

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3765103号

(P3765103)

(45) 発行日 平成18年4月12日(2006.4.12)

(24) 登録日 平成18年2月3日(2006.2.3)

(51) Int. Cl.

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願平5-514679
 (86) (22) 出願日 平成5年3月1日(1993.3.1)
 (65) 公表番号 特表平7-504322
 (43) 公表日 平成7年5月18日(1995.5.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1993/000417
 (87) 国際公開番号 W01993/017118
 (87) 国際公開日 平成5年9月2日(1993.9.2)
 審査請求日 平成12年2月25日(2000.2.25)
 (31) 優先権主張番号 9204350.4
 (32) 優先日 平成4年2月28日(1992.2.28)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 9208489.6
 (32) 優先日 平成4年4月16日(1992.4.16)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者
 シンジェニックス・リミテッド
 イギリス、ケンブリッジ シービー3 O
 ビーエル、ハンティンドン・ロード、マウ
 ント・プレゼント 2番、マウント・プレ
 ズント・ハウス
 (74) 代理人
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人
 弁理士 手島 孝美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MPMV及びH1Vに基づく欠損パッケージング非オンコウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

MPMV(メイソン-ファイザーサルウイルス)蛋白を生成することができ、かつ、ヌクレオチド348~365位にあるMPMVプライマー結合部位とヌクレオチド475~480位にあるMPMV5'主要スプライスドナーの間のパッケージングヌクレオチドが欠失しているベクターであって、MPMV RNAをパッケージングすることができないベクター。

【請求項2】

欠失が配列ID No. 1の塩基51ないし112を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項3】

欠失が配列ID No. 1を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項4】

MPMVゲノムのプロモーター部分に対応する配列および/または他のゲノムのポリ阿德ニル化配列を含むが、MPMV長末端繰り返し配列に対応する配列を含まない、請求項1~3のいずれかに記載のベクター。

【請求項5】

MPMV蛋白の発現がenvの上流で可能である、請求項1~4のいずれかに記載のベクター。

【請求項6】

さらにマーカー遺伝子を含む、請求項5に記載のベクター。

10

20

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明はベクター及び遺伝子転移でのそれらの用途に関する。ベクターは、レトロウイルスに基づき、それゆえ、それらはそれら自身のRNAをパッケージできず、そして例えば体細胞遺伝子治療用に外来遺伝子を転移するための感染因子として用いることができる。

発明の背景

レトロウイルスは幾つもの方法で分類される。それらは、それらの形態に基づいて種々のグループに分けられる。それらのグループは、A、B、C及びD型ウイルスである。それらは又、3のつ亜科、即ち、オンコウイルス、スプマウイルス及びレンチウイルスの一つに属するように分類される。

メイソン・ファイザースルウイルス(MPMV)は、アカゲザルの乳癌組織中に最初に発見されたD型レトロウイルスである。これ並びにそのオンコウイルス亜科への分類にもかかわらず、それは、確認されたオンコジンを含有せず、それがオンコジン可能性を有するという証拠はない。

D型ウイルスは、他のレトロウイルス科、例えばC型ウイルスと区別される。

後者は、細胞膜でのカプシド組立てにより特徴付けられ、レンチウイルス群のウイルス、他とえばヒト免疫不全ウイルス(HIV)を含む。形態学的に、それらのコア構造で、D型ウイルスは、又、B型ウイルス、例えばマウス乳癌ウイルス(MMTV)と異なる。即ち、D型ウイルスは、これらの他の型と完全に異なり、この差異の例のように、それらはICAPの細胞膜への輸送を促進するそれらの組立てICAPでのアミノ酸シグナル配列の形成に特異的シグナルを有する。この理由その他から、それらはユニークなcis及びtrans作用調整シグナルを有する別の群と考えなければならない。MPMPは、又、ヒト補体システムを活性化するウイルスエンベロープの能力によりC型ウイルスと区別される。このことは、ウイルスの溶解に導く。

レトロウイルスは、感染宿主細胞のゲノムに組込まれるDNAプロウイルス中間体を経て増殖するRNAウイルスである。ビリオン粒子は正のストランドゲノムRNA分子の二量体を含む。このゲノムRNAは、宿主RNAポリメラーゼIIによりプロウイルスDNAから転写された完全長種である。ウイルスのgag及びpol遺伝子をコード化するこれらの完全長RNAの部分は宿主細胞のリボゾームにより翻訳され、ビリオン粒子の生成に必要とされる構造及び酵素蛋白を生成する。プロウイルスは、又、エンベロープ蛋白をコードする種々の小さな単一及び多重スプライスマRNA、並びにより複合なレトロウイルスの場合、一群の調整蛋白を生ずる。ゲノム(及びサブゲノム)RNA分子は、5' m⁷G cap及びポリ

アデニル化3'テイルを有する細胞mRNAと構造的に類似する。一連の問題は、ゲノムRNAの成功したパッケージングに向けられなければならない。完全長RNAは、それがビリオンの次の産生のための遺伝情報の完全補体を運ぶ唯一のものであるから、スプライスされたウイルスメッセージを優先的にパッケージされなければならない。本ウイルスは、又多くの他のウイルスと異なり、レトロウイルスは一般に宿主RNA合成を抑制しないので、莫大な量と種々の物理的に類似する宿主細胞mRNAに対しゲノムRNAを特異的に選択しなければならない。パッケージされるべきゲノムRNAが認識され、それにより、一部が翻訳され、組立て部位に輸送されるのを保護するか、又は、翻訳後、直ちにコードしたgagプレカーサーポリ蛋白と結合する。最後に、3 - 4000 gagプレカーサー蛋白と関連した正しい数の遺伝子、適切な数の逆転写酵素分子、プロテアーゼ、tRNAプライマー及びある場合には、整調蛋白の多重コピーをパッケージしなければならない化学量論的問題がある。

このようにゲノムのパッケージングは、RNAの選択の特異性の問題及びRNA区画形成能力の考慮を引き起こす。

ウイルスは、ウイルスゲノムmRNA中のcis作用要素、即ち「パッケージングシグナル」の存在によりこれらの問題を解決する。自然発生及び実験室構築ウイルスミュータントに関する研究により、特異的配列がRNA認識及びカプシド化(encapsidation)にとって重要であることが明らかになった。リニアル等、セル 15、1371 - 1381(1978)、マン等、

10

20

30

40

50

セル 33, 153 - 159(1983)、ワタナベ等、P N A S U S A 79, 4986 - 5990(1979)及びW O - A - 9119798は、5'未翻訳リーダー配列での欠失は、それぞれ、ロウス肉腫ウイルス(R S V)、モロニイマウス白血病ウイルス(M o M L V)、脾壊死ウイルス(S N V)及びH I Vでのパッケージングに障害となることを開示する。

欠失ミュータントは、幾つかのレトロウイルスでのR N Aパッケージングに必要な配列を明らかにした。これらのあるものでは、パッケージングに十分な配列の程度も位置決定された。もしこの配列が異種R N Aに導入されると、理論的に、異種R N Aはレトロウイルス粒子によりカプシド化されるべきであるとの前提がパッケージングシグナル及びR N A二次構造の記載に潜在する。パッケージングに対する抑制は、パッケージングシグナル(P S I)に隣接する配列はP S Iを分裂させるもう一つの二次構造の形成を支持すべきでないという理論的なものを含む(これについて、マン等、ジャーナル・オブ・バイロロジィ 54, 401 - 407(1985)がある詳細な証拠を提供する)。加えてパッケージされたR N Aの全長は一定の大きさのR N Aをパッケージするウイルスの能力により物理的に限定される。H I Vでは、異種遺伝子を含むプロウイルス構造物は、ターウイリガー等、R N A S U S A 86, 3857 - 3861(1989)により、生成されたウイルスR N Aの全長が元のウイルスのそれよりも有意に超える場合、複製欠損させることが明らかになった。複製欠損はR N Aパッケージングの解読効率と一致する。

さらに、それらのカプシド化配列の性質及び部位で、異なるウイルス間に有意な特異性がある。R N A認識の機構は、ほとんど判っていないので実験データなしにカプシド化配列の正確な部位及び性質を予言することは理論的に不可能である。D型レトロウイルスについては何もない。

レトロウイルスベクターシステムの開発は、上記した仕事の直接的開発であった。これらのシステムでは、パッケージング欠損「ヘルパー」ウイルスが、高修飾R N Aゲノムをカプシド化する粒子を生産するのに用いられる(ベクター)。ワタナベ等、モレキラー・アンド・セルラー・バイオロジィ 3, 2241 - 2249(1983)及びエグリティス等、バイオテクニクス 6, 608 - 614(1988)は、最小のウイルス長末端繰り返し配列、パッケージングシグナル及びプライマー結合部位並びに異種マーカー遺伝子を含むベクターが、ビリオン粒子内にカプシド化され、親ウイルスがトロピック(tropic)である細胞に転移されたことを報告する。この方法により、R N Aのウイルス粒子へのカプシド化に必要な最小配列を決定することが可能となった。

アダム等、ジャーナル・オブ・バイロロジィ 62, 3802 - 3806(1988)は、M o M L Vについて、パッケージングするのに十分な配列は、パッケージング欠損に導くものとして欠損により最初に明らかにされた5'リーダー部分を含むことを開示している。付加的配列は、gag配列がベクターのパッケージングを増強したが、必須ではなかった。

W O - A - 9119798は、潜在的パッケージングシグナルとして5'リーダー配列のみを本質的に含むH I V基本ベクターがH I V基本パッケージングシステムによりうまくカプシド化されたとの報告があったことを開示する。この仕事は未だ確認されていない。事実、5'リーダー配列のみを含むH I V R N Aをカプシド化することは、本明細書中で明らかにしたように失敗した。

発明の要約

本発明の第一の局面によれば、R N Aはビリオン内にパッケージできないから、プロウイルスは、M P M V蛋白を生成しうるが複製コンピテントを生成し得ない。このパッケージング欠損プロウイルスベクターを用いると、パッケージング欠損細胞系が創造でき、ウイルスのパッケージング機構を研究し、このパッケージング機構を損なう戦略を開発するのに用いることができる。このようなパッケージング陰性プロウイルスにより産生されたビリオンは、ワクチンとして、又、所望の遺伝子を哺乳動物細胞に効果的に導入するためのシステムとして用いうる。これは、又、今や本発明の第二の局面により、H I Vについて、その結果他のレンチウイルスについて首尾よく達成された。

発明の説明

本発明の第一の局面は、M P M Vに関する。

M P M V は、これまで用いられ、ヒトにおいて潜在的使用のための遺伝子ベクターとして開発されている他のレトロウイルスに比べ、レトロウイルスベクターとして幾つかの潜在的利点を有する。特に、

- 1) それは、アッセーされる全てのヒト細胞に感染性である。
- 2) それは、ヒトに非病原性である。
- 3) それは、補体仲介溶解に感受性のエンベロープを有する。これはありそうもないこと、例えば組換えがヒト使用でのレトロウイルスベクターの生成で起きても、ウイルスはそれが細胞外空間に現れるとすぐにインビボで死滅されるので再構成 M P M V からの危険がないことを意味する。
- 4) 分子生物学及びウイルス組立て機能がよく理解されている。
- 5) それは、パッケージング機能にとって大きく余分であるように見え、又、従って所望の遺伝子配列により置換できる 8 キロ塩基よりも大のゲノムを有する。遺伝子治療の候補者である遺伝子をコードする R N A のほとんどの D N A 複写は、これらの次元のウイルスゲノムに適合する。
- 6) 内因性ヒトレトロウイルス配列との明白な検出可能な類似性がなく、従って治療用ベクターとインビボに現れる複製コンピテントウイルスに導く内因性配列との組換えの可能性を最少にする。

7) M P M V が、マウスレトロウイルスベクターによりカプシド化され、マウスレトロウイルスベクターシステムにより感染した全ての細胞に伝達される例えば V L 3 0 科のような異種配列をカプシド化するという証拠はない。

