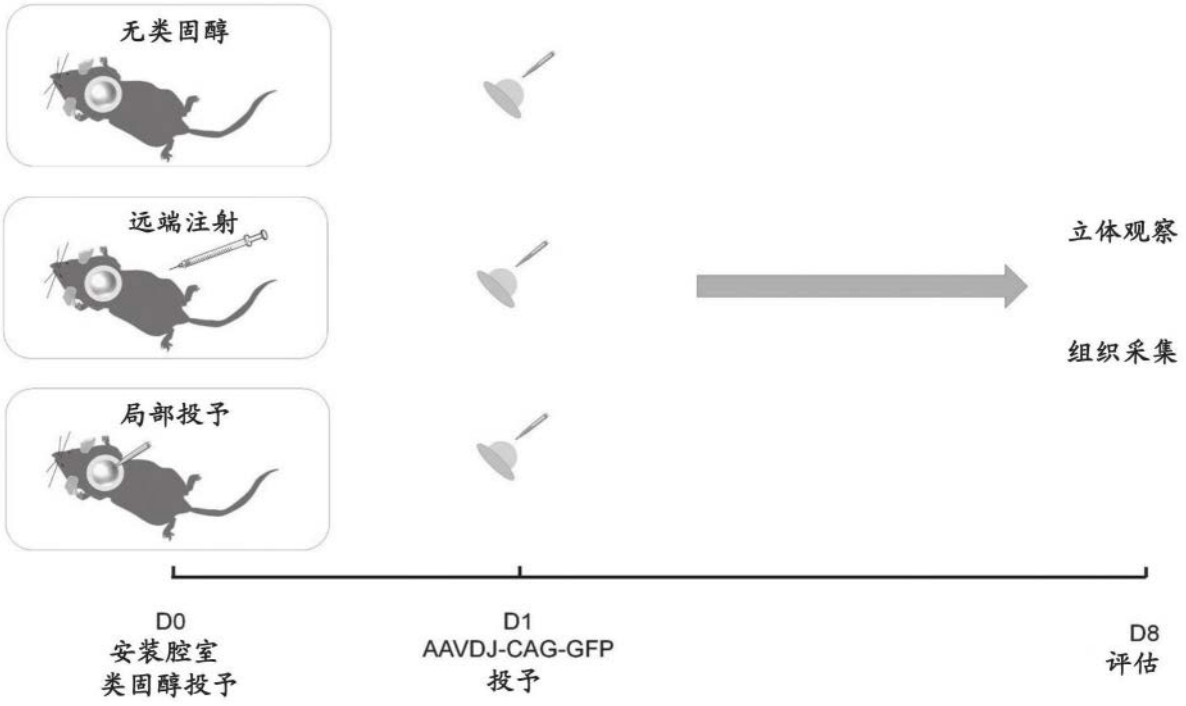

无类固醇
远端注射
局部投予
立体观察
组织采集
D0
安装腔室
类固醇投予
D1
AAVDJ-CAG-GFP
投予
D8
评估

图10

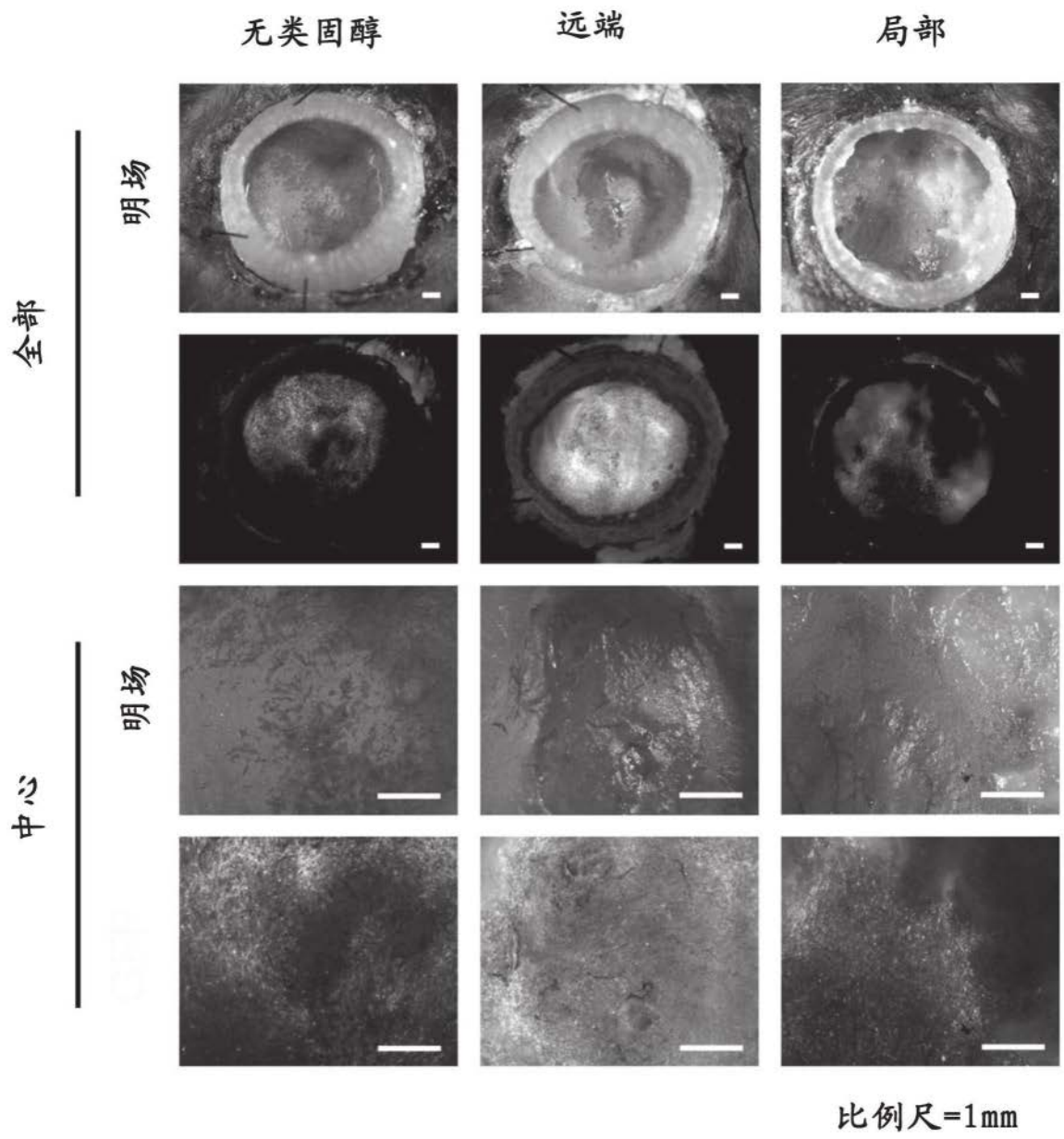


图11

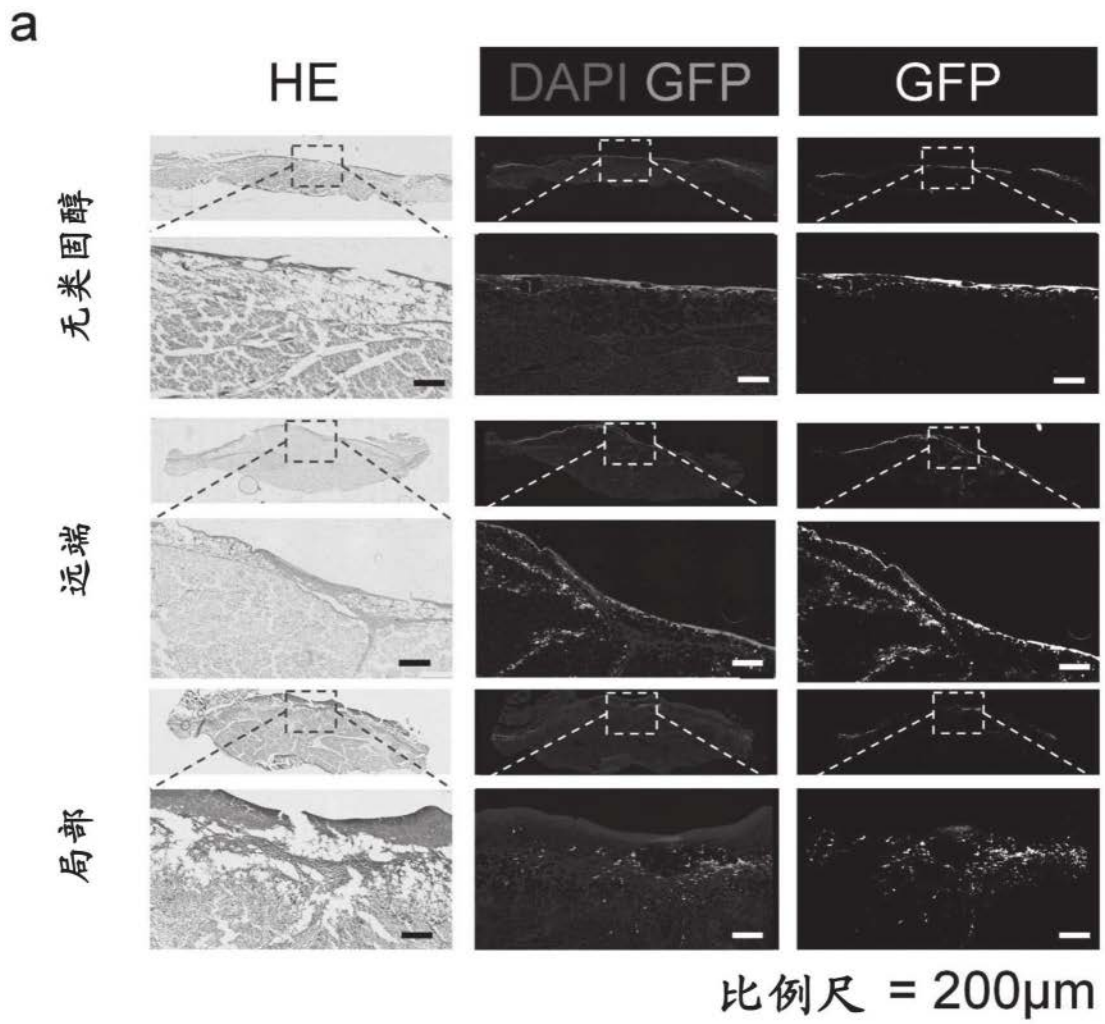

a
HE
DAPI GFP
GFP
无类固醇
远端
局部
比例尺 = 200μm
b
总数
P<0.05
1000
0
无类固醇
远端
局部
c
皮下
+
肌肉
P<0.05
P<0.01
1000
0
无类固醇
远端
局部