本発明の第一の局面は、分子生物学並びに野生型及びミュータント M P M P とそれから作られた欠損ウイルス構成(ベクター)との置換の研究に基づき、そこで、M P M P にパッケージしているウイルス R N A に含まれる cis 作用シグナルを局在させるためにコード機能の主要切片が削除され、マーカー遺伝子と置換された。R N A のビリオン粒子内へのパッケージングに必要な且つ十分なシグナルが明らかにされた。R N A パッケージングに必要な且つ十分なシグナルの局在がこれまで研究された他のウイルスと異なること、又、これらのシグナルの部位は、他のレトロウイルスとの直接相似及びそれらのパッケージング機構の研究により予言できなかったことが明らかである。それ自身は置換欠損であるがその R N A は野生型ウイルスにより trans にパッケージでき、又、M P M V 自体は感染によりトロピックである標的細胞に分配できるベクターが構築された。これらのベクターは標的細胞クロモソームに組込まれ、抗生物質耐性マーカーの場合に、それ自体が抗生物質耐性である標的細胞を生成するのに効果的に十分な標的遺伝子を発現する。

特に、M P M V パッケージング欠損ベクター及び細胞系を作ることが可能であることを発見した。M P M V のプライマー結合部位と 5' 主要スプライスドナーとの間の部分が M P M V R N A をビリオンにパッケージングするのに必要な配列を含むことが判った。パッケージング欠損 M P M V プロウイルスを含むベクターを調製することができ、当該ベクターは、所望の M P M V 生成物を発現するため M P M V ゲノムから十分な数のヌクレオチドに対応するが、M P M V R N A を効果的にパッケージするためのプライマー結合部位と 5' 主要スプライスドナーとの間の部分に対応する十分な数のヌクレオチド(パッケージング配列)には対応しないヌクレオチド配列を含むものである。

これらの配列は好ましくは M P M V のゲノムに対応する。この用語「対応する」とは、同類的(conservative)付加、欠失及び置換が許されることを意味する。プライマー結合部位(18 bp)及び 5' 主要スプライスドナーは、それぞれ、ソニゴ等、セル 45、375 - 385(1986)により与えられたゲノムヌクレオチド配列中の 348 - 365 及び 475 - 480 である。

好ましくは、ベクターは、プライマー結合部位のすぐ下流と 5' 主要スプライスドナーのすぐ上流のセグメントに対応する M P M V パッケージング配列を含まない。典型的には、ベクターはプライマー結合部位の約 2 塩基下流からプライマー結合部位の約 32 ないし 63 塩基下流の間のヌクレオチドを含み、依然としてパッケージング欠損でありうる。一実施態様では、ベクターから欠損するパッケージング配列は、本明細書 S E Q I D N o .

1 に示されるように、121 - 塩基ヌクレオチド配列を含む。他の実施態様では、それは

10

20

30

40

50

SEQ ID No. 1の塩基28ないし50の23-塩基セグメントを含む。SEQ ID No. 1は、
 GCGCCCCAACGTGGGGCTGGATACGAGGGAATTTCTGTGAGGAAGACGACGCGTTCGC
 CGGCCGCGGATTAAGTGAAGTAACTCTCTTGGCCGCCGCGGGAACCTGCCGCG
 TTGGACC

である。

ベクターから除去すべき塩基の数は大きく変化できる。例えばM P M V中の一定の23-塩基対削除は、パッケージング能力を失わせるのに十分である。しかしながら、この部分でのより少しの削除でも、パッケージング効率を失わせるべきである。実際、この部分での約5塩基のような小さな削除が効率的パッケージング能力を失わせることが期待される。特定の削除の大きさは、この分野での通常の知識の者により、本開示に基づいて直ちに決定できる。

ベクターは、機能的M P M V遺伝子生成物を発現するため、M P M Vゲノムのヌクレオチドに対応する十分な数のヌクレオチドを含有するM P M Vヌクレオチド切片を含むべきであるが、上記したように、ウイルスRNAのピリオンへの効率的パッケージングを可能にするために、プライマー結合部位と5'主要スプライスドナーとの間の部分に対応する十分な数のヌクレオチドを含むべきでない。M P M Vパッケージング欠損細胞系を確立するためにこれらのベクターを用いる場合、そのような細胞系は如何なる感染M P M Vをも生成しないことが好ましい。細胞はパッケージング欠損であるので、これらのパッケージング欠損不足ベクターにより形質転換された細胞系は低感染性を有するが、或るRNAは依然、ピリオンにパッケージングすることができる。従って、M P M Vヌクレオチド切片は完全なM P M Vゲノムに対応しないことが好ましく、これによりウイルスRNAのあるものがピリオンにパッケージングされても、パッケージングされるものは複製コンピテントウイルスではないであろう。

好ましくは、選択された細胞系は、各々がM P M Vゲノムの異なる部分を含むがウイルスパッケージングに必要な配列を含まない、少なくとも二つの異なるベクターを用い、形質転換される。従って、各ベクターにより細胞を同時形質転換することにより、細胞は依然、全てのM P M V構造及び酵素蛋白を発現し、ピリオンを生成することが可能である。好ましい態様では、その又は各ベクターはM P M V L T R(長末端繰り返し配列)に対応する配列を含まないが、プロモーター部分及び/又は他のゲノムのポリアデニル化配列に対応する配列を含む。特別なプロモーター及びポリアデニル配列の選択は、特別な宿主細胞に基づいて容易に決定できる。好ましくは、配列が対応しないL T Rは、3' L T Rである。

一つの好ましい態様では、一つのベクターは、enyの上流にM P M V蛋白の発現を可能にする配列を含み、第二のベクターは、残留蛋白の発現を可能にする。例えば一つのベクターは、env遺伝子配列に対するgag開始コドンの上流の十分な数のヌクレオチドに対応するM P M Vヌクレオチド切片を含み、5'最大遺伝子生成物を発現する。他のベクターは、gagの下流の十分な数のヌクレオチドに対応し、機能約env遺伝子配列を含むM P M Vヌクレオチド切片を含む。そのようなベクターは、本開示に基づき当業者によって、これらのウイルスの既知の制限エンドヌクレアーゼ部位を利用して、M P M Vゲノムの報告された遺伝子配列から化学的に合成できるか又は多くの入手可能なM P M Vプロウイルスから誘導できる。

好ましくは異なるマーカー遺伝子が各ベクターに加えられる。次いで、これらの異なるベクターにより同時形質転換された予め選択された細胞系を用い、そして両マーカーを含んでいる細胞を探すことにより、両ベクターにより同時形質転換された細胞が見出される。そのような細胞は、全てのM P M V蛋白を生成しうるであろう。ピリオンが生成されるであろうが、全ウイルス配列に対応するRNAは、これらのピリオン内にパッケージされないであろう。所望により、2以上のベクター、例えばgag/polベクター、プロテアーゼベクター及びenvベクターを用いることができる。

10

20

30

40

50

レトロウイルスは、ある場合には、他のウイルスのエンベロープグリコプロテインにより偽型にできる。続いて異なるレトロウイルス由来のenv遺伝子に対応する十分な数のヌクレオチドを含むベクターを調製できる。好ましくは、本ベクターの5'LTRはenv遺伝子と同じゲノムのものである。そのようなベクターは、ビリオンを産生するのに、M P M V envパッケージング欠損ベクターの代わりに用いることができる。そのような変更により、生じたベクターシステムは、より広い宿主範囲で用いることができるか、又は例えば細胞範囲をC D 4 蛋白を有するものに限定するH I V env遺伝子ベクターを用い、より小さな宿主範囲に限定できる。

実質的に、どのような細胞系でも用いることができる。好ましくは、哺乳動物細胞系、例えばC V - 1、HeLa、Raji、S W 480又はC H Oが用いられる。

10

ウイルス細胞生成物の生成を増強するために、例えばC V - 1又はHeLa細胞中、遺伝子を優先的に発現するであろうプロモーターで5'LTRを置換することにより、5'LTR以外のプロモーターを用いることができる。用いられる特別のプロモーターは、本開示に基づき、用いられる細胞系に依存して、当業者により容易に決定できる。

ウイルス細胞生成物のレベルを増強するために、ベクターによりエンハンサー配列を加えてM P M V L T R及び/又はプロモーターの増強を得ることもできる。特別なエンハンサー配列は、宿主細胞系に依存して、当業者により容易に決定できる。

完全なM P M Vゲノムを共に含む一連のベクターを用いることにより、M P M V R N Aを含まないビリオン以外のM P M Vビリオンと同一であるビリオンを生成する細胞系を創造することができる。これらのビリオンは細胞から容易に得ることができる。例えば細胞を培養し、上清を採取する。望ましい用途によって、ビリオンを含む上清を用いることができるか、又はこれらのビリオンは、標準的技術、例えば勾配遠心、濾過等により上清から分離できる。

20

これらの弱毒化ビリオンは、ワクチンを調製するのに非常に有用である。ビリオンは、M P M Vビリオンに反応する抗体を産生するのに用いることができ、又、これらのビリオンは、これらのビリオンの内部がウイルスR N Aを含まない以外、現実のM P M Vビリオンと同一であるので、創造されたワクチンは特に有益である。M P M V gag / pol及びプロテアーゼ遺伝子と同時形質転換された細胞系から生成され、且つ他のウイルスからのenv遺伝子を含む偽型ビリオンは、この他のウイルスに対するワクチンを創造するのに有用である。例えば、細胞中のH I V envベクターは、H I Vに対する抗体反応を惹起する能力を有するH I V envを含むが、他のH I V蛋白又はH I V R N Aがないので病原性を有しない、ウイルス粒子を生じうる。

30

これらのビリオンは、又、種々の目的、例えばビリオンのスクリーニング、ビリオンに対する標的システムの開発等に用いることができるビリオンに対する抗体を得るのに用いることもできる。さらに、これらのM P M Vパッケージング欠損細胞系は、所望の遺伝子、例えば異種遺伝子を下記のように哺乳動物細胞に導入する手段として非常に有用である。これらのビリオンは、所望する遺伝配列をパッケージし、M P M Vにより感染可能な標的細胞にそれらを伝える非常に効率的な方法として用いうる。これはM P M Vのパッケージングヌクレオチドに対応する十分な数のヌクレオチドを含むヌクレオチド切片(M P M Vパッケージング部分)、予め決定した遺伝子、並びにパッケージング配列及び予め決定した遺伝子に隣接して、パッケージング、逆転写、ベクターの標的細胞への組込み及びベクターからの遺伝発現のためのL T R内及び近くからの十分な数の配列に対応する配列を含むベクターを調製することによりなしうる。

40

パッケージング部分は、好ましくは、少なくともプライマー結合部位と主要5'スプライスドナーの間の部分と対応する。そのようなベクターのパッケージングについて以下に示された実験データに関して、ベクターは、パッケージング効率を高めるために、M P M Vのgag遺伝子配列の最初の5 0 0 bpを有しうる。さらにそれは、パッケージングを阻害するように見える本配列の不存在がベクターをよりパッケージ化するので、5'主要スプライスドナーとgag遺伝子開始コドンの間の第4 8 1 - 4 9 3配列に対応するヌクレオチドを特異的に含まないであろう。例えばパッケージされ、逆転写され、標的細胞に組

50

込まれて発現される十分な数のM P M V配列は、L T RのU 3、R及びU 5配列、パッケージング配列並びに(逆転写に必要な)L T Rに隣接する幾つかの配列を含むであろう。プライマー結合部位と5'主要スプライスドナーの間に記載されるパッケージング配列はそのようなベクターをパッケージングするのに十分であろうが、これはパッケージングをさらに増強するように見えるのでgag遺伝子コード配列の最初の5'00ヌクレオチドを含むのが有利でありうるし、又、5'主要スプライスドナーとgag開始コドンの間の配列に対応する部分を省くのが有利であろう。gag開始コドンの変異は、パッケージングに必要なcis作用gagヌクレオチド配列が依然残っている限り、この点から開始する翻訳をさけるために許容されるであろう。例えばgag A T Gは部位指定突然変異導入法によりA T Cに変異できる。

10

このベクターをM P M Pパッケージング欠損細胞の一つを形質転換するのに用いる場合、ビリオンにパッケージされるのは、このベクター由来のヌクレオチド配列である。これらのM P M Vパッケージ遺伝子は、次いで目標としてのM P M Vにより感染されうる細胞に向けられる。この形質転換の方法は、従来の方法よりもはるかに効率的であることが期待される。さらに遺伝子の適当な選択により、M P M V感染の方法はモニターしうる。

例えば、ベクターは、発現され、逆転写され、取り込まれるM P M Vの5'及び3' L T Rに対応する十分な数のヌクレオチド、パッケージされるM P M Pパッケージング配列に対応する十分な数のヌクレオチド、例えばプライマー結合部位と5'主要スプライスドナーとの間の切片を含むことができる。ベクターは、又、機能遺伝子を生成するために転移させることが望まれる遺伝子の十分な数のヌクレオチド(例えば遺伝子切片)をも含むうる。

20

本遺伝子は以下に記載するように、全ての所望される遺伝子であることができる。M P M V p S H R M 1 5の感染プロウイルスクローンは、ワイズ等(後記)によりコールド・スプリング・ハーバー発行、R N A ツーモア・ウイルスズに記載された。それは隣接配列中に完全プロウイルスとハイグロマイシン耐性遺伝子を含む(図3)。オリゴヌクレオチド部位指定突然変異導入法を用い、非コード部分の一連の切片をプライマー結合部位(P B S)とgag開始コドンの間で削除した。削除M P S 1は、P B Sから主要スプライスドナーまでの完全部分を含む、即ちヌクレオチド356-469(S D)からの削除を含む。M P S 2は、M P S 1削除の5'部分の削除、即ちヌクレオチド376-432からの削除を含み、M P S 3はM P S 1削除、即ち403-464の3'部分の削除を含む。M P S 4はS Dとgag完全コドンの間、即ちヌクレオチド481-493からの削除である。全

30

てのこれらのヌクレオチド番号付けは、ガーウィン等、ジャーナル・オブ・バイロロジ 24, 478-488(1977)により用いられた番号付けによる。p S H R M 1 5のサブクローン化断片中のこれらの削除は、無傷の感染プロウイルスへと後にサブクローンされた(要約のための図2参照)。同じ削除は、又、2つの長末端繰り返し配列とエンベロープ遺伝子中のドロール部位由来の3'配列とを含むp S H R M 1 5の欠損誘導体にクローンされた。5'末端で、1.5 kBのgag遺伝子を含むように延びる5'リーダー配列が含まれ、これらの間で、ベクターに対応するセンス内のS V 40初期プロモーター配列の調節の下に、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子カセットがクローンされた(図3)。5'リーダー配列中にM P S 1、2、3及び4削除の一つがクローンされた。続いて削除をgag遺伝子で行い5'0.5 kBのgagのどれかが残るようにした

40

。野生型ベクターと削除ミュータントプロウイルス又は削除ユータントベクターとの、及び野生型ウイルス又は削除ミュータントベクターと削除ミュータントプロウイルスとの組合わせをcos 1細胞に同時形質転換した。上清は濾過されて、Hela細胞上にプレートされ、ハイグロマイシン耐性コロニー現出の数は、ハイグロマイシン含有ベクターのパッケージングの効率を示した。實際上、R N Aのパッケージングのための競合がベクターとウイルスの間で確立し、パッケージされた全長R N Aのバランスの上で、ベクター又はプロウイルスのいずれかで削除ミュータントの効果が測定された。

要約すると、実施例1にも報告されるように、削除M P S 1はR N Aパッケージングを事実上の廃止に導いた。M P S 2及びM P S 1は等しい過酷さのパッケージング欠損を示し

50

、M P S 4 はパッケージングに全く影響を及ぼさなかった。事実、M P S 4 削除を含んでいるベクターは、S D から gag A U G まで無傷の部分を含むものよりも大きな効率でパッケージするように見えた。5'0.5 kB のみを残すための gag 配列の削除は、パッケージング効率を増大させ、遠位の部分で削除された配列が R N A カプシド化に阻化作用を有することを示唆した。(R S V に関してを除き)他のウイルスでのパッケージングにほとんど普遍的に必要とされる S D と gag A T G との間の配列が M P M V では必要でなく、除去によりパッケージングを増大させるという点で、M P M V は、これまで記載されたレトロウイルスパッケージングシグナルの中でユニークであるパッケージングシグナル要求物を有することが結論づけられうる。従って、効率的にパッケージされるベクターは、好ましくは S D と gag 開始コドンの間のこれらのヌクレオチドに対応するヌクレオチドを含まない。10
パッケージングは、P B S - S D 部分の 5'半分とそれを R S V と区別する 0.5 kB の gag 遺伝子に含まれる配列により得ることができる。最初の 5'000 ヌクレオチドに対する gag 3'の部分も、明らかにカプシド化に対し相対阻止作用を有し、好ましくは効率的にパッケージされるベクターから排除される。

これらの知見は、レトロウイルスパッケージングシグナルの一連の定義で、パッケージングに必要且つ十分な両シグナルの記載で、パッケージングのための R N A の競合の記載で、そして(阻止シグナルと呼ばれうる)ウイルスパッケージングでの減少に導くシグナルの同定で、ユニークである。本開示により当業者は M P M V に基づく効率的レトロウイルスベクターシステムを構築しうる。

本発明の第二の局面は、H I V 及び他のレンチウイルスに関する。それは M P M V について上記したものと相似の研究に基づく。結果は H I V に関して報告され、本発明が示したが、同じことは他のレンチウイルスにあてはまることが確信される。20

H I V に関する結果は、5'リーダー配列がベクターをカプシド化するのに明らかに十分でないという驚くべき発見を含む。ともかく起きるカプシド化について、tat スプライスアクセプターのウイルス 3'に第二配列が含まれなければならないことが確立された。この部分は、さらに、塩基 7621 - 8141 (ロス・アンゼルス・エイズ・データベースによる)からの切片に位置決定された。これらは R E V 反応性について示された境界を非常に近くを含む。これらの 2 つの配列の存在で、ベクターは細胞系での及びピリオンでカプシド化したベクターの相対レベルの発現を比較すると、野生型ウイルスの 88% の効率でカプシド化できる。さらに gag 遺伝子及び 3'のエンベロープ、既に記載した断片、を含むベクター30
は、cis 又は trans で発現した R E V 蛋白の存在で、細胞中に高レベルで発現され、この増強された豊富さよりパッケージングについての R N A の増強された有用性に導かれる。従って、正しい遺伝因子を伴う gag 遺伝子の存在により、H I V を基にしたベクターの増強されたパッケージングと伝達に導かれる。本パッケージング効率の分析は、しかしながら、gag 遺伝子がパッケージングに必要でないが増強機能を有しうることを示した。

gag 遺伝子が削除されるとパッケージングは減少するが、異種配列を gag 遺伝子と置換するとパッケージング効率は劇的に減少するという驚くべき発見がなされた。即ち、gag 遺伝子の代わりに、異種遺伝子をプロウイルスゲノム内に挿入すると、ある場合に、カプシド化を使用に不適当に無力とすることができる。又、ベクター内での rev 反応性部分 (R R E) の存在は有利であることも明らかである。これは、核から非スプライスウイルス R N A の40
放出を増強する rev / R R E システムの能力に関して予言し得た。しかしながら、ベクターに R R E を存在させるとヘルパーウイルスシステムによる形質導入に関するその能力を増強することを示した。これは、R N A のパッケージ能力の増強の直接効果であるように見え、rev / R R E システムの予期し得ない機能である。

本発明は、その範囲内に、それ自身は複製欠損であるが、その R N A が野生型ウイルスにより trans にパッケージでき、H I V 自体が感染によりトロピックである標的細胞に伝達できるレンチウイルスベクターを含む。これらのベクターは、標的細胞クロモゾームに組込まれ、抗生物質耐性マーカーの場合、それ自身が抗生物質耐性である標的細胞を生成するのに十分な標的遺伝子を効率的に発現する。

特に新規ベクターは、H I V ゲノムに対応する十分な数のヌクレオチドを含み、機能的 H 50

ＨＩＶ遺伝子生成物を発現するが、ＨＩＶゲノムのヌクレオチドに対応する十分な数のヌクレオチドを含有せず、感染ウイルスを生成する。ＨＩＶビリオン粒子にカプシド化されるべきＨＩＶゲノムに対応する十分な数のヌクレオチドを含むが、ＨＩＶゲノムのヌクレオチドに対応する十分な数のヌクレオチドを含まず、感染ＨＩＶビリオンの生成に必要とされるＨＩＶ遺伝子生成物を生成するベクターが同定された。

さらに特異的に、そのようなベクターに含まなければならない配列は、主要スプライスドナー部位とベクターカプシド化に十分であることがWO - A - 9119798に示唆されるgag遺伝子に関する開始コドンとの間のＨＩＶ非翻訳部分に対応するこれらのヌクレオチドであると思われる。これらのシグナルだけではベクターカプシド化に十分ではないが、7167から8267まで番号が付されたＨＩＶ(HXB2R)のヌクレオチド配列(ロス・アンゼルス・エイズ・データベースからと同じ番号付)、rev反応性要素(RRE)を含む配列の存在で、ベクターカプシド化が起きる。このカプシド化は、gag遺伝子が異種配列、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子をコードするものにより置換されても依然非効率的である。しかしながら、ヌクレオチド1642(ロス・アンゼルス・エイズ・データベースによる番号付け)でBgIII部位のcis作用gag配列5'の含有は、以下の実施例3に示すように5'末翻訳部分及び3と5倍の間のRREを含むベクターのパッケージ性を増強する。

これら3つの重要なcis作用配列の全てを含むベクターは、それらに治療的利用のものでありうる遺伝子をクローンしうる能力を有する。5'末翻訳部分及びRREを含むベクターは、カプシド化でき、カプシド化の増強をより大きく投与するRREの存在は、未スプライスRNAのみの輸送及び安定性に対するその効果から予言できた。適切な遺伝子が、そのようなベクターにクローンされ、所望の標的細胞に伝送されうる。

しかしながら、異種配列がgag遺伝子配列の代わりに挿入されるとパッケージ性及び形質転換性に重大な減少がありうる。この発見は、治療的に有用な異種遺伝子を転換するかも知れないベクターの潜在的設計を大きく変える。

本発明の第二の局面は、所望のＨＩＶ生成物を発現するため、ＨＩＶゲノムからの十分に数のヌクレオチドに対応するが、ＨＩＶ RNAを効率的にパッケージするため、プライマー結合部位と5'主要スプライスドナーとの間の部分に対応する十分な数のヌクレオチドに対応しないヌクレオチド配列(5パッケージング配列)を含むベクターの一部として、パッケージング欠損ＨＩＶプロウイルスを利用する。ＨＩＶ-1パッケージングシグナル及び主要スプライスドナー部分の保存安定二次構造は、ハリソン等、ジャーナル・オブ・バイロロジィ 66、4144 - 4153(1992)により記載され、その内容を引用して明細書記載の一部とする。

そのようなパッケージング欠損プロウイルスは、ＨＩＶビリオン粒子を生成することができるが、それらの粒子内にそれ自身のRNAをカプシド化することができない。この欠損プロウイルスは、又、それらの間でＨＩＶの実質構造、酵素及び調整蛋白を全て生成するのに十分であるＨＩＶの相補的遺伝子配列を含む2つのコードプラスミド構造物中に分割することもできる。可能な配置は、gag及びpol遺伝子生成物をコードする一つの構造物とenv、tat及びrev遺伝子生成物をコードする他方とを有する。これらの構造物はいずれもカプシド化に必要な5'リーダー配列を含まず、従って、それ自身のRNAをパッケージすることはできないが、今、明らかにされた3つの重要なパッケージングシグナル配列を含む適当なベクターからtrans RNAにパッケージできる。同様にベクターは、ＨＩＶゲノムから本明細書に記載したパッケージングシグナルを含むが、他のＨＩＶコード遺伝子配列を含まない十分な数のヌクレオチドに対応して調製できる。このベクターは、次いでパッケージングシグナルを削除した欠損プロウイルスから誘導された蛋白によりtransにパッケージでき、次いでベクターは、野生型ＨＩＶにより通常感染可能な標的細胞に送達される。