图12

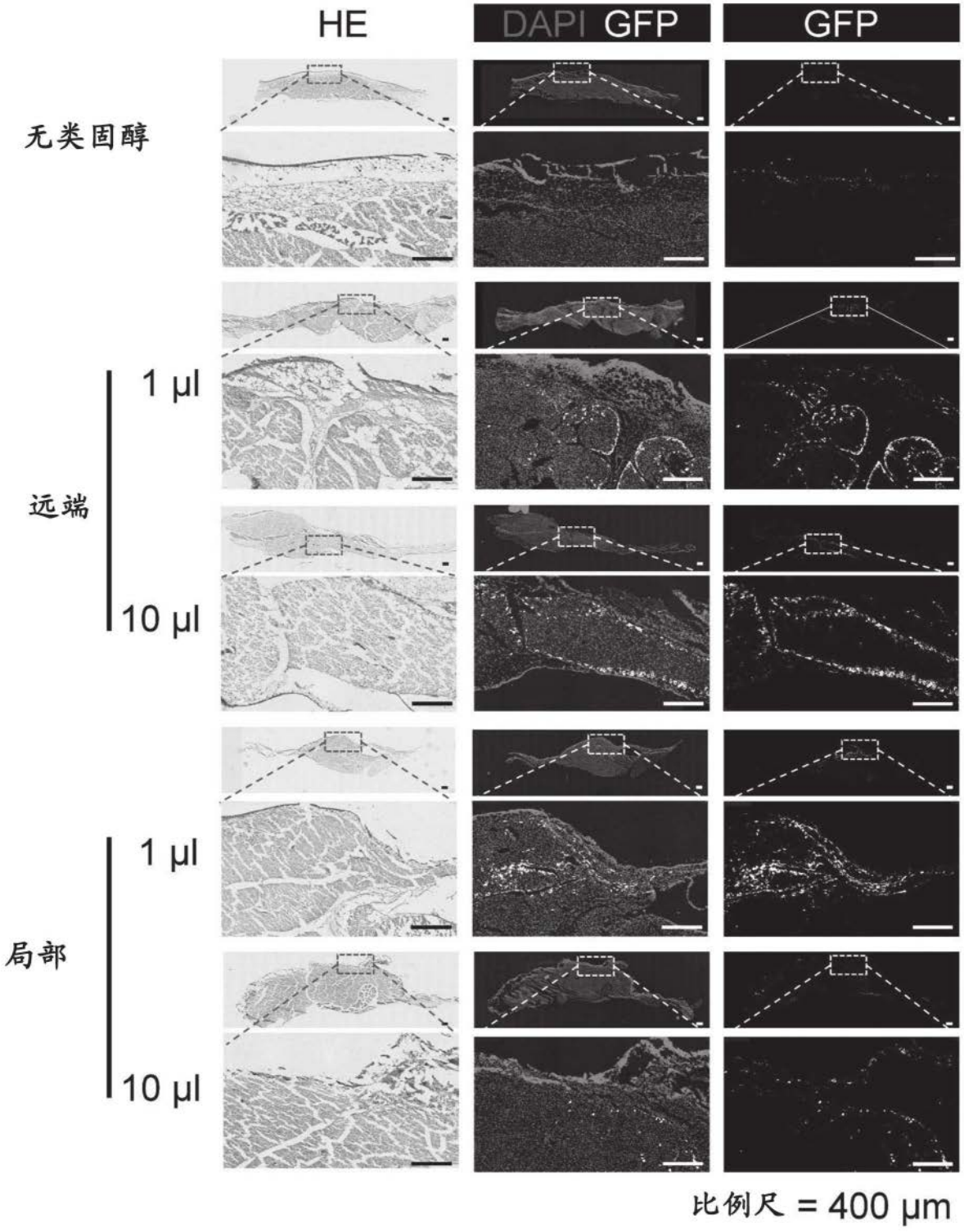


图13

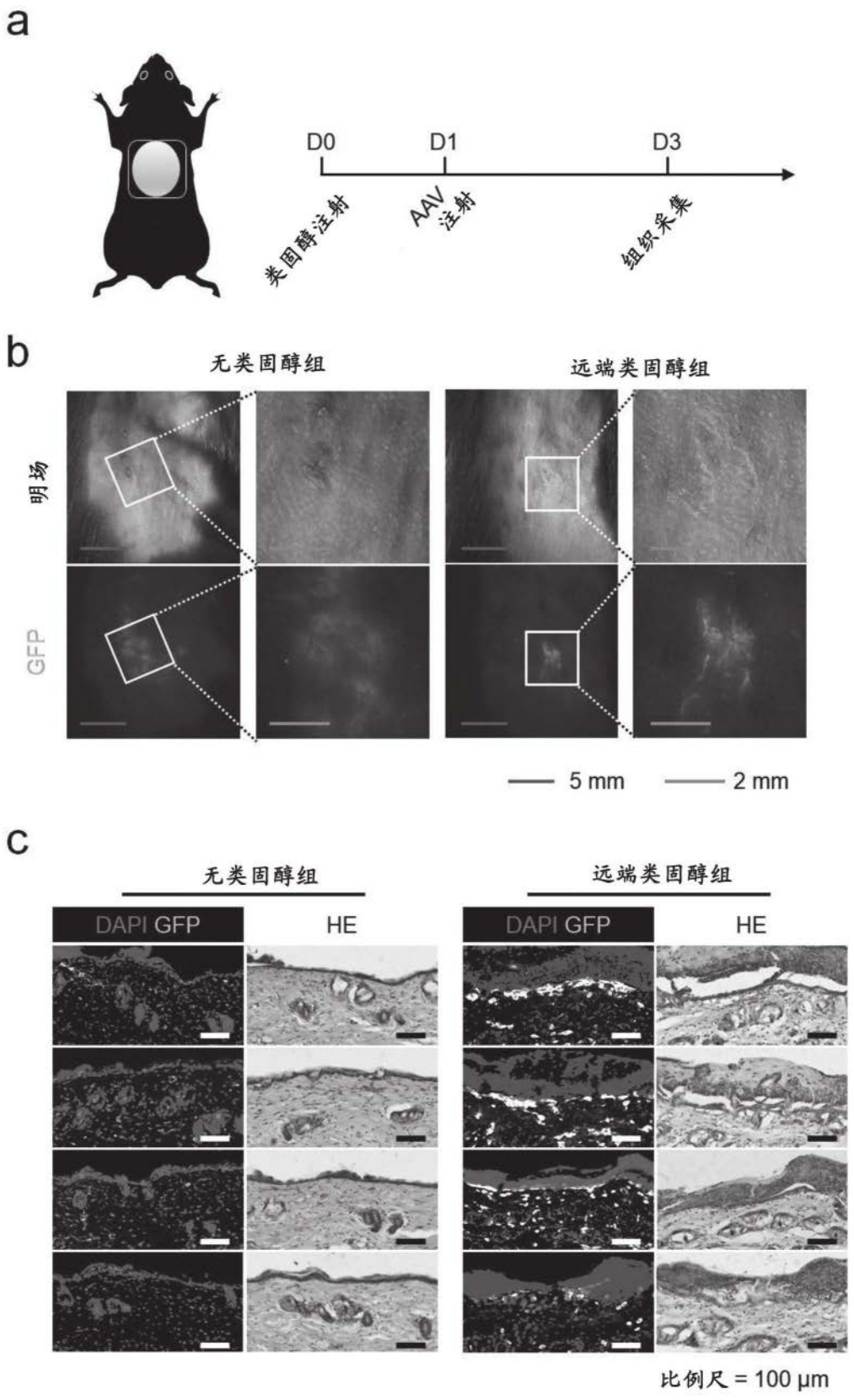

a
D0
D1
D3
类固醇注射
AAV 注射
组织采集
b
无类固醇组
远端类固醇组
明场
GFP
5 mm
2 mm
c
无类固醇组
远端类固醇组
DAPI GFP
HE
DAPI GFP
HE
比例尺 = 100 μm

图14

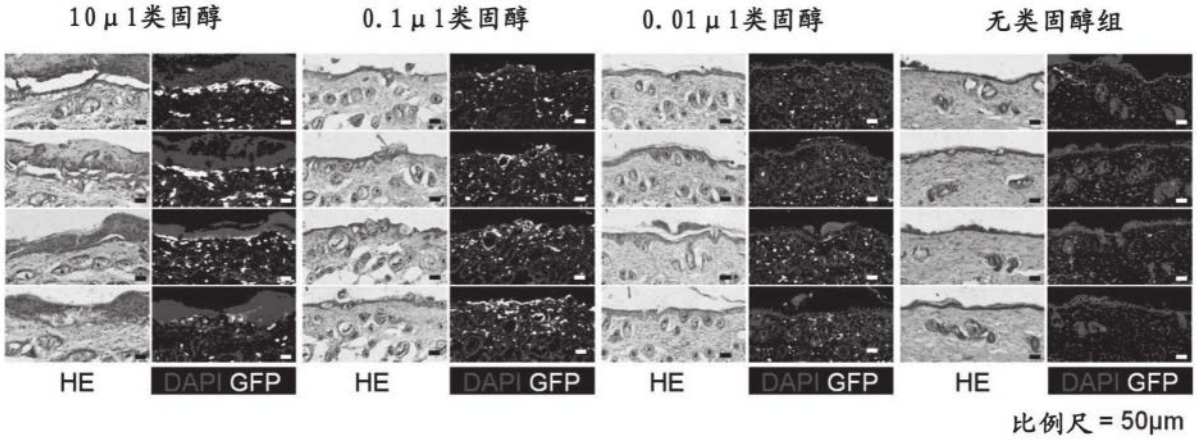

10μ1类固醇
0.1μ1类固醇
0.01μ1类固醇
无类固醇组
HE
DAPI GFP
HE
DAPI GFP
HE
DAPI GFP
HE
DAPI GFP
比例尺 = 50μm

图15

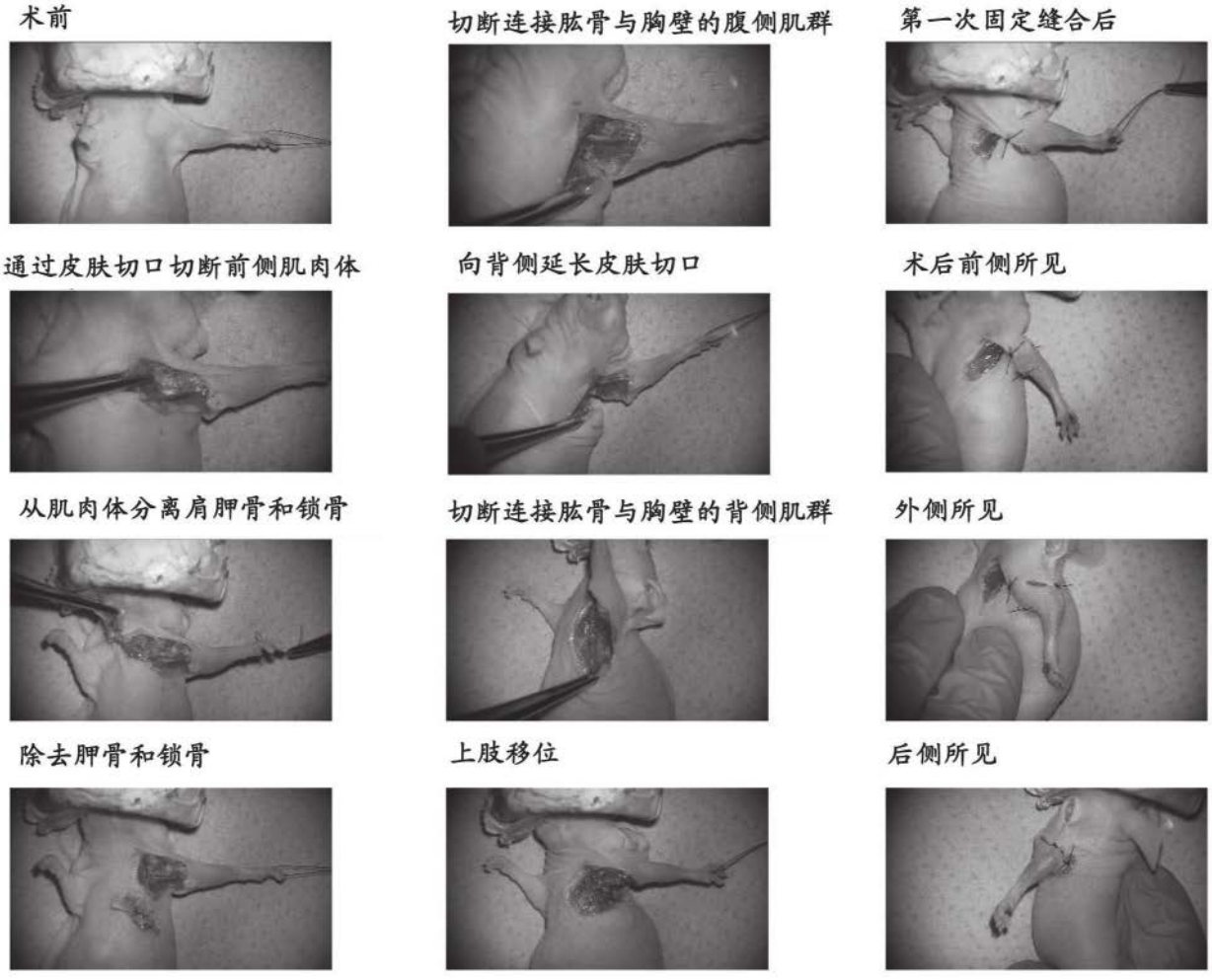

术前
切断连接肱骨与胸壁的腹侧肌群
第一次固定缝合后
通过皮肤切口切断前侧肌肉体
向背侧延长皮肤切口
术后前侧所见
从肌肉体分离肩胛骨和锁骨
切断连接肱骨与胸壁的背侧肌群
外侧所见
除去胛骨和锁骨
上肢移位
后侧所见