これらの配列は、好ましくはＨＩＶのゲノムに対応する。用語、対応するのは、保存付加的、削除及び置換が可能であることを意味する。

上記したように、レトロウイルスは、ある場合には他のウイルスのエンベロープグリコプ

10

20

30

40

50

ロテインで偽型化できる。続いて、異なるレトロウイルスからのenv遺伝子に対応する十分な数のヌクレオチドを含むベクターを調製できる。好ましくは、このベクターの5'LTRはenv遺伝子と同じゲノムのものである。そのようなベクターは、HIV envパッケージング欠損ベクターの代わりにビリオンを創造するのに用いることができる。そのような変更により、得られるベクターシステムは、広い宿主範囲の標的細胞に用いることができる。

MPMVについて上述したように、事実上、全ての細胞系を用いることができる。好ましくは哺乳動物細胞系、例えばCV-1、Hela、Raji、SW480又はCHOが用いられる。

ウイルス細胞生成物の生成を増加するために、MPMVについて上記したように、異なるプロモーターを用いる。

ウイルス細胞生成物のレベルを増強するために、MPMVについて上記したように、エンハンサー配列を付加することができる。

完全HIVゲノムを共に含む一連のベクターを用いることにより、MPMVについて上記したように、ビリオンがHIV RNAを含まない以外、HIVビリオンと同じであるビリオンを生成する細胞系を創造することができる。

これらの弱毒化ビリオンは、MPMVについて上記したように、抗体等を作るワクチンを調製するのに特に有用である。特に、これらのビリオンは、所望の遺伝配列をパッケージし、それらをHIVにより標的細胞に伝達するための非常に効率的な手段として用いる。これは、HIVのパッケージングヌクレオチド(HIVパッケージング部分)に対応する十分な数のヌクレオチド断片、予め決定した遺伝子、並びに、パッケージング配列及び予め決定した遺伝子に隣接して、パッケージング、逆転写、ベクターの標的細胞への組み込み及びベクターからの遺伝子発現のための、LTR内部、及び近くからの十分な数の配列に対応する配列を含むベクターを調製することにより行ないうる。

本発明の他の局面において、伝達される外来遺伝子は、全ての所望される遺伝子、例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(Neo^R)についての遺伝子又はハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(Hygro^R)についての遺伝子であることができる。より好ましくは遺伝子は、遺伝子、例えばアデノシンデアミナーゼ(ADA)についての、アリアルスルファターゼAについての、又はBドメイン推定因子VIIIについての遺伝子、これらはそれぞれADA欠損症、異染性口イコジストロフィー及び血友病の患者に欠けている、の欠損した患者に治療価値のある生成物を発現する。これらはベクターにクローンされ、所望の標的細胞に伝達されうる。遺伝子は、病原性有機体、例えばトランス優性インヒビター、ウイルス組み込みのインヒビター、アンチセンスRNA、触媒RNA又は可溶性ウイルスレセプター誘導体、例えば可溶性CD4に逆に影響を及ぼす生成物を発現しうる。

遺伝子は、病原体又は腫瘍に対する防禦又は他の有利な免疫応答を促進するために、治療用途、例えば病原体の抗原的に重要なエピトープの、又は標的細胞表面への腫瘍細胞の提示を有しうる。遺伝子は、Tリンパ球レセプター分子の抗原認識切片を暗号化し、それにより、リンパ球が本ベクターで形質転換されると、それらは所望の抗原特異性のT細胞レセプターを発現しうる。そのようなT細胞レセプター特異性は、好ましくは、病原性微生物の重要なエピトープに、又は腫瘍特異抗原に向けられる。そのようなT細胞(モノクローナルT細胞)のクローン拡大は、感染病原体に対する治療様式として、又は悪性疾患に対する作用物質として有用である。

確認されたMPMV及びHIVでのパッケージングシグナルに関するこれまで知られていなかったデータが与えられることで、当業者は、それ自体のRNAをカプシド化することはできないが、実質的ウイルス構造及び酵素、蛋白を全てコードすることができ、ウイルスRNAの欠けたウイルス粒子を創造する他のパッケージング欠損MPMV又はHIVを構築しうる。当業者は、又、必要とするcis作用配列を有するベクターを構築し、それによりそれらはそのようなゲノムRNA欠損粒子にカプシド化され、ウイルスが通常トロピックである標的細胞に伝達されうる。ベクターのRNAは、次いで、ビリオン逆転写酵素により逆転写され、ウイルスインテグラーゼ酵素により細胞DNAに組み込まれる。当業者

10

20

30

40

50

は本情報によりM P M V又はH I Vに基づくレトロウイルスベクターシステムを創り出すことができる。このシステムは、ベクター内の異種遺伝子プロモーター配列の使用により、及び組織特異配列、例えば組織特異プロモーター又は特別組織中に遺伝子の発現を明らかにするイントロン配列の使用により改良することが可能である。

好ましくは、L T R配列自体はプロモーターとして役立つことができるが所望の遺伝子に関するベクターが含まれる。実質的には全てのプロモーターを用いることができるが、好ましくは、それは、遺伝子が形質転換される宿主細胞中、遺伝子の発現を促進する。好ましいプロモーターは、ウイルスプロモーター、例えばS L - 3、マウスレトロウイルスL T R等を含む。エンハンサー配列もベクター中に好んで用いられる。遺伝子に関しポリアダニル化配列が好んで含まれる。ベクターに関するセンス定位での遺伝子の場合、本機能は3' L T Rにより達成できる。ベクターに関するアンチセンスでの遺伝子の場合、遺伝子(即ち、ベクターに対するアンチセンスで)の3'末端に付加的ポリアダニル化シグナルが好んで取込まれる。ベクターは1以上の遺伝子又は偽似遺伝子配列を含むことができ、関心の多重遺伝子の発現を可能にする。

このベクターは、好ましくは、上記したパッケージング欠損ベクターと用いることができる。そのような状況では、M P M V / H I V L T Rは、好ましくは、パッケージング欠損ベクターのゲノムに対応するベクターにおいて、パッケージング効率を促進する。しかしながら、パッケージング欠損ウイルスとの使用に加えて、このベクターは、遺伝子伝達についてのヘルパーウイルスと用いることもできる。

本発明を、さらに以下の実施例により示す。これらの実施例は、本発明を理解することを目的として提供され、その限定として構成されたものではない。実施例はM P M Vを基にしたベクターに関し、実施例2はH I Vを基にしたベクターに関する。

実施例は、以下の引例を言及し、それらの内容を引用して明細書記載の一部とする。

(1) リー等(1990)ジャーナル・オブ・バイロロジィ 64、3844 - 3854。

(2) ソニゴ等(1986)セル 45、375 - 385。

(3) ターウィリガー等(1989)P N A S U S A 86、3857 - 3861。

(4) ローセン等(1986)ジャーナル・オブ・バイロロジィ 57、379 - 384。

(5) マドン等(1986)セル 47、333 - 348。

(6) フィッシャー等(1985)ネイチャー(ロンドン)316、262 - 265。

(7) ロサルド等(1990)ジャーナル・オブ・バイロロジィ 64、1756 - 1763。

(8) モーゲンスターン等(1980)ヌクレイック・アシッズ・リサーチ 18、3587 - 3596。

(9) ソーグ等(1983)ジャーナル・オブ・バイロロジィ 48、667 - 675。

(10) コムジンスキー等(1987)アナリティカル・バイオケミストリィ 162、156 - 159。

(11) ファインバーグ等(1983)アナリティカル・バイオケミストリィ 132、6 - 13。

(12) キングストン(1987)イン・カレント・プロトコールス・イン・モレキュラー・バイオロジィ、1巻、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウィリィ・インターサイエンス、ニューヨーク。

(13) ポッツ(1990)テクニクス・イン H I Vリサーチ、ストックイン・プレス、ニューヨーク、103 - 106頁。

(14) コワルスキ等(1987)サイエンス 237、1351 - 1355。

(15) シマダ等(1991)ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション 88、1043 - 1047。

(16) レーバー等(1989)ジャーナル・オブ・バイロロジィ 63、4085 - 4087。

(17) セルドン(1987)トランスフェクション・ユージング、D E A E - デキストラ、ユニット 9、2。カレント・プロトコールス・イン・モレキュラー・バイオロジィ、1巻、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウィリィ・インターサイエンス、ニューヨーク。

実施例は、又、添付の図書を引用する。

10

20

30

40

50

図書の簡単な説明

図 1 は pH L M P 及び pH L M P δ gag ベクターを示す。後者は gag の欠失を伴う前者である。

図 2 は 欠失ミュータント M P S 1 等の図表である。

図 3 は、M P M V プロウイルスを含み、並びに S V 4 0 初期プロモーター配列により誘導されたハイグロマイシン B 耐性遺伝子(ハイグロマイシン)を伴い、且つ S V 4 0 ポリアデニル化シグナルを伴う p T 2 1 8 R バックボーンに基づくプラスミド、p S H R 1 5 の図表である(L T R , gag , pol , env 切片はウイルスヌクレオチド配列を引用する)。

図 4 は、H I V - 1 ベクターを示す(各末端の未標識ボックスは L T R である。星印は、変異 gag 開始コドンを示す。ハッチングした及び黒ぬりのボックスは、それぞれ tot 及び rev のエキソンを示す。env の R ev 反応要素は下線から引かれる。波状線により中断されたボックスは部分欠失を含む。S L 3 及び S V を印すボックスは S L 3 - 3 L T R 及び S V 4 0 初期プロモーターである)。そして

図 5 は、以下に記載されるパッケージングプラスミド(i)ないし(v)を示す。

実施例 1

本実施例では、既に記述したプロウイルスとスクローン p S H R M 1 5 (図 3) をヘルパーウイルスとして用い、trans に、M P M V ビリオンの全ての構造及び酵素蛋白を与えた。M P M V 5' L T R 配列、gag 開いた読み取り枠中位置 1 3 2 0 に B a l I 制限部位の下流の 5' リーダー配列、続いてベクターに対しアンチセンス定位にハイグロマイシン B 耐性遺伝子、ポリアデニル化配列を存在させることなく、そして最後に 3' L T R の末端に延びる 7 4 4 0 にドロール部位からの M P M V プロウイルスの 3' 末端を含むベクターを構築した(図 3)。ヘルパーウイルス及び/又はベクターを、種々の欠失を既に記載したそれらに、即ち M P S 1、M P S 2、M P S 3 又は M P S 4 に導入した。ベクター及びヘルパーは C o s - 1 細胞に同時形質転換し、得られるビリオンを集めて、H e l a 細胞を感染するのに用いた。次いでヘラ細胞は抗生物質ハイグロマイシンを含む媒体に保持し、そしてベクターが取り込まれなければならない薬物に対し耐性のコロニーの数をカウントした。これは、ベクターのパッケージ性の措置及び R N A ビリオン粒子へのカプシド化で津失した配列の役割を与える。

最初の実験では、ベクター p H L M P w、その野生型形で p S H R M 1 5 プロウイルス D N A により、又は 5' 末翻訳部分で M P S 1、2、3 又は 4 欠失により C o s - 1 細胞に同時形質転換した。4 8 時間後、形質転換からの上清を集めて H e l a 細胞を感染するのに用い、2 4 時間後、細胞は、ハイグロマイシン B (H y g .) による選択に取りかかった。結果を表 1 に示す。

表 1

ミュータント	コロニー/ml
野生型	1 2
M P S 1	1 0 6
M P S 2	1 2 9
M P S 3	1 5 7
M P S 4	1 5
H L M P	0

H L M P だけが伝達できないこと、又、野生型ウイルスがミュータント M P S 1、2 及び 3 ら比べて貧弱なヘルパーであることは明らかである。これら後者の全てが、正常なビリ

オン蛋白を生成するので、野生型ウイルスRNAがカプシド化についてベクターRNAと競合していると結論されなければならない。

MPS 4 欠失が野生型のように作用することも注目に値し、これが野生型と同様にそれ自身をパッケージできること及びパッケージングに含まれた全く重要でないcis作用配列がSDとgag開始コドンの間に存在することを示唆する。MPS 1、2 及び 3 変異は、それらがパッケージングに関し、HLMPと競合しないので、パッケージングシグナルの有意な部分を分解した。

第二実験では、pHLMPベクターも5'パッケージング部分に導入された変異を有する以外第一を繰り返した。即ち、ハイグロマイシン含有ベクターは、その一方又は両方がパッケージング部分に欠失を有するヘルパーウイルスと同時形質転換した。表2に与える結果は、上清の感染後、新鮮なHela細胞へのこれら形質転換及びハイグロマイシンB選択から得たハイグロマイシン耐性コロニーを示す。

表2

ハイグロマイシン含有ベクター						
ヘルパー	なし	HLMP	HLMP S 1	HLMP S 2	HLMP S 3	HLMP S 4
WT	0	0	0	2	5	20
MPS 1	0	51	0	0	0	61
MPS 2	0	94	0	3	79	230
MPS 3	0	>230	25	26	250	>400

WTヘルパーウイルスにより、どのRNAもごくわずかにパッケージされた。しかしながらMPS 4 欠失は、ベクターをパッケージングするのに有利であるようであり、この部分にパッケージングに対し負の効果をもつ配列があることを示唆する。HLMP S 1 及びHLMP S 2 は極めてわずかにパッケージせず、又、転換せず、これがRNAカプシド化にとって最も重要な部分であることを示唆する。HLMP S 3 はHLMPと同様にパッケージするように見える。量的には異なるけれども、MPS 3 を用いる結果は、質的に同一であり、その数は、多分形質転換後得られたビリオンの力価の間の変化を反映する。HLMP S 1 はそのプライマー結合部位に欠失を有し、本実施例で転換を達成するため:MPS 3 で組換えなければならない。

第三実験では、これがベクターパッケージングを増強するか減少させるかを見るため、HLMPベクターのgagコード部分の位置778及び1793でHpa1部位の間の配列を除去した。欠失は最初の0.5kBのgagコード配列のみを無傷のままとする。得られるプラスミドはpHLMP δ gagと呼ばれる。結果を表3に示す。

表 3

ベ ク タ ー			
ヘルパーウイルス	H L M P	HLMP σ gag	HLMP σ gag
野生型	3 3	8 8	6 7
M P S 1 欠失	9 2	2 4 0	2 5 0
M P S 2 欠失	9 4	> 4 0 0	> 4 0 0
M P S 3 欠失	1 4 3	> 4 0 0	> 4 0 0
M P S 4 欠失	7 8	> 4 0 0	1 9 4

gagコード配列での欠失は、明らかにH L M Pベクターのパッケージングを増強させ、gagの1 7 9 3でのHpa1部位の部分3'がRNAカプシド化に対し、阻害効果を有することを示唆する。

第4実験では、第三を繰り返したが、ウイルス粒子の数の定量が転換するので、逆転写酵素(R T)を測定することにより上清の感染性の標準感度を用いることをしなかった。表4参照。R Tは放射標識T T PのポリA鋳型への組込みのシンチレーションカウントにより測定し、1分当りの放射活性カウント(cpm)として表わした。

表 4

ヘルパー	ベクター	R T - cpm/ml	コロニー/ml	コロニー/100cpm
W T	H L M P	4 1 8 4 0	2 2	5
W T	HLMP σ gag	2 8 1 5 2	6 0	2 1
M P S 1	H L M P	2 3 7 0	9 2	3 9 0
M P S 1	HLMP σ gag	3 1 2 2	5 0 0	1 6 0 0

gag配列を欠失することによる影響を測定した。それは、pH L M Pのパッケージングで約4倍増加させる。パッケージングについてのヘルパーウイルス競合も明らかであり、W Tウイルスは、M P S 1欠失ミュータントよりも約60倍少ないH L M Pベクターのパッケージングを示す。

実施例 2

細胞及びウイルス

細胞系ジャルカット、ジャルカット - tat(4)及びヘラT 4(5)を、10%ウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシンを補足したR P M I 1 6 4 0中で生育した。これらの細胞系及びH I V - 1分離H T L V - III₀はメディカル・リサーチ・カウンシル(U K)エイズ・リエイジェント・プログラムより供給された。

ベクター(図4参照)、

全ベクターはpS V C 2 1に由来し、最初にプラスミド(pH X B c 2)からのH T L V - III B分離物の感染プロウイルスクローンは、R . ガロ及びF . ウォングーストール博士(6)により提供された。pS V C 2 1は複製のS V 4 0オリジンを組込む。ベクターは図4に示す。あるベクターでは、gag開始コドンオリゴヌクレオチド指定突然変異導入法によりG A G A T G G G TからG A G T A T A C Tに変更した。与えられた制限部位は、H X B c 2ゲノムの位置を示す(ロス・アンゼルス・データベース番号付け、ここで位置1は5

10

20

30

40

50

'L T Rの最初の塩基である)。

L C N L。C l a 1 (8 3 0)及びK p n l (9 0 1 5)の間のH I V配列をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(C A T)及びG 4 1 8 耐性(neo)遺伝子により置換した。C A Tは5 'L T Rプロモーターを用い、neoはセンス(L C N L +)又はアンチセンス(L C N L -)でマウス白血病ウイルスS L 3 - 3 (7)由来のプロモーターを用い発現する。L C P L . C X , L C P L . H X , L C P L . P X。これらのベクターは、5 'L T Rから発現されたC A T遺伝子及びS V 4 0 初期プロモーター(p B a b e P u r o (8)由来)により誘導されたプロマイシン遺伝子(puro)を含む。C A T - S V 4 0 - puroカセットは、L C P L . C X でC l a l - K p n l切片(8 3 0 - 9 0 1 5)と、L C P L . H X 中でH i n d I I I - K p n l切片(1 0 8 5 - 9 0 1 5)と、そしてL C P L . P X 中P s t I - K p n l切片と置き換える。

10

L P L . C X , L P L . H X , L P L . P X。これらはC A T遺伝子の除去により上記3ベクターから誘導された。

L N L。これはL P L . C Xと同様で、puroの代りにS L 3 - Neo - S V 4 0 - ポリAカセットを有する。H V Bと同様、W O - A - 9 1 1 9 7 9 8に記載される。

L C P L 2 M、L H P L。L C P L 2 Mは内部S V 4 0 プロモーターがtatスプライスアクセプター部位を含むp S V C 2 1の4 3 bp E c o R 1 - S a l 1 切片(5 7 4 3 - 5 7 8 6)により置換されること以外L C P L . C Xと同一である。L H P Lでは、p L G 9 0 由来のハイグロマイシン耐性遺伝子(hygro)をL C P L 2 MのC A T遺伝子の代りとする。

H V P、H V P M、H V H。これらのベクターでは、S V C 2 1のB a l 1 - E c o R 1 切片(2 6 8 9 - 5 7 4 3)を除去し、palの逆転写酵素及びインテグラーゼドメインを除き、env内のB g l I I I断片(7 0 4 1 - 7 6 2 1)をも除く。Not 1 部位をenvの3 '末端に近い既に創造されたX b a l部位にリンカー挿入により導入した(9)。プロモーター不存在のpuro(H V P)及びhygro(H V H)遺伝子を、本Not 1遺伝子と8 8 9 7のX h o l部位の間で、nef遺伝子に類似の位置で挿入した。H V P及びH V Hベクターを含む細胞はgag p 5 5を発現し、処理を受ける。H V P Mは変異gag開始コドンを持つが、それ以外はH V Pと同一である。

20

H V C p、H V X P。H V PのB s s H I I (7 0 8) - S a l 1 (もとは5 7 8 6)断片をL C P L 2 M又はL H P L由来の同等の断片で置換した。挿入断片は5 'リーター部位及びtatスプライスアクセプターを保持するが、結果はC A T(H V C P)又はhygro(H V H P)でgag配列を置き換える。

30

H V P Δ E C。本ベクターでは、gag - pro部分のほとんどを含むC l a 1 (8 3 0) - E c o R 1 (正式にはB a l 1、2 6 8 9)断片はH V Pから除く。L G P L、L G R P L、L G R P L Δ B H、L R P L。L G P Lは、S a l 1 (5 7 8 6)と上で引用したNot 1 部位の間の配列を除去することによりH V Pから導いた。puro遺伝子は、tatスプライスアクセプターを用いて発現され、env、tat及びrev配列は全て除かれる。L G R P Lはgag及びenv(2 0 9 6 - 7 6 2 1)のB g l I I I部位の間のV H P配列を除去することにより作られた。この結果、枠外gag - env融合並びにtat及びrev機能の損失となるが、Rev反応要素は残る。L G R P L Δ B Hは、tat及びrevの第二エクソンを含むH i n d I I I - B a m H 1 切片(8 1 4 1 - 8 4 7 5)を除去することによりL G R P Lから導いた。L R P LはC l a 1 (8 3 0)とB g l I I I (7 6 2 1)の間のH V P配列を除去することにより構築した。

40

パッケージングプラスミド/ヘルパーウイルス構築物(図5)、

(i) p S V C 2 1、これは完全感染プロウイルスクローンH X B c 2 及び複製のS V 4 0 オリジンを含む。

(ii) p S V Δ P 1、主要スプライスドナーとgag開始コドンの間の1 9 bp欠失を有し、その結果、損傷ウイルス複製となるp S V C 2 1の既に記載されたミュータント(1 6)。

(iii) p S V Δ P 2、これはスプライスドナーとp S V 2 1のgag開始コドンとの間の3 6 b p欠失を有する。本欠失は、結果としてよりひどい複製障害となる。

(iv) p S V Δ P 1 Δ L T R、X h a l部位(8 8 9 7)の下流の配列を除去することにより得られたp S V Δ P 1の非感染誘導体。これは、ウイルス蛋白システムに影響を及ぼすこと

50

なく全 3'LTR を除く。

(v) pSVΔP1Δenv、env 遺伝子中、BglII 切片 (7041 - 7621) を欠損している pSVΔP1 の非感染ミュータント。無傷のビリオンを生成するため、本プラスミドは、env 発現プラスミド pLenv と同時形質転換され、そしてそれは 3'LTR の除去により pLlenv3 から誘導されたものであり、その結果、下流 SV40 ポリアデニル化シグナルが用いられる。

方法

puro 及び hygromycin 選択可能マーカーを含むベクタープラスミドをエレクトロポレーションにより T 細胞系 ジェルガット 及び ジェルガット tat に移入した。ベクター含有細胞の選択のため、プロマイシンを ml 当たり 0.5 μg で用い、ハイグロマイシンは ml 当たり 500 μg で用いた。ジェルガット tat 細胞は移入 neo 遺伝子を既に含むので、LCNL ベクターはジェルガット細胞だけにエレクトロポレーションを付した。G418 は選択のため、ml 当たり 2 mg で用いた。移入システムに無傷のベクターが存在することをノーザン及びサウザンブロットティングにより、並びに CAT 活性及び適当な薬剤耐性の証明により確認した。

ベクター RNA を安定に発現する細胞系を HIV-1 分離 HTLV-III_g で感染し、7 日後、後代ウイルスを集めた。ベクター形質導入を評価するために、1 - 2 ml の後代ウイルス原料は 0.45 μm 膜を濾過させて 2×10^6 ジェルガット tat 細胞 (LCNL の場合のジェルガット細胞) を感染するのに用いた。選択は、24 時間後、上で与えられた濃度で適用し、フラスコは 10 - 14 日後、生細胞の存在を試験した。形質導入されていることが判ったこれらのベクターの力価は、以下の限界希釈法を用いて計算した。ジェルガット tat 細胞を平底 96 - ウエルプレート中、ウエル当たり 5×10^4 細胞で系列 4 倍希釈ウイルスとインキュベートした。6 つの増殖ウエルを各希釈で作製し、選択は感染 24 時間後に適用した。プレートは媒体の半分を取りかえることによりその後各 5 - 6 日ごとにフィードした。ウエルは 3 週間後生細胞の固りを記録した。ヘラ T4 細胞についてベクター力価測定のため、前日 0.5×10^6 細胞をシードした 90 mm ペトリ皿はウイルスの希釈液で感染した。プロマイシン (ml 当たり 0.75 μg) 又はハイグロマイシン (ml 当たり 200 μg) 選択は、感染後 24 時間に適用した。10 日後、4 % 正式食塩水中でプレートを固定し、0.1 % トルイジンで染色したのち、コロニーをカウントした。