图16

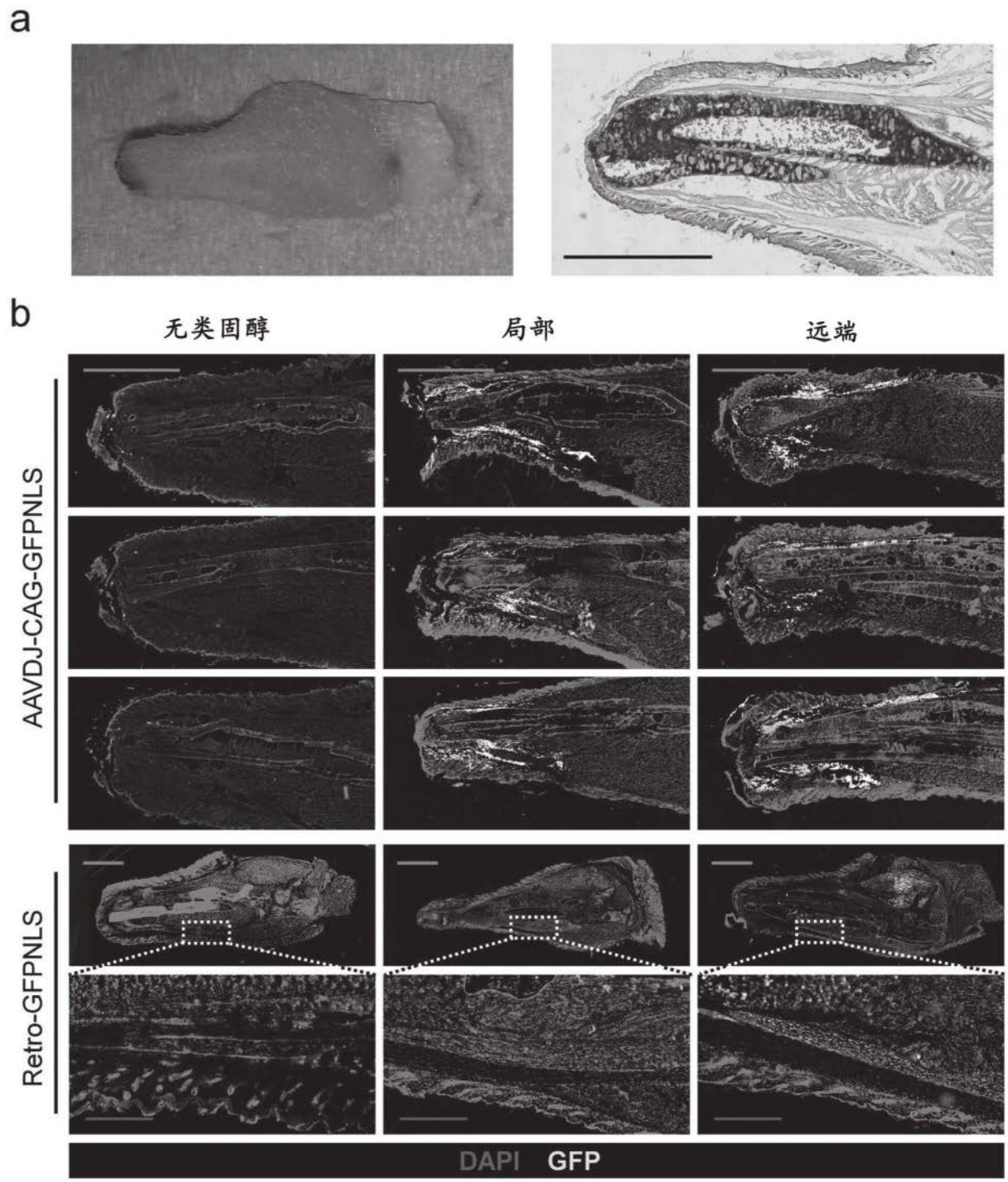


图17

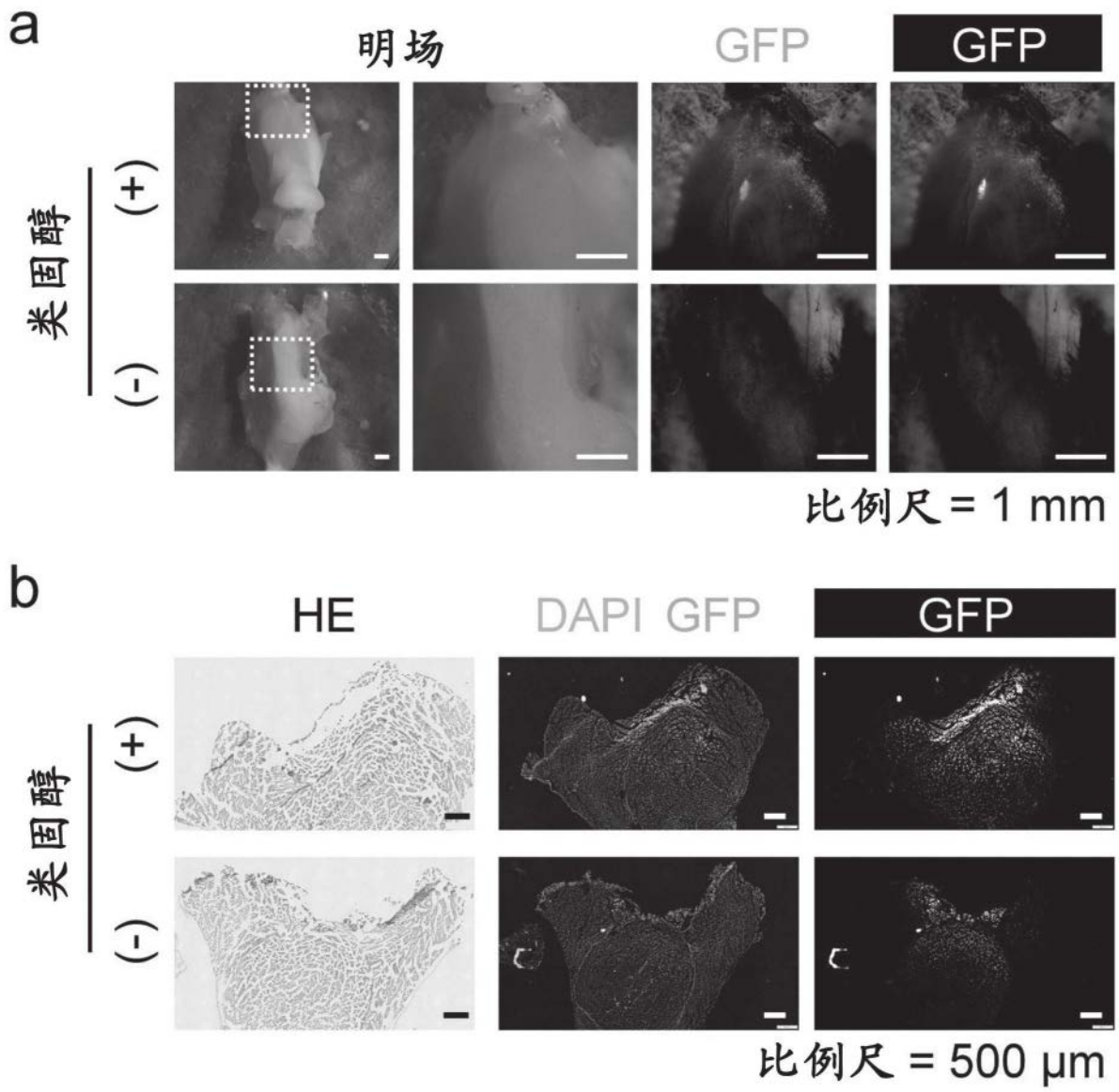


图18

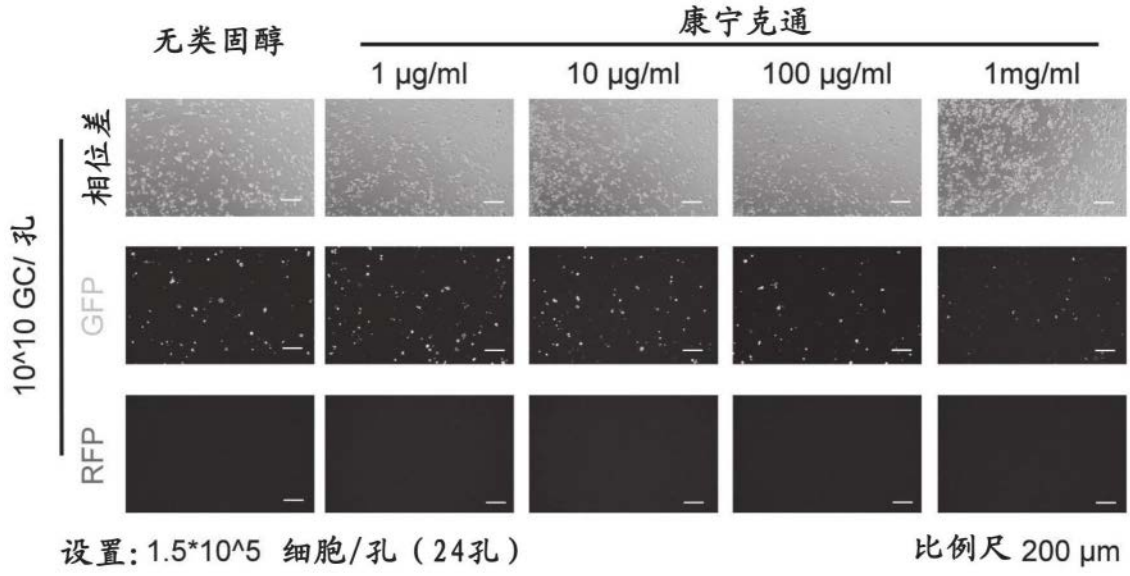

无类固醇
康宁克通
1 μg/ml
10 μg/ml
100 μg/ml
1mg/ml
10^10 GC/ 孔
相位差
GFP
RFP
设置：1.5*10^5 细胞/孔（24孔）
比例尺 200 μm