全細胞 RNA を酸グアニジウム - チオシアネート法 (10) を用いて調製した。

同様の方法を、以下のようなポリエチレングリコール (PEG) 沈殿及び高速遠心によりウイルスをまず濃縮したのち、ビリオン RNA に用いた。-70 °C で保存したウイルスの原料を解かし、0.5 容量の 0.4 M NaCl 中 30 % PEG 8000 と一晩インキュベートした。沈殿を、4 °C で 40 分間 2000 rpm の遠心により集め、0.5 ml の TNE (10 mM トリス HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5) に再び懸濁した。これを 2 % シュークロースを含む同容量の TNE 上に層状とし、ベックマン TLA 45 ローター中、4 °C で 1 時間 40,000 rpm (98,000 × g) で遠心した。RNA は 10 μg のキャリアー tRNA の添加によりウイルスペレットより抽出した。ビリオン RNA を OEPIC 処理蒸留水中、最初のウイルス原料の約 1 / 100 の容量に再び懸濁した。

ノーザンブロットティングのために、5 μg の全細胞 RNA 又は 5 μg のビリオン RNA をホルムアルデヒド 1 % アガロースゲル上に延ばし、10 × SSC 中ゼタプローブ膜 (バイオラブ) 上に移し、バイク (bake) し、0.25 M リン酸ナトリウム pH 7.4、7 % ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 中、65 °C で一晩ハイブリダイズした。高特異活性プローブを、クレノウポリメラーゼを用い任意初回免疫法 (11) により調製した。膜は、オートラジオグラフィに先立ち、65 °C で 3 × SSC、0.1 % SDS で 3 回、次いで 0.1 × SSC、0.1 % SDS で 4 回、洗浄した。EcoRI 切片 4648 - 5743 を pol 遺伝子プローブとして用い、LTR 配列を KpnI - HindIII 断片 9015 - 9616 でプローブした。

スロットブロット分析のために、逆転写酵素活性を正常化し、約 0.5 ml の未濃縮ウイルス原料に相当するビリオン RNA 試料を緩和な変性条件 (氷冷 10 mM NaOH, 1 mM EDTA) 下、ゼタプローブ膜に適用した。完全 RNA 加水分解のために、試料は、2 M NaOH 中、80 °C で 30 分間インキュベートし、次いで上記の膜に適用した。膜はバイク

10

20

30

40

50

し、ノーザンブロットと同じ方法でハイブリダイズした。

ベクターRNAパッケージングを計算するために、ビリオンDNAのスロットブロットを正副2つ調製し、ベクター特異(puro遺伝子)及びウイルス特異(pol遺伝子)プローブとハイブリダイズした。結合プローブをシンチレーション計数により測定した。2つのプローブの長さの特異活性の違いを克服するため、puro及びpolハイブリダイズ配列のストイキオメトリーが1:1である標準試料を含めた。標準試料は、nefの代りにpuro遺伝子を含むプロマイシン耐性HIV-1ウイルス由来のRNAよりなった。野生型ヘルパーウイルスレベルのパーセントとして現わされるベクターカプシド化を、式

$$100 \times (\text{puro試料} \times \text{plo ref}) / (\text{puro ref} \times \text{POL試料})$$

を用いて計算した。

10

以上のデータは、どのベクターがパッケージされるかを示すが、異なるRNAのパッケージング効率についての正確な情報を与えるものではない。そこで第二の計算を実施した。パッケージ可能なベクター各々について、パッケージング効率を、細胞中の完全長ベクターRNAの量を決定すること及びこれをスロットブロット分析によりビリオン中にその後検出された量と比較することにより計算した。HTLV-III₈感染ベクター系由来の全RNAのノーザンブロットは、ベクター特異遺伝子プローブ(puro)とハイブリッドし、完全長ベクターRNAの相対量を密度計測により決定した。感染細胞を分析に用い、それによりベクターRNA発現は、パッケージングに関して、tat及びrevにより完全にトランス活性化(transactivated)された。LTRプローブによる選択試料のハイブリダイゼーションによりベクターとHTLV-III₈ゲノムRNAのレベルを直接比較できるようになった。野生型ゲノムのパッケージング効率は、1.0の値を付与し、完全長ベクター(FLV)RNAのパッケージング効率は、式

20

$$(\text{細胞中のパッケージされたFLV} \times \text{III}_8 \text{ゲノム}) / (\text{細胞中のFLV} \times \text{パッケージされたIII}_8 \text{ゲノム})$$

を用い計算した。

5-10 µgの各ベクター及びパッケージングプラスミドを、DEAEデキストラン技術(17)を用いCOS細胞に同時移入した。ウイルスは、72時間後集め、0.45 µmフィルターを通過させて混入細胞を除き、次いで 2×10^6 ジャルカットtat細胞上でインキュベートした。プロマイシン選択は、24時間後0.5 µg/mlで適用し、ベクター含有細胞は、分子及びウイルス学的分析用に発展された。RNAは酸-グアニジウムチオシアネートを用い抽出した。種々のヘルパープラスミドによるベクター形質導入効率は、感染10-12日後、5%正式食塩水中でプレートを固定し、0.1%トルイジンブルーで染色したのち、プロマイシン耐性ヘラ細胞コロニーを計算することにより測定した。

30

移入に続いてプロマイシン選択細胞から調製された高分子量DNAは、サザンブロッティングにより結合ベクターとヘルパーウイルスDNAの存在を試験した。SaclIによる一晚の分解と0.8%アガロースでの電気泳動後、5 µg DNA試料を0.4 M NaOH中、毛細管ブロッティングにより、ゼタプローブ膜(バイオラブ)上に移した。高特異活性プローブを任意初期免疫法(12)により調製し、一晚のハイブリダイゼーションを、0.2 M リン酸ナトリウムpH 7.4、100 µg/ml剪断サケ精子DNA含有7%ラウリル硫酸ナトリウム中、65 °Cで実施した。

40

CAT分析は、ブラッドフォードの方法により定められるように、等量の蛋白を用いる標準的方法(12)を用い実施した。逆転写酵素活性は、P³²標識TTP及びポッツのミクロプレート(13)を用い測定した。

図4は、研究されたHIV-1ベクターの系列を示す。全てが5'及び3'LTR、5'未翻訳部分並びにgag遺伝子の初めの43 bpを含む。複製コンピテントヘルパーウイルスによりベクターの形質導入を研究するために、ベクターはT細胞系ジャルカット及びジャルカットtatに安定に移入した。次いでこれらのベクター系をHIV-1分離HTLV-III₈により感染させ、後代ウイルスをHIVレセプターCD4を発現する標的細胞に接種した。表5は、表4に示されるベクターに関する2つの標的細胞系により得られた形質導入度を要約する。同一原料中のヘルパーウイルス力価は、一般にジャルカットtat細胞に

50

関し、 ml 当り $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ の範囲であった。

ベクターの L C N L、L H P L 及び L C P L / L P L 系列は、ヘルパーウイルスにより C D 4 発現細胞系に移入できなかった(表 5)。これらのベクターは、一時的 C O S 細胞パッケージング系を用いても転換できなかった。ベクター形質転換に対する阻止は、H T L V - I I I₈によるベクター系の感染後、ビリオンから抽出した R N A のスロットブロット分析が検出するベクター R N A を示さなかったので、R N A パッケージングのレベルで作動しているように見える。ビリオン R N A 試料は、ヘルパーウイルスゲノムを検出し、R N A 修復の有用な方法を提供する pol 遺伝子プローブに強くハイブリダイズした。

カプシド化されるべきこれらのベクターの失敗がベクター R N A の低いレベル発現により説明できるかどうかを決定するため、これらのベクター系由来の全細胞 R N A をノーザンブロッティングにより分析した。完全長ベクター R N A は、スプライ又は内部開始 m R N A が通常より豊富であったが、全てのベクター系に検出された。感染ベクター系の完全長ベクター R N A の相対量が密度計測により決定され、表 6 に示す。完全長 L C P L . P X R N A の量は、伸長 gag 部分の cis 作用抑制配列の結果かも知れないが、非常に低かった。他の非移入可能ベクターはより豊富で、完全長 R N A はヘルパーウイルスゲノム R N A レベルの 6 . 8 % まで存在した。幾つかのパッケージ可能ベクターは、これ(例えば H V P M、L R P L)より低濃度で発現した。従ってベクターカプシド化の欠如は完全長ベクター R N A の低い豊富さに帰することはできない。5'リーダー部分に存在するパッケージングシグナルが H I V - 1 基礎ベクターのカプシド化を行わせるのに十分でないと結論しうる。

gag 及びプロテアーゼコード部分、機能 tat 及び rev 遺伝子並びに部分 env 遺伝子を含むベクター H V P 及び H V H は、野生型ヘルパーウイルスゲノムと同様に効率的に、それぞれ 60 % 及び 19 % パッケージされた(それぞれのパッケージング効率 0 . 33 及び 0 . 22)。これらのベクターは、又、大略、H V P について $2 \times 10^4 \text{cfu}$ 、H V H について $2 \times 10^3 \text{cfu/ml}$ の力価で C D 4 発現標的細胞に移入できた(表 5)。現実の力価は、H T L V - I I I₈ ヘルパーウイルスにより死滅する細胞は、特にジャルカット tat 細胞では生じないので、これよりも高いであろう。これらの複合ベクターは、非常に高レベルで転写され、完全長 R N A に加えて 3 つのスプライス R N A 種を生じた。豊富なパッケージ可能 R N A、例えば H V P の存在は、野生型ゲノムのカプシド化を阻害するか、又は感染ウイルスの力価を減ずるとは見えず、H I V - 1 R N A パッケージング能力は急性感染の間には飽和されないことを示唆した。

ビリオン R N A のノーザンブロット分析は、H V P 及び他のベクターのカプシド化についての直接的証拠を提供した。L T R プローブを用い、2 つの R N A 種を観察した。一つは、又、pol プローブにハイブリダイズし、ヘルパーウイルスゲノムに対応する。他は puro プローブにハイブリダイズし、puro プローブにより未感染 H P V ベクター中で検定する未スプライス H V P R N A と同時移動した。全てのこれらの場合に、野生型ヘルパーウイルス R N A に対応する、高分子量種も見ることができた。この種は、非パッケージ可能ベクター系由来の上清で検出された唯一のものである。H V P 由来のスプライス R N A は、puro で又は L T R でプローブした H V P ベクター系から見出すことができるが、検出可能なスプライス H V P 生成物は、puro プローブ H V P ビリオン R N A により示されるようにカプシド化されない。同じ puro プローブは、L G R P L、L R P L 及び他のパッケージ可能なものからパッケージベクター R N A を証明する(示さず)、しかしながら、ベクター、例えば L C P L は明らかに検出可能ではない。puro プローブビリオン H V P の長い暴露は、野生型ウイルスゲノムの大きさに対応する弱い(faint)高分子量種を明らかにした。これは、多分、H V P / H I V 組換え体である(この種は後で議論される)。それは、明らかに、ベクターカプシド化効率の算出に影響を及ぼすのに不十分な量で存在する。

ウイルス仲介伝達に続く標的細胞中の無傷の H V P ベクターの存在は、puro 遺伝子プローブを用いノーザンブロット分析により確認した。標的細胞は、元のベクターと同じ長さ(5 . 8 kb)の豊富な puro ハイブリダイズ R N A 及びスプライスベクター転写体を含んだ。細胞は、又、元のベクターに存在しない約 9 kb の長さの puro ハイブリダイズ R N A を発現