图19

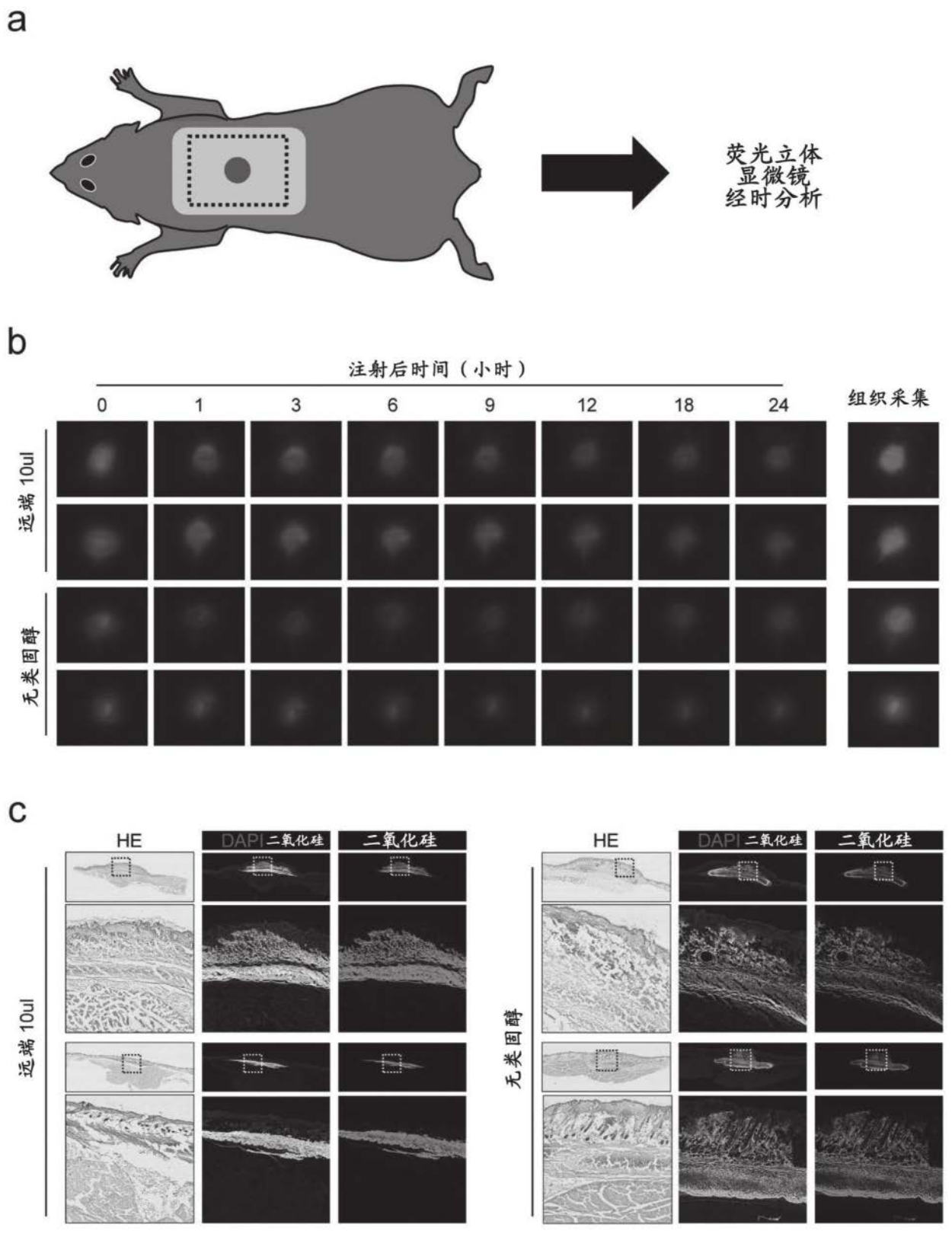

a
荧光立体
显微镜
经时分析
b
注射后时间（小时）
0
1
3
6
9
12
18
24
组织采集
远端 10ul
无类固醇
c
HE
DAPI 二氧化硅
二氧化硅
远端 10ul
无类固醇

图20

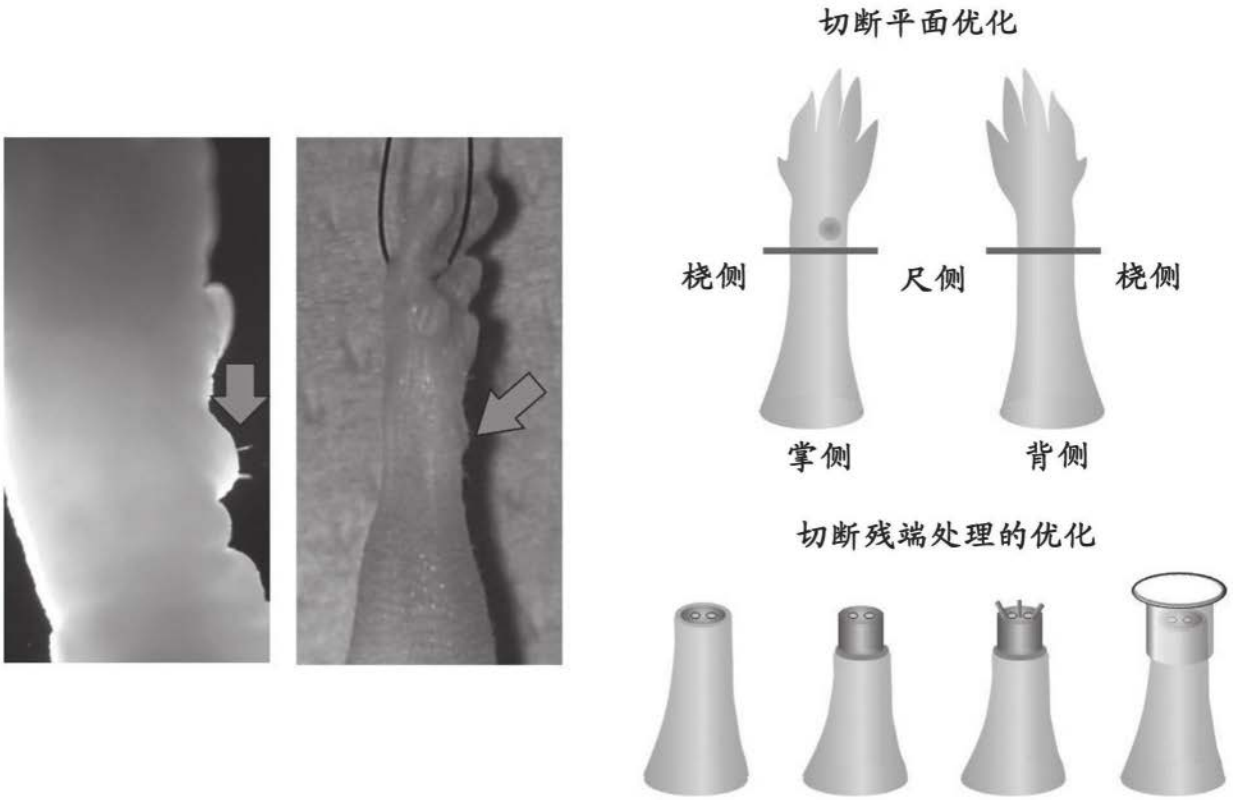

切断平面优化
桡侧
尺侧
桡侧
掌侧
背侧
切断残端处理的优化

图21

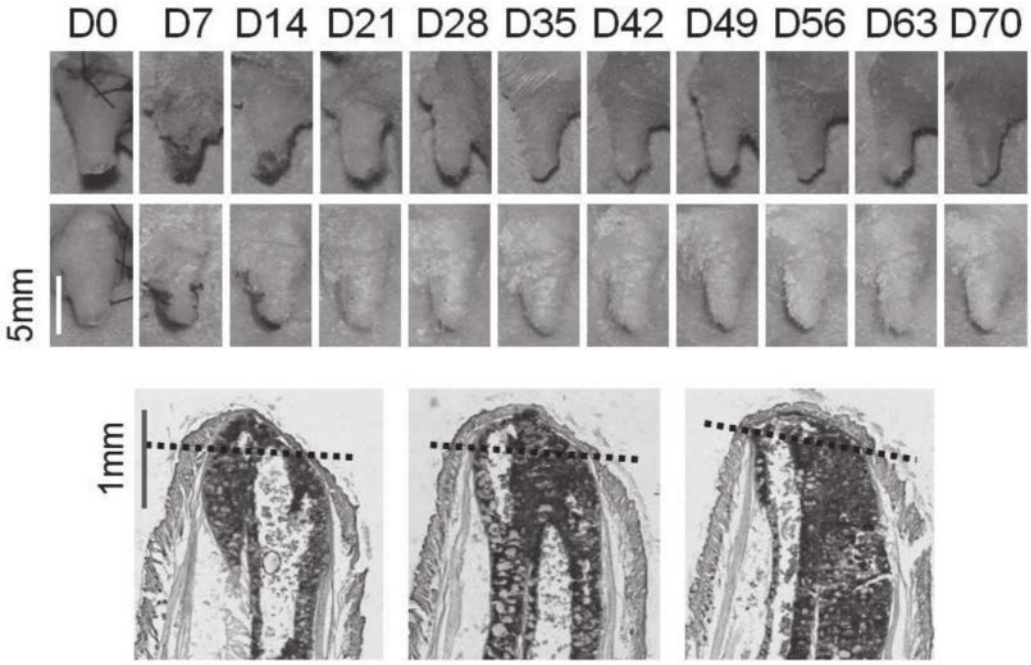

D0
D7
D14
D21
D28
D35
D42
D49
D56
D63
D70
5mm
1mm

图22

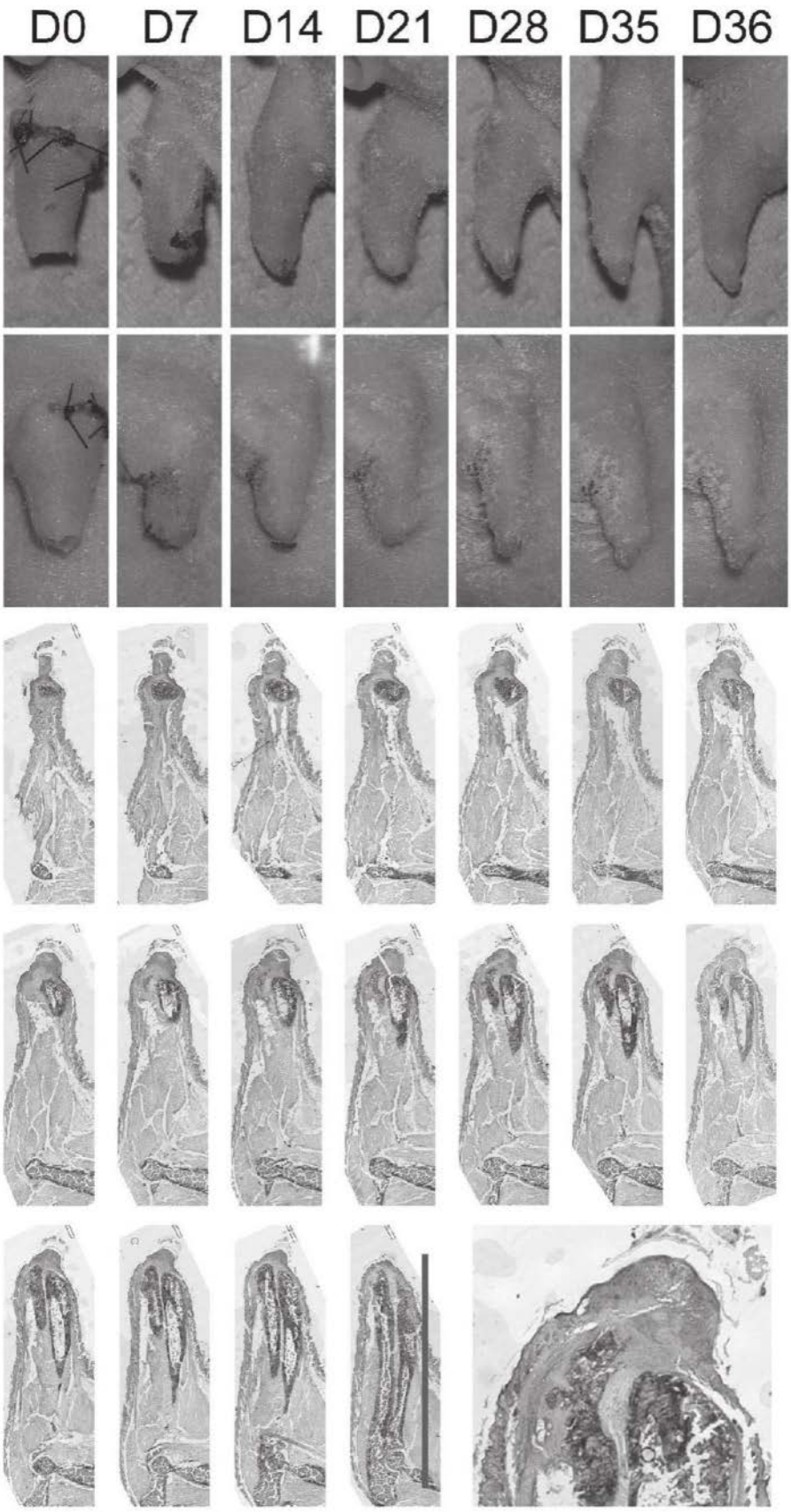