10

20

30

40

50

する。このRNAは、HVPとヘルパーウイルスの間の組換えの結果であるようである。9 kb組換え体ゲノムは複製コンピテントであり、二番目に、主要なpuroハイブリダイズRNA種と続いて起きるpuro遺伝子形質導入のラウンド(round)を形成した。組換え体ゲノムは、HVPベクターがCOS細胞にパッケージされた場合は観察されなかった。

ベクターHVP Mでは、gag開始コドンは、オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法によりGAGATGGGTからGAGTATACTに分裂した。変異ベクターのカプシド化レベルと形質導入力価は共に、親HVPベクターに比べると7倍減じた(表5)。しかしながら、gag変異の予期されない結果は、細胞内のベクターRNAの定常状態レベルでの著しい減少とスプライスベクター転写物の割合の増加であった。

細胞内のその低濃度のために、HVP Mの分子当りのパッケージング効率は、カプシド化された全体量、従って形質導入効率は低くなったが、HVPのそれよりも大であった。 10

ベクターHVP ΔECをgag - pro部分を除くことによりHVPから導き、それによりgag部分の最初の43 bpのみとした。ベクターは10%の野生型レベルでパッケージされ、HVPのそれより10倍低い、 2×10^3 cfu/mlの力価で形質導入された。HVP ΔECのパッケージング効率は野生株ゲノムのそれと類似したが、その低カプシド化レベルはRNA豊富さを減少させる原因することができる(表6)。即ち、無傷のgag遺伝子は、RNAの高レベル発現を増強するようであるのに、それはベクターパッケージングにとって明らかに必須ではない。これらの発見は、他のベクター対、LRPL及びLGRPLの分析により確認された(以下参照)。

別の一連のプラスミドを作って、env遺伝子のRNAパッケージングへの貢献を測定した。考慮される因子は、HIV-1の構造遺伝子が、mRNA発現を阻害するが、Rev蛋白とenv遺伝子内にあるcis作用Rev反応要素(RRE)との相互作用により克服できるcis作用抑制配列(CRS)を含むことであった。CRS含有RNAの効率的発現のために、RREは保存されなければならない。これは、全てのenv配列(RREを含む)が除去されたベクターLGPLにより明らかに示される。puroを暗号化しているスプライスマRNAは発現されるが、ごくわずかな末スプライスベクターRNAがHIV-1による感染の前又は後にベクター系に見られる。このベクターは、検出できるほどにはカプシド化されず、巨大ウイルス接種材料(5 µlに達して)を用いた場合に、まれにジャルカットtat細胞に移入された(表5)。LGPLの非効率的カプシド化は、末スプライスRNAの極端に低い豊富さによるものであろう。別途には、3.5 kb LGPL RNAは短じかすぎてパッケージできないか、又は特異3'パッケージングシグナルに欠けるのかも知れない。これらの可能性を識別するために、さらに3つのベクターを分析した。 20 30

ベクターLGRPLは、gag配列に加えてRREを補う(span)1.1 kb env断片を含む。従って、完全長ベクターRNAは、Revの存在で蓄積され、ヘルパーウイルスにより本実施例に供される。LGPLと対比的に、このRRE含有ベクターは高レベルでカプシド化され、ほとんど野生型効率を伴い、 5×10^3 cfr/mlの力価を与えた(表6)。従って、LGRPLベクターは効率的RNAカプシド化に必要な全てのシグナルを含み、5'env配列は必要とされない。

RREの下流のenv配列がRNAパッケージングに貢献するかどうかを研究するため、LGRPL ΔBHを産生するLGRPLのHindIII - BamHI断片(ヌクレオチド8141 - 8475)を除去した。本ベクターのカプシド化レベル及び力価は、LGRPLに比べ約3倍減少した。LGRPL ΔBHの細胞内濃度は極端に低いが、しかし、それゆえに分子当りのパッケージング効率は野生型ゲノムのそれよりも有意に大であった(表6)。これは、失われた配列がRNAパッケージングに直接貢献しないことを示唆し、1%の野生型ゲノムRNAレベルよりも少なく発現されたベクターRNAが効率的に転移できることを示す。 40

LRPLベクターは、gagの最初の43 bp以外は全てを欠いている点でLGRPLと異なる。長さわずか2.6 kbの本ベクターRNAが発現され、野生型の6%レベルでパッケージされ、gag配列がパッケージングに必須でないことを示した(表5)。

LRPLに類似するが3'env配列にかけているベクター(例えばLCP L.2 M)はカプシ 50

ド化されなかったので、1.1 kb env断片は重要なパッケージングシグナルを含み、又、cis作用抑制配列を含むベクターの安定な発現に必要であることが想像される。

gag遺伝子に欠けているベクターは緩やかな効率で形質導入できるので、これは外来遺伝子の挿入に適切な部分を明らかにした。しかしながら、HVP Mのgag - pro部分のCAT又はベクターHVC P及びHVHP中のhygro遺伝子による交換は、ベクターカプシド化の有意な減少となった。パッケージングのより感受性のインディケーターである、これらベクターの形質導入力価は、HVP Mのそれよりも20ないし40倍低かった(表5)。これらのベクターのパッケージング効率もHVP Mにより低く、ベクターカプシド化に対するCAT及びhygro遺伝子の直接阻害作用は排除されなかった(表6)。

これらのベクターの形質導入は、標的細胞由来のRNAのノーザンブロット分析により明らかに非常に非常に高程度の組換えと関係した。大量の9 kb組換えゲノムが検出されたが元のベクターはごくわずか又は全く検出されなかった。無傷のベクターの幾らかの転位を示すCAT活性がHVC Pの形質導入後の細胞に検出され、又低レベルのCAT活性が二次転移に続いて時々検出された。HVHP転移から生じる本ベクターによるpuro遺伝子転移が常に組換えの結果であることを示すプロマイシン耐性細胞はハイグロマイシンには耐性でなかった。9 kb組換えRNAの存在を示すが検出可能なHVHPベクターを示さないノーザンブロッティングが、これを確認した。

ベクターRNA豊富さとパッケージング効率との間には、明らかに絶対的な相関はなかった。例えばLGRPLは細胞内にHVPのレベルの1/3で発現したが、しかし2-3倍高いパッケージング効率を有した(表6)。同様の矛盾は、HVP及びHVP Mについても見ることができた。異なる細胞系での異なるベクターの使用も、異なるレベルの発現により、パッケージされた量と直接相関のないことを示した。

ベクターパッケージングは、COS細胞中にベクター及びヘルパーウイルスプラスミドを一過性に同時発現することによっても達成された。全てのプラスミドは複製のSV40オリジンを含有した。本システムにより、弱毒化又は非感染パッケージング構築物を用いることによって感染ウイルスの生成を減少させるか又は排除することが可能であった。弱毒化ウイルス、HXB Δ P 1及びHXB Δ P 2は、パッケージングを分裂させる5'末翻訳部分に欠失を含む。非感染プロウイルスHXB Δ P 1 Δ envは、env遺伝子内に付加的欠失を含み、無傷のビリオンの生成のため相補env発現プラスミドを必要とする。

小ベクターLCP L . PXは、感染又は非感染ヘルパーシステムにより形質導入できなかった。同じ結果は、5'末翻訳部分を含み、gagの長さを変えるがHIV - 1ゲノムの3'末端から配列を欠いている他のベクターでも得られた。HVPベクターは、感染及び非感染パッケージング構築物により緩やかな効率で形質導入された。逆転写酵素活性が正常化されると、本システムでのHVP形質導入はT細胞においてよりも5-10倍少なく効率的であった。形質導入ウイルスのCD4特異性を示す、コロニーはヘラT8細胞を用いて得られなかった。LGRPLベクターも転移したが、HVPよりも約3倍少なく効率的であった。tat又はrevを発現しない本ベクターの形質導入は、感染ウイルスの不存在で有意に減少した。標的細胞中ウイルス蛋白の存在は、恐らくその発現を増強することにより、ベクターのコロニー形成能力を改良するように見える。

COS細胞上清中の感染ウイルスの力価は、TCID₅₀分析ジャルカットtat細胞で測定した。結果は、ミュータントプロウイルスHXB Δ P 1及びHXB Δ P 2の減少した効率を示すが、本レベルの弱毒化がヘルパーウイルス伝播を防止するのに十分でないことをも示す(表7)。感染ウイルスは、HVPベクターが3'LTRを欠く非感染プロウイルスHXB Δ P 1 Δ LTRを同時移入した場合にも回収された。これは、ベクター及びパッケージングウイルスの間の単一組換え事件のみが感染ゲノムを産生するのに必要とされるので、予期し得なかった。感染ウイルスは、gag - pol及びenv蛋白を分離プラスミドから発現させることにより、完全に除去し、これにより2つの組換え事件は感染ゲノムを産生するのに必要とされるであろう。この「二重性(dual)プラスミド」ヘルパーシステムを用い形質導入した。HVP又はLGRPLを含む標的細胞は、6週間のモニター期間の間、逆転写酵素活性又は細胞変性効果の証拠は示さなかった。さらに、これらの培養物由来の上清

10

20

30

40

50

はプロマイシン耐性を新鮮なジャルカットtat細胞に伝え(二次転移)なかった(表7)。
ノーザンブロット分析は、標的細胞中に無傷のベクターRNAの存在を確認し、二重性プラスミドシステムを用いた場合、感染ウイルスの証拠を示さなかった。puro遺伝子プローブによるハイブリダイゼーションは、予期されたベクター転写物を明らかにした。polプローブ(EcoR1断片4648-5743)を用い、ウイルスRNAは、感染ヘルパーウイルス(野生型HXBc2及びΔP1)を用いた場合に示すことができたが、ベクター形質導入を二重性プラスミドヘルパーシステムを用いて達成した場合、検出できなかった。
サウザンブロット分析も、二重性プラスミドパッケージングシステムを用いた場合、ヘルパーウイルスDNAの不存在を確認した。SacI分解ゲノムDNAをプローブするためのLGRPLのSacI断片を用い、HVP(2.20kb及び3.50kb)及びLGRPL(3.88kb)について予期された大きさの断片が見られた。ヘルパーウイルスに対応する3.57kb及び5.33kbのバンドは、感染ヘルパーウイルスを用いた場合に見られたが、二重性プラスミドヘルパーシステムを用いる転移後は見られなかった。感染ウイルスが存在した場合には、付加的断片が見られた。0.4kbのその長さから、本断片はベクター及びヘルパーウイルスの間の組換えの結果であることが推定されうる。これは4.08kbの伸張env+puro断片を生成する。これらの細胞では、組換えRNA(即ち、puroプローブとハイブリダイズするゲノム長RNA)はほとんどかいか全くないことが明らかである。従って、組換えプロウイルスは発現されないか又はベクター含有細胞の選択に続いて産生されない。