图23

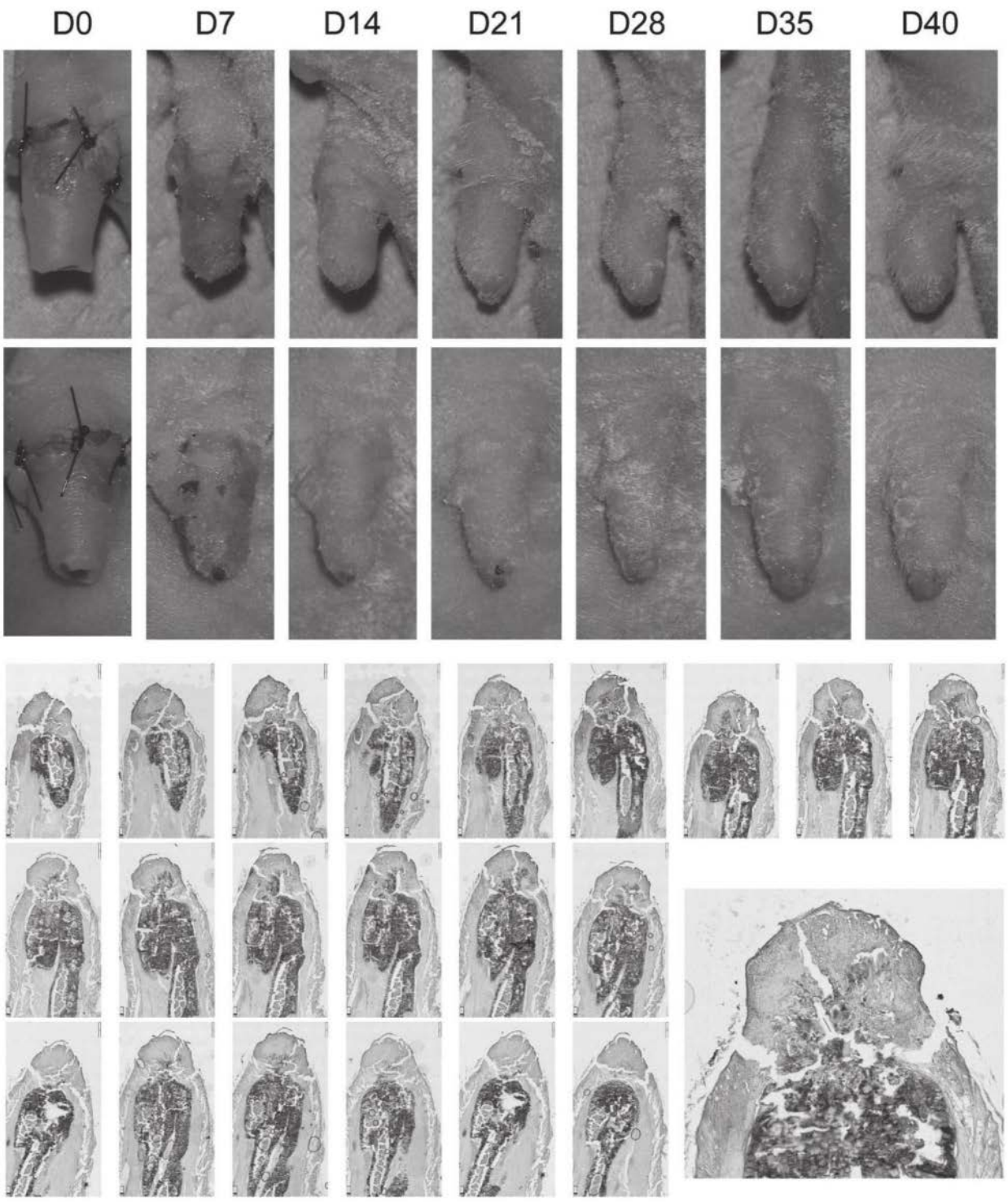


图24

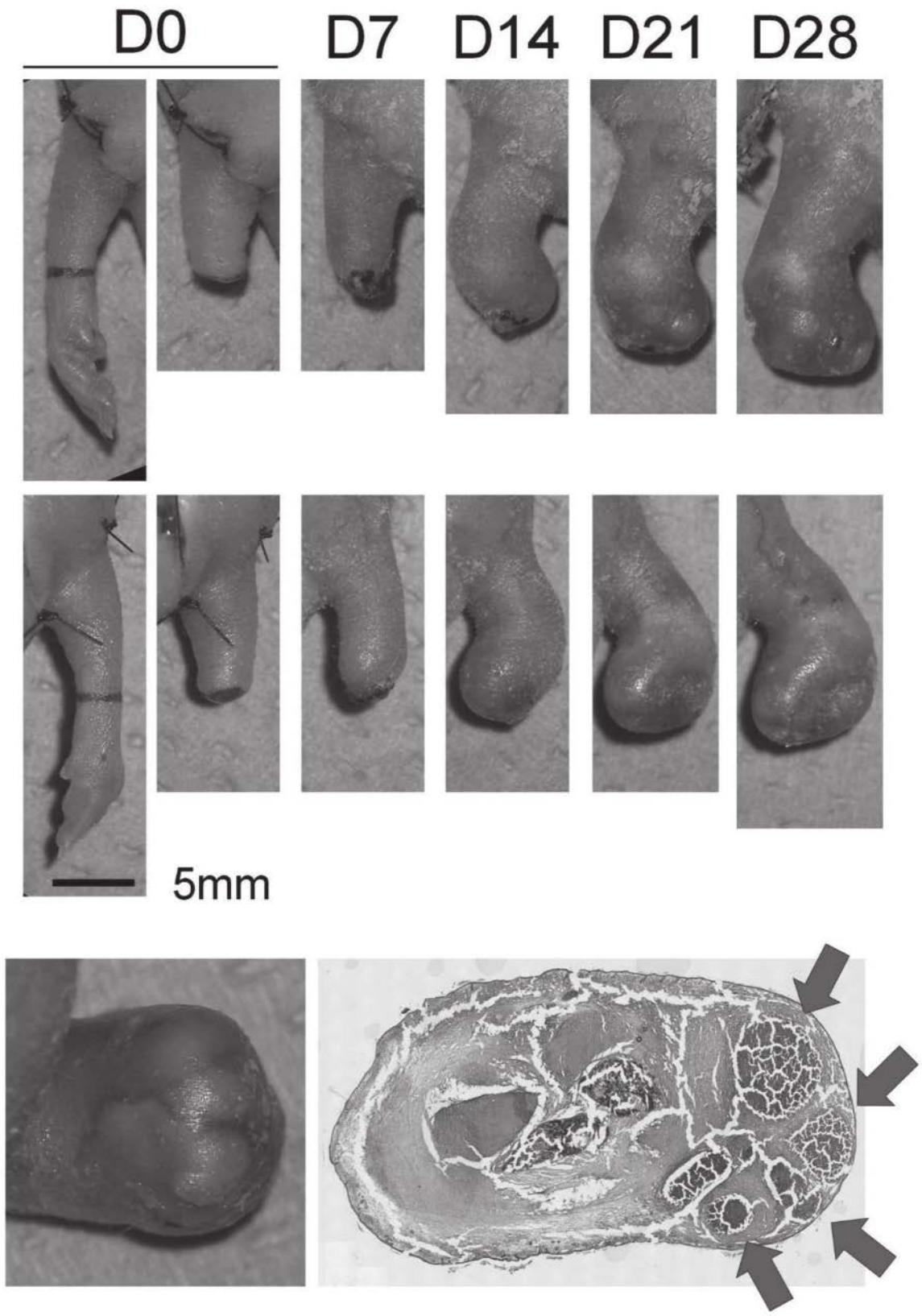


图25

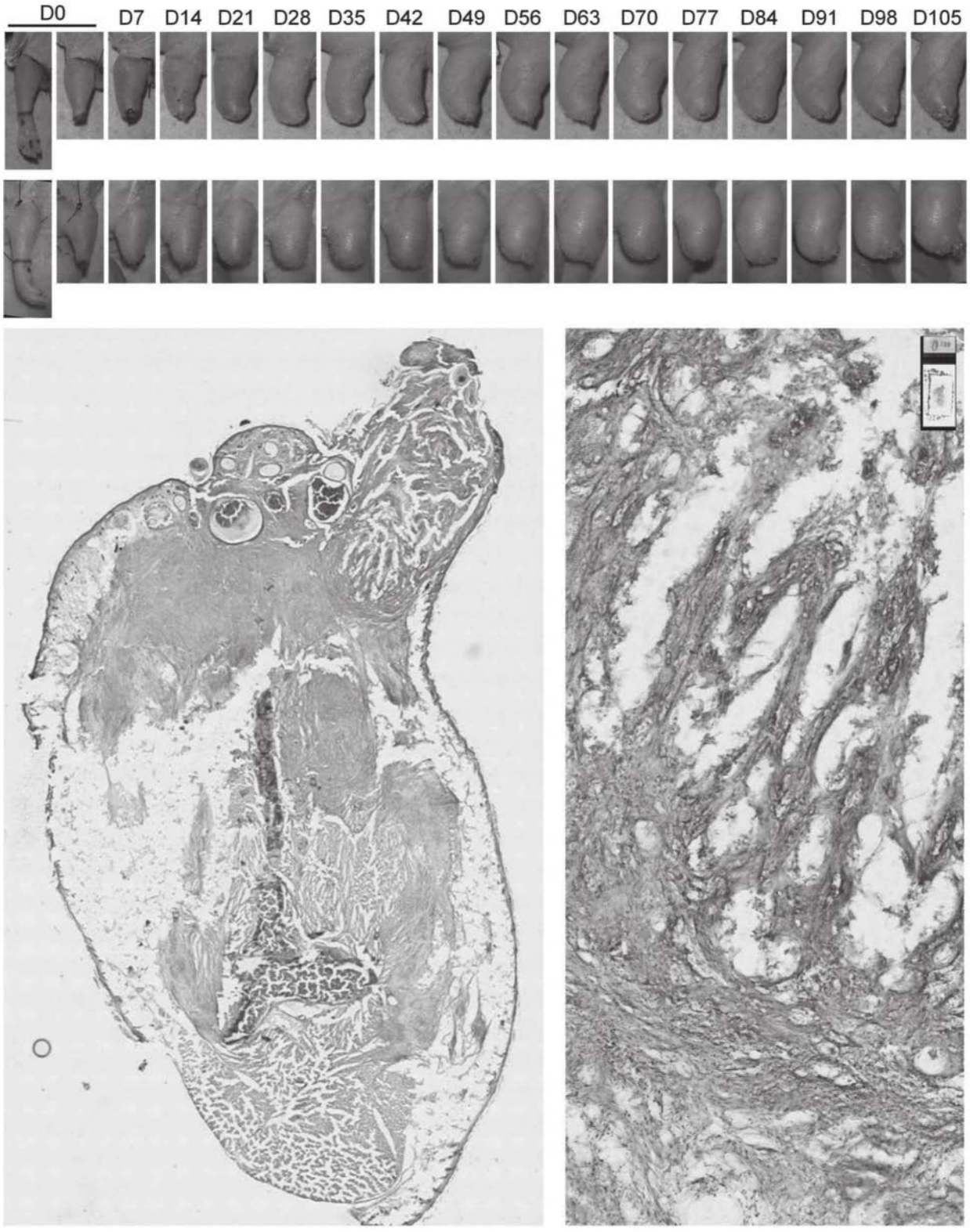


图26

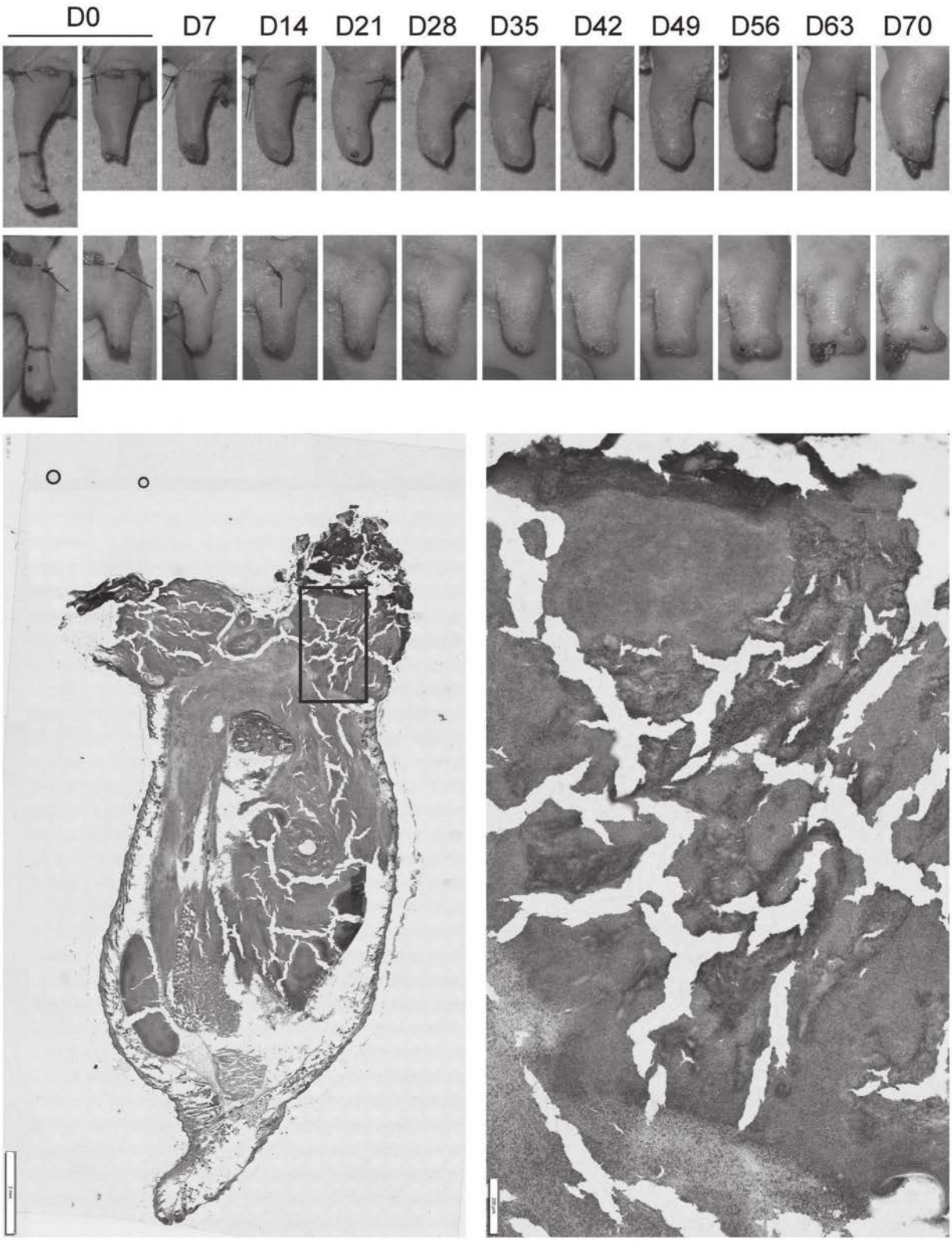


图27

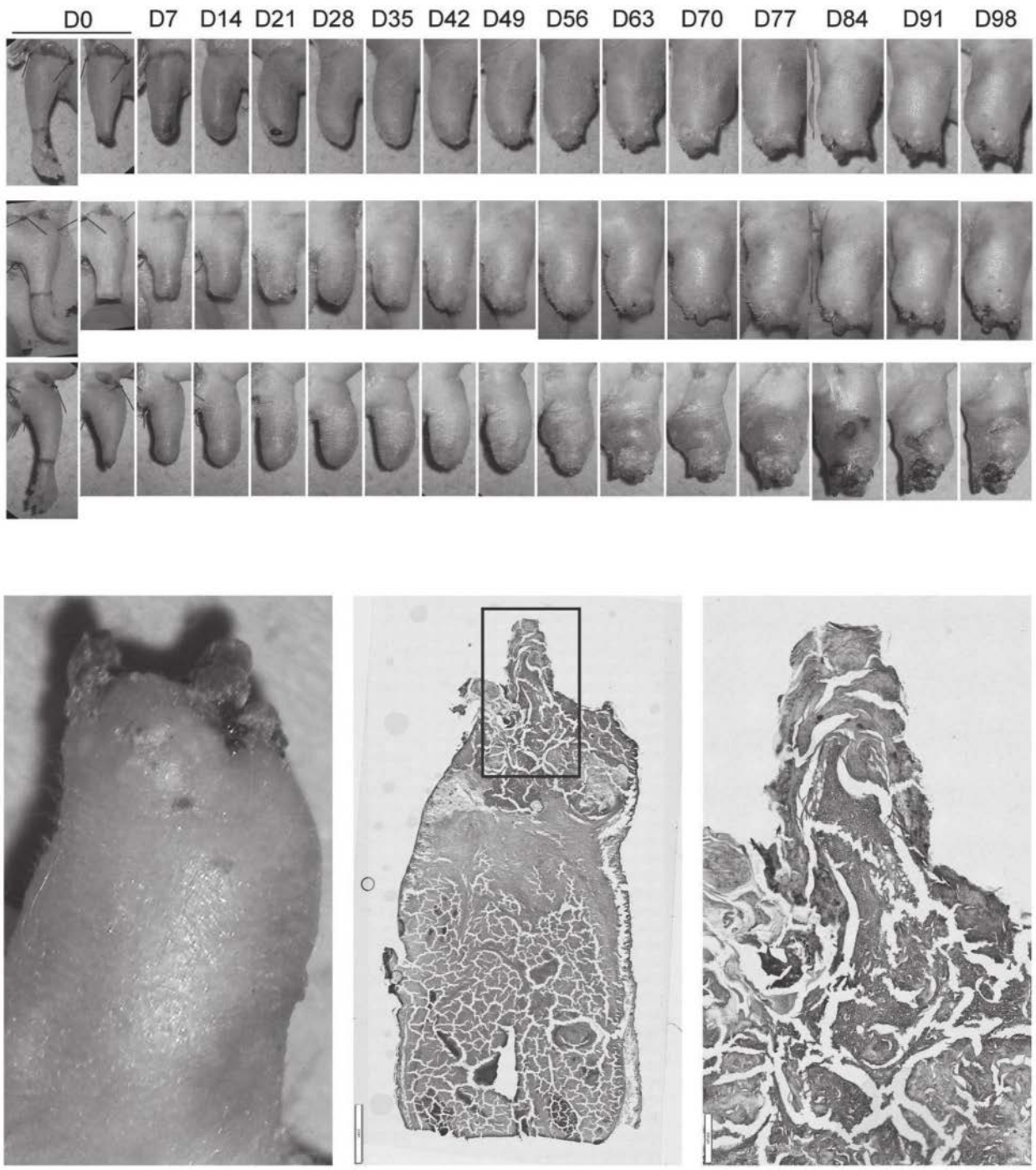


图28

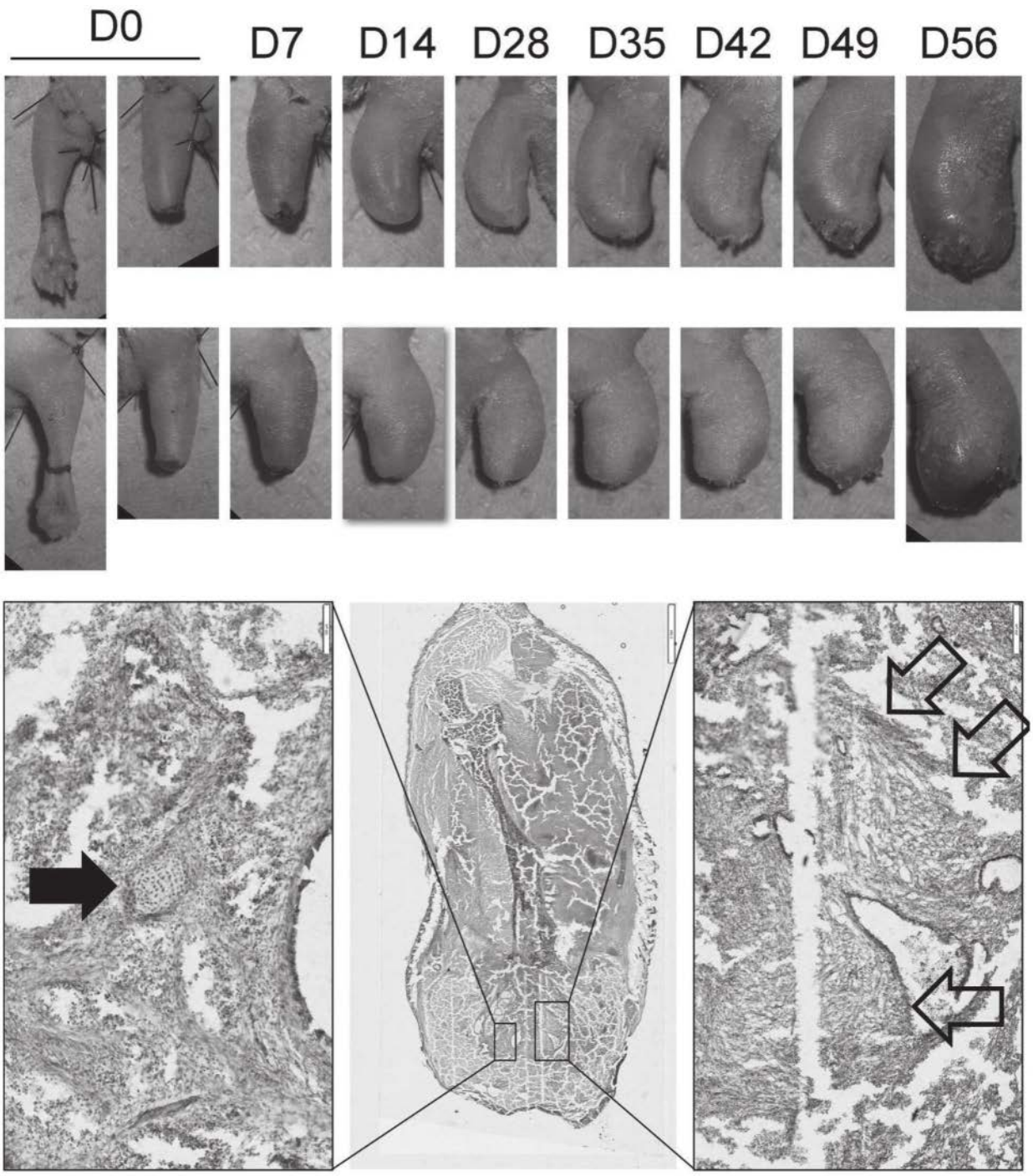


图29

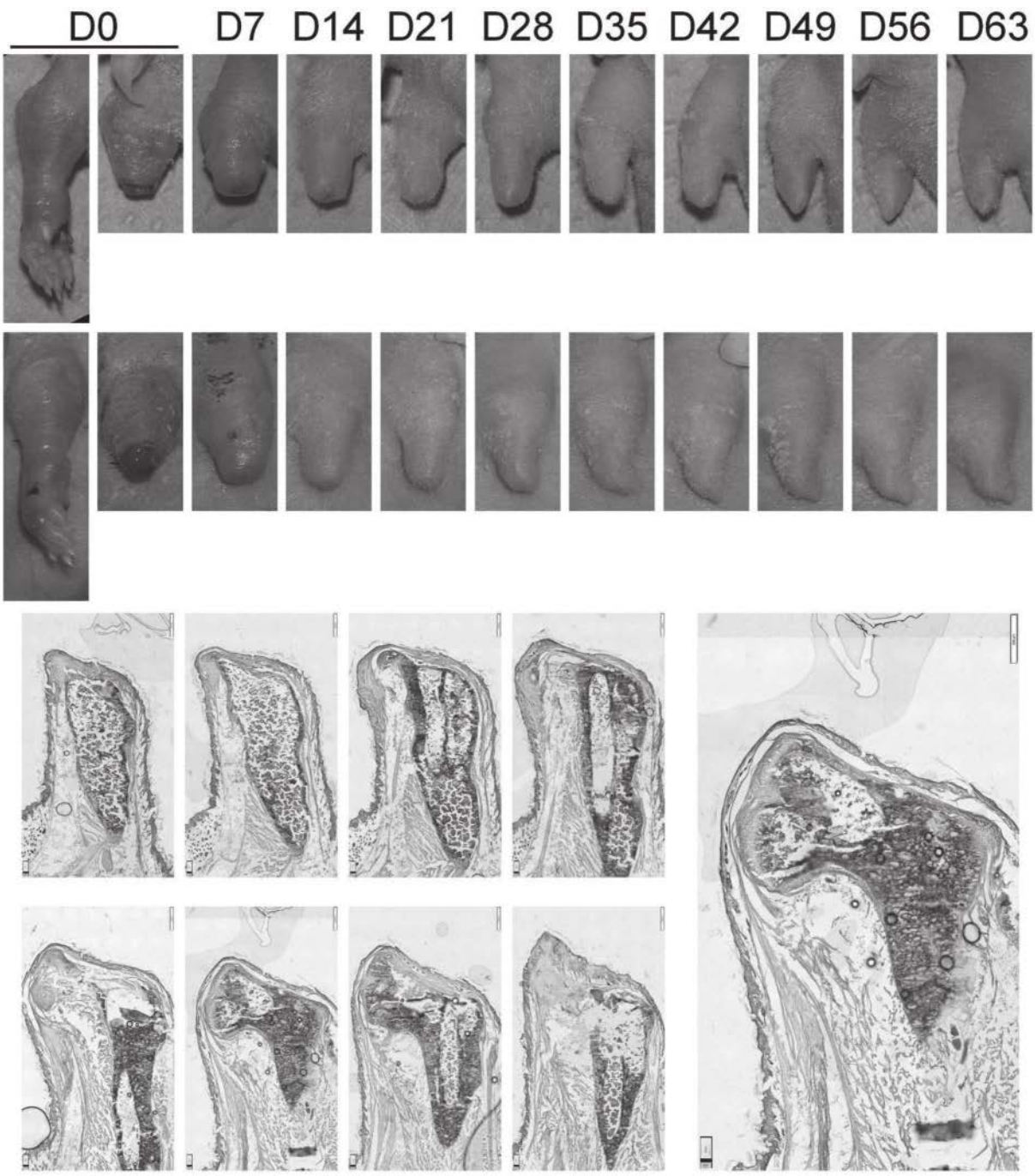


图30

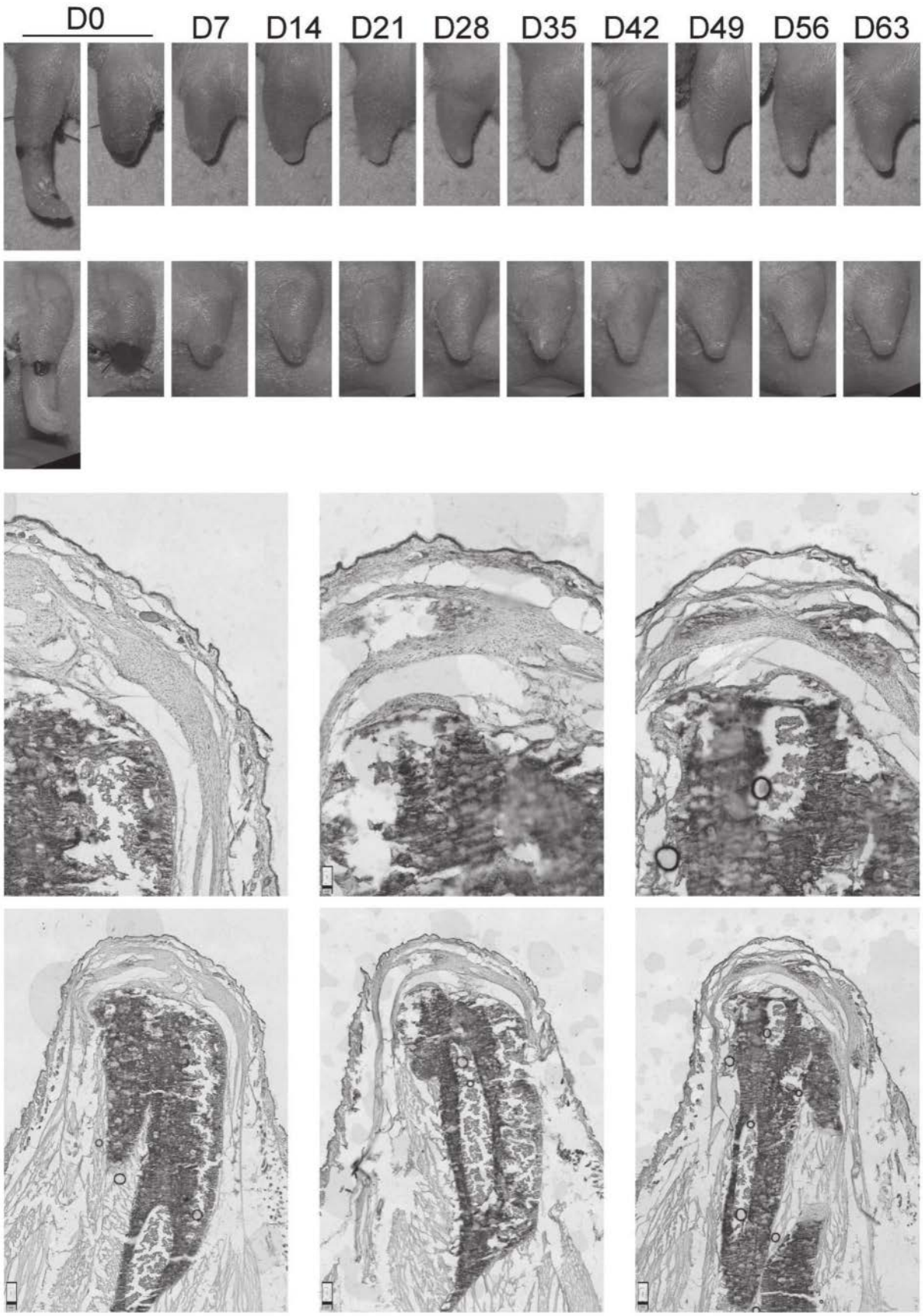


图31

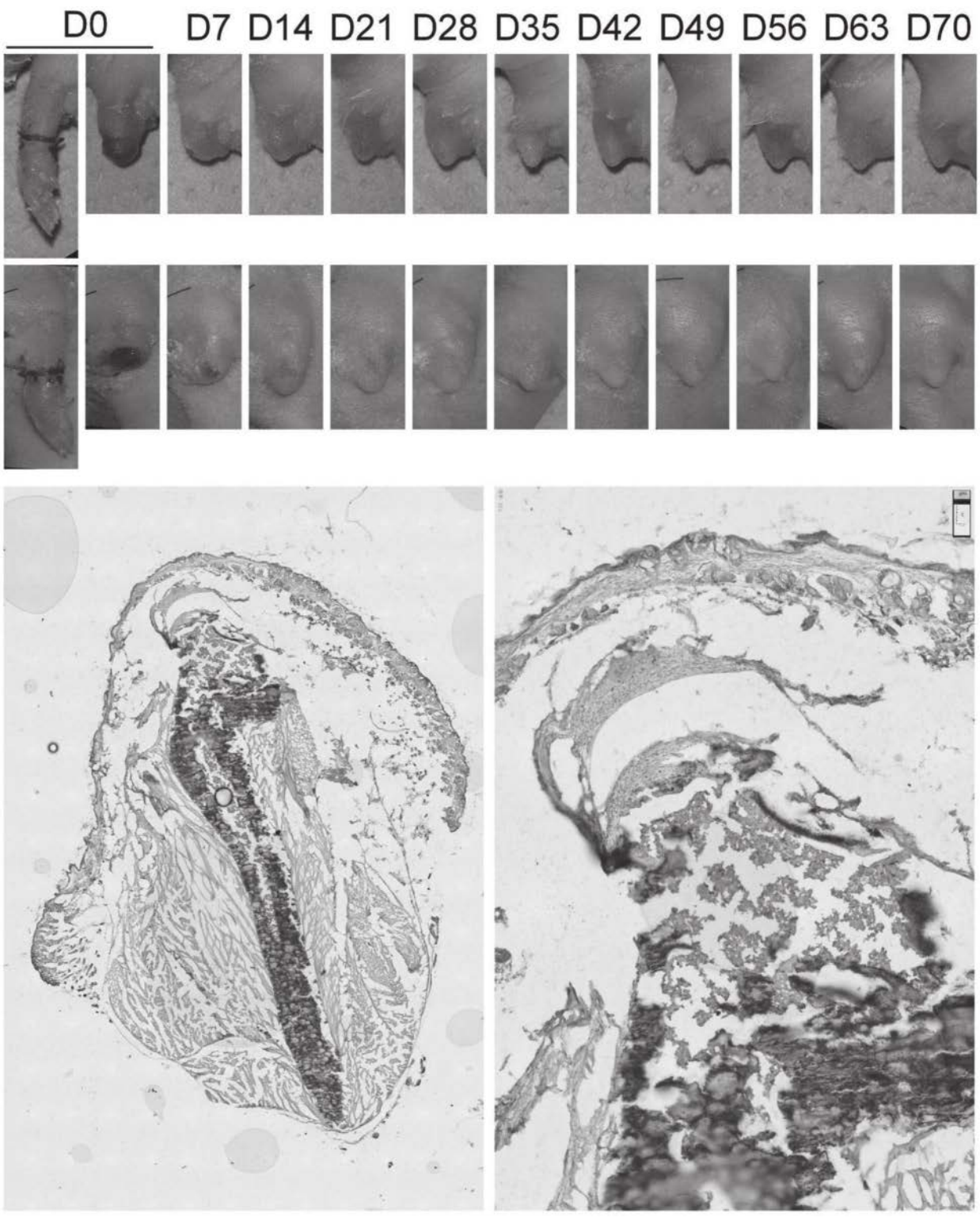