表 5

ベクター	CFU / ml ^{a, b}		パッケージング 効率 ^c
	ジャルカットtat	ヘラ T4	
LCNL/LNL	0 ^d	NT ^e	ND ^f
LCPL Series ^g	0	0	ND
LPL series ^h	0	0	ND
LHPL	0	0	ND
LGPL	<1	1	ND
HVH	6.6×10^2	2.3×10^3	19%
HVP	1.7×10^4	1.9×10^4	60%
HVPM	3.1×10^3	4.3×10^3	9%
HVPΔEC	1.8×10^3	3.4×10^3	10%
LGRPL	5.0×10^3	1.1×10^3	25%
LGRPLΔBH	2.1×10^3	3.7×10^3	9.5%
LRPL	1.0×10^3	1.9×10^3	6.4%
HVCP	1.0×10^2	1.0×10^2	<1%
HVHP	75	1.4×10^2	ND

a 10⁴cpm/μlのRT活性に正常化した

b 3又はそれ以上の実験の意味

c 野生型ウイルスに対応するカプシド化レベル

d ジャルカット標的細胞

e 試験せず

f 検出できず

g LCPL.CX、LCPL.HX、LCPL、PX、LCPL2M

h LCPL.CX、LPL.HX、LPL.PX

表 6

ベクター	完全長RNAの 相対豊富さ ^a	カプシド化 レベル ^b	パッケージング 効率
HTLV-III ₂	100	100	1.00
HVP	180	60	0.33
HVH	86	19	0.22
LGRPL	30	25	0.83
HVCP	10	0.4 [*]	0.04
HVPΔEC	8.0	10	1.25
LHPL	6.8	ND	
LRPL	6.4	5	0.88
HVHP	4.2	0.3 [*]	0.07
HVPM	4.1	9	2.20
LCPL.CX	3.5	ND	
LCPL.HX	1.2	ND	
LGPL	1.0	ND	
LGRPLΔBH	0.9	9.5	10.6
LCPL.PX	0.1	ND	

a 感染ベクター系中の完全長ヘルパーウイルスRNAの量のパーセントとして表した

b ビリオン中に存在するヘルパーウイルスRNAのパーセントとして表した

★ 形質導入力価から評価された値

ND 検出できず

表 7

ベクター	パッケージングプラスミド (複数もあり) ^a	Puro ^b cfu/ml ^b		ヘルパー TCID ₅₀ ^c	2° puro 転移
		ヘラ T4	ヘラ T8		
HVP	(i) pHXBhc2	188	0	4.8 × 10 ³	+
HVP	(ii) pHXBAP1 (▼)	140	0	1.5 × 10 ³	+
HVP	(iii) pHXBAP2 (▼)	195	0	2.5 × 10 ³	+
HVP	(iv) pHXBAP1ΔLTR	190	0	10	+
HVP	(v) 二重性プラスミド	101	0	0	-
LGRPL	(i) pHXBc2	60	0	ND ^d	+
LGRPL	(v) dual plasmid	6	0	ND	-
LCPL.PX	(i) pHXBc2	0	0	ND	N/A ^e
LCPL.PX	(v) 二重性プラスミド	0	0	ND	N/A

- a ローマ数字は上記したプラスミドを示す
- b 1000cpm/μlのRT活性に正常化した
- c ジャルカットtat細胞に関する感染ウイルス力価
- d 実施せず
- e 適用できず

結論として、ベクターLRPL及びHVPΔECの成功したパッケージングから示されるように、HIV-1のgag遺伝子はRNAパッケージングに必須ではない。これらのgagベクターは、それらのgag対照物よりも低レベルで発現されたが、それらのパッケージング効率は高く保持された。パッケージング効率の減少は、外来遺伝子がgagの代わりに挿入されたときに観察され、これは外来配列の阻害効果によるであろう。

env遺伝子配列は、ベクター転移でより重要な役割を演じているように見える。HIV-1遺伝子発現の重要な特徴は、gag及びenv遺伝子内でのcis作用反応配列(CRS)の存在である。これらの配列はmRNA発現を阻害するが、その標的RNA配列、env内に位置するRev反応要素(RRE)とRev蛋白との相互作用により克服できる。gag配列を含むがRREに欠けているベクターは、完全長RNAとして発現されなかったし、カプシド化もできなかった。RREを含む1.1 kb env断片の含有は、Revの存在で、未スプライスベクターRNAを蓄積させ、10⁴の因子によりそのようなベクターの形質導入を増強させた。cis作用反応配列を含むベクターの発現に対するその影響に加えて、このenvの部分は必須パッケージングシグナルを含むように思われ、LRPLのパッケージング、さもなければ最小ベクターを指令することが可能であった。

HIV-1ベクターの全ての実用的な応用において、パッケージングウイルスの伝播が排除されなければならない。ベクター、エンベロープ欠損プロウイルス及び分離env発現プラスミドがCOS細胞に同時移入された一過性パッケージングシステムを用い、実施例2はHIV-1ベクターのウイルスフリー転移が可能であり、CD4特異性であることを示す。2つの組換え事件は感染ゲノムを生成するのに必要とされ、そうでない場合にこれが観察された。最適形質転換条件で、ベクター力価は、T細胞(ベクター系)システムでよりもCOS細胞システムで100倍低かった。ベクターパッケージングを必要としたcis配

列は、両細胞型で同一であるように思われ、システムがないと3'env配列に欠けるベクターの転移が観察できた。

幾つかの実験室が、LTR、5'リーダー部分及びある場合には、gagの部分のみを含むRNAの成功したカプシド化又は形質導入を報告した。本明細書での発見はこれらの発表された報告、例えばWO-A-9119798と対照的であるが、ここに示したベクター転移データは広範なRNA分析及びRNAカプシド化の注意深い測定により支持される。ベクター力価はカプシド化レベルと非常によく相関するが、envの3'部分に欠けるベクターのパッケージングも転移も示さなかった。

これらの結果とWO-A-9119798で報告されたものとの間の矛盾は、用いた実験システムに関係しうる。これまで発表された全ての研究は、RNAカプシド化を分析するのに一過性プラスミド発現システムを使用し、これに対し本研究では、HIV-1ベクターがT細胞系で安定に発現され、天然感染の間、複製コンピテントヘルパーウイルスによりパッケージされた。このシステムは、安定に組込まれプロウイルスの発現を模擬し、DNA仲介遺伝子転移の全ての可能性(例えばウイルス粒子をコートングする残余プラスミドDNAとして)を厳格に排除する利点を有する。

ベクターに基づいたHIV-1のパッケージングは主にcis作用シグナルの存在により決定されるが、ベクターRNA豊富さ及び5'異種配列の存在も、パッケージされる量に影響するようである。本明細書に記載される理解されやすい研究に基づけば、5'リーダー部分は明らかにHIV-1ベクターのパッケージングに十分ではなく、3'env配列は、重要なパッケージングシグナルを含む。HIV-1スプライスドナー部位の下流の5'リーダー配列が明らかにRNAパッケージングに十分でない一方で、HIV-1のenv mRNAが検出可能にカプシド化されないの、これらの配列は、カプシド化のためのRNAの選択で決定的役割を演じなければならない。

HIV-1パッケージングシグナルの同定は、遺伝子転移の手段としてHIVの開発に導く。抗ウイルス遺伝子を運ぶHIV-1レトロウイルスベクターは、エイズ治療への潜在的に有効な接近を示し、そのような遺伝子のCD4-発現細胞への特異標的の範囲を与える。本明細書に示されるように安定に組込まれたベクターからRNAをカプシド化する野生型ウイルスの能力は、一群の工業製品CD4+細胞に導入されたパッケージング可能な抗ウイルス構築物が患者自身のウイルスにより伝播される場合、HIVに感染した患者に有用でありうる。RNAカプシド化及びウイルス組立てのより完全な理解が、又、抗ウイルス治療への新しい標的を確認しうる。

配列表

出願人名称：シンジェニックス・リミテッド

発明の名称：MPMV及びHIVに基づく欠損パッケージング非オンコウイルスベクター

整理番号：144858

配列の総数：1

配列番号：1

配列の長さ：121

配列の型：核酸

生物名：MPMV(Mason-Pfizer Monkey Virus)

配列：

ggcgccaac gtggggctgg atacgaggga atttcgtgag gaagacgacg cgttcgccgg 60

ccggcgatta aaagtgaag taaactctct tggccgccgc gggaacctgc cgcgttgac 120

c 121

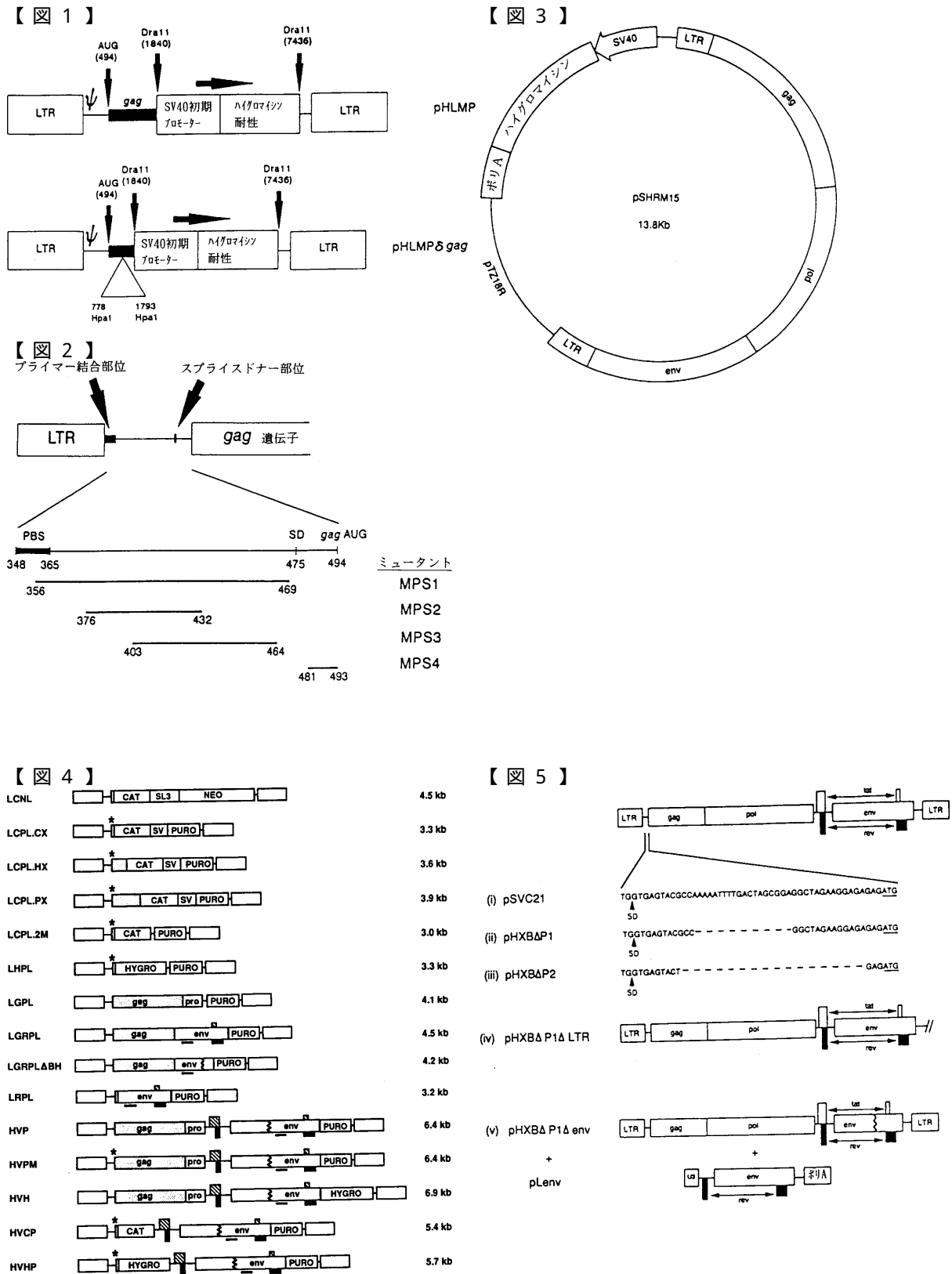


Figure 4

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 9219935.5

(32)優先日 平成4年9月21日(1992.9.21)

(33)優先権主張国 英国(GB)

(72)発明者 レバー、アンドリュー・マイケル・リンジィ

イギリス、ケンブリッジ シービー 1 4 エスエル、マナーズ・ウェイ 1 番

(72)発明者 ハンター、エリック

アメリカ合衆国 3 5 2 9 4 アラバマ、バーミングハム、ユニバーシティー・ステーション、ザ・ユニバーシティー・オブ・アラバマ・アト・バーミングハム、デパートメント・オブ・マイクロバイオリジィ、ベーシック・ヘルス・サイエンス・ビルディング (番地の表示なし)

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 Cell, 1 9 8 6 年, 45(3), 375-385

J.Virology, 1 9 9 0 年, 64(8), 3844-3852

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/WPI (DIALOG)