图32

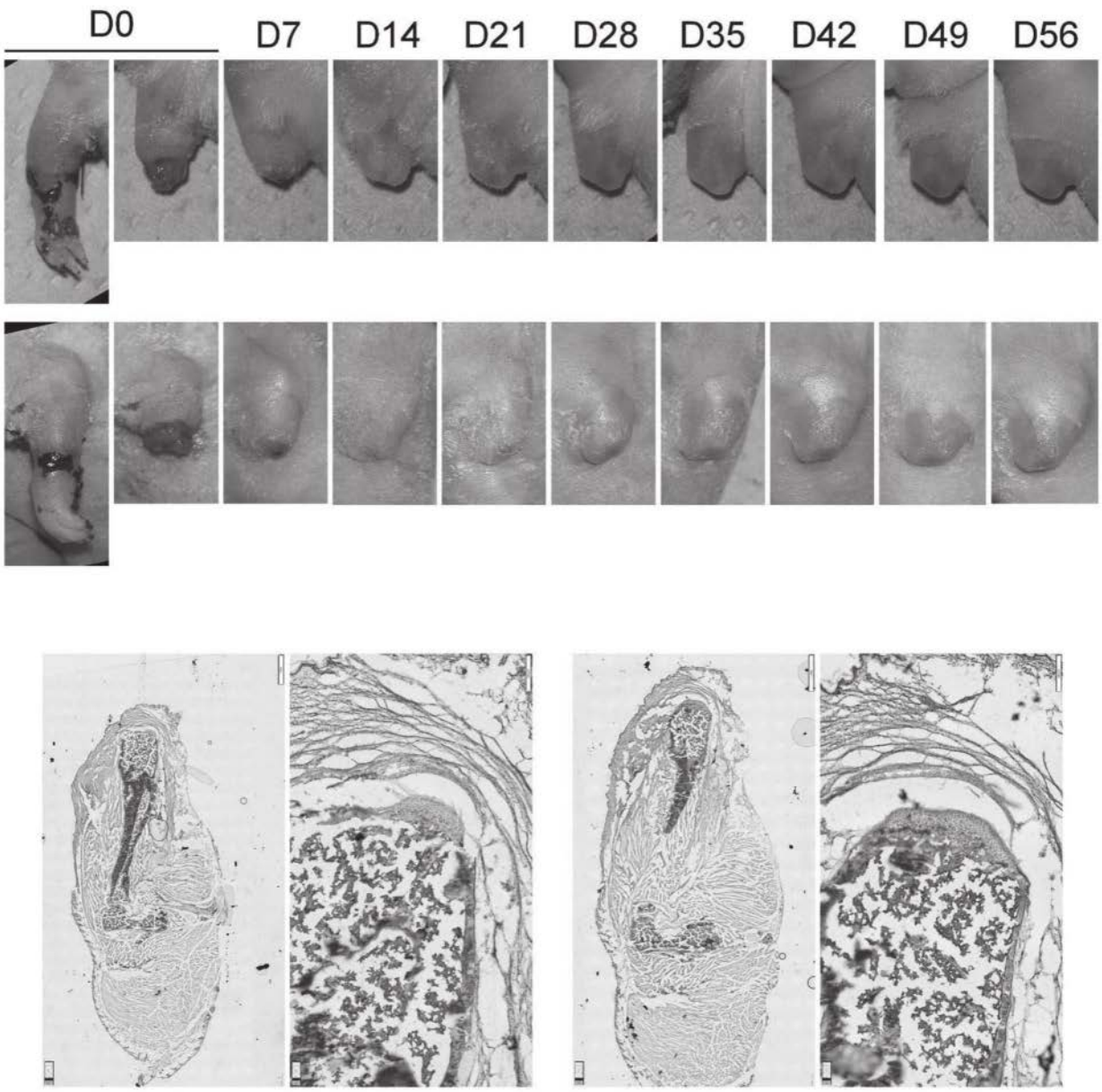


图33

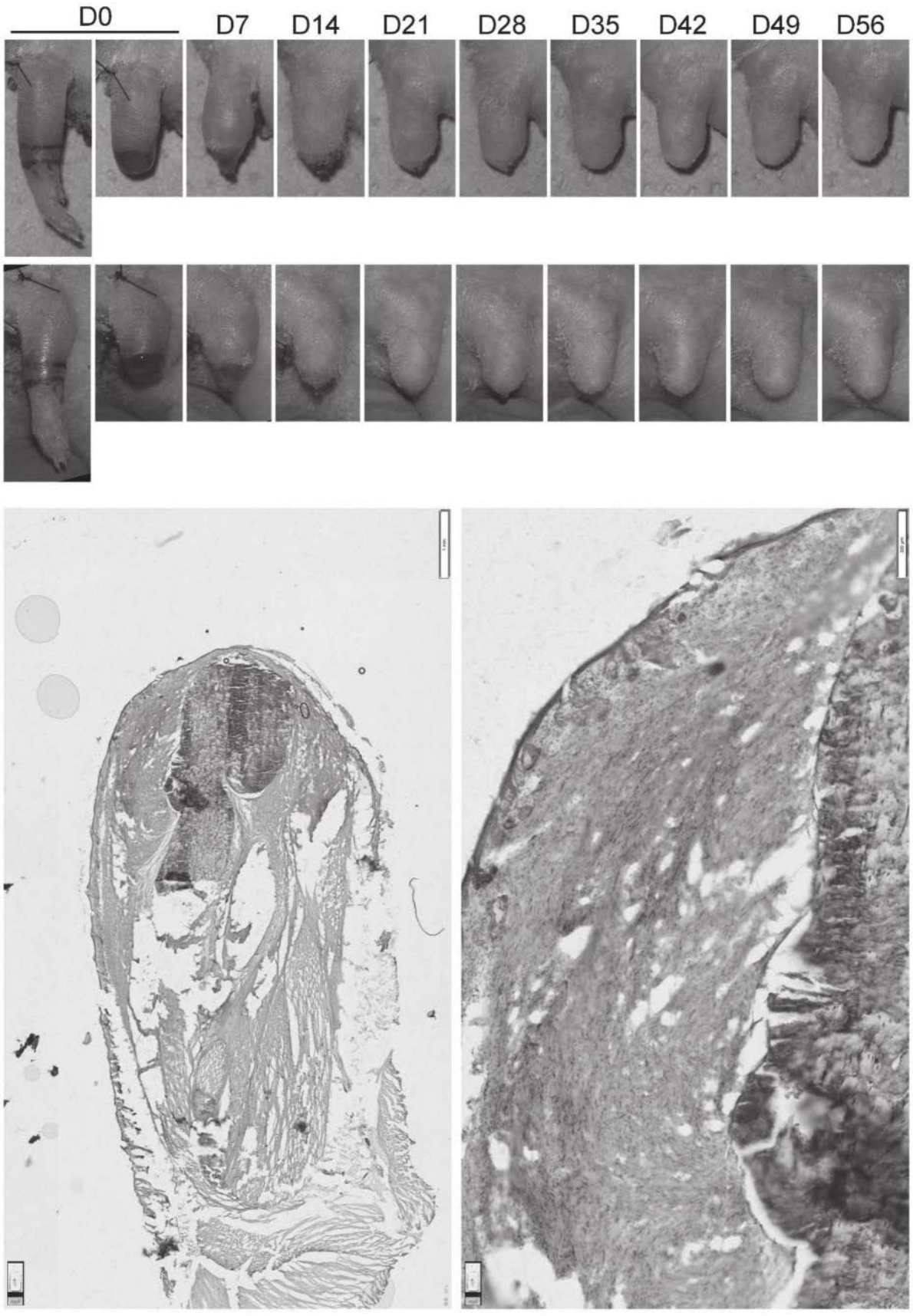


图34

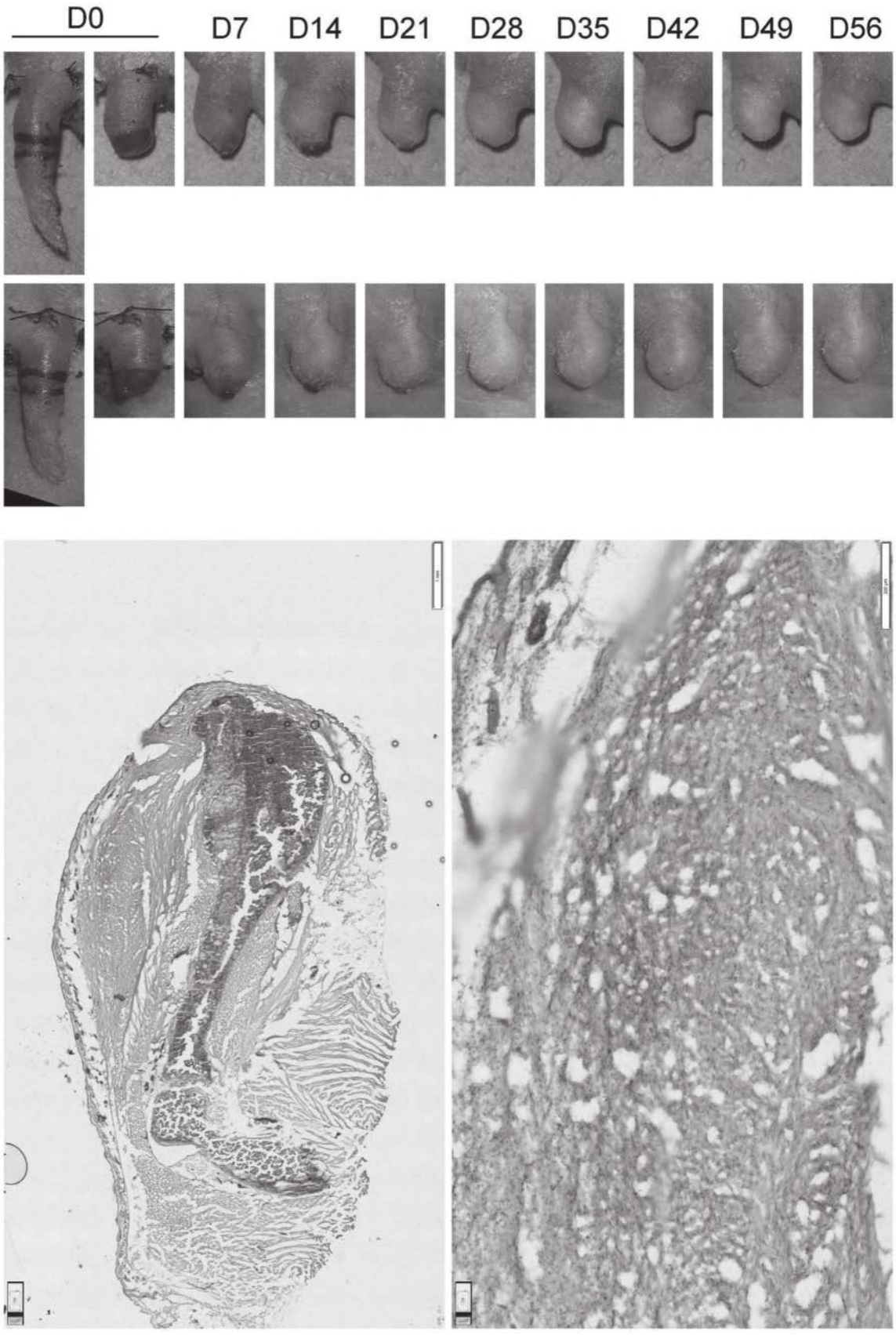


图35

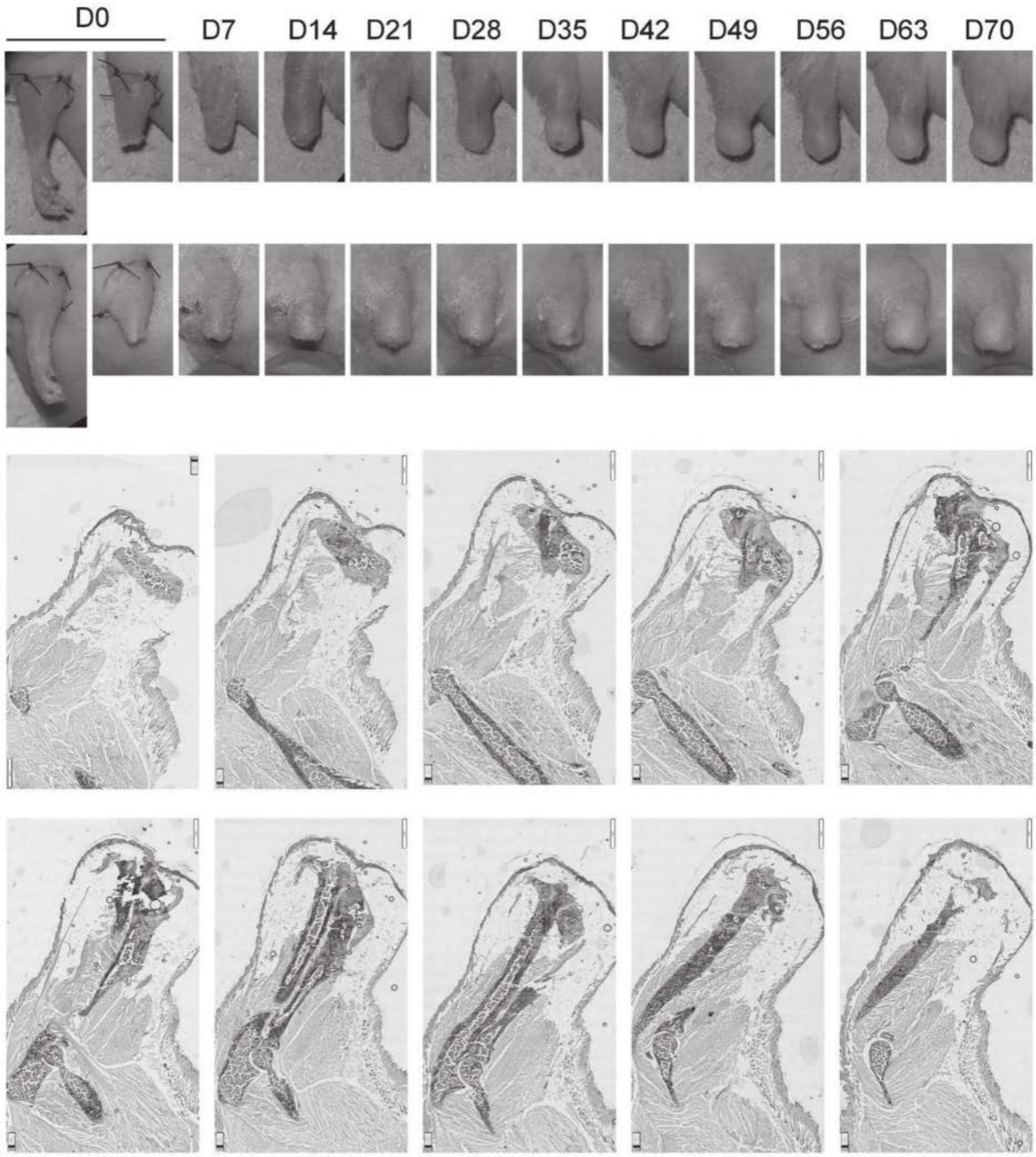


图36