(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3886531号
(P3886531)
(45)発行日　平成19年2月28日(2007.2.28)　(24)登録日　平成18年12月1日(2006.12.1)

(51)Int.Cl.		F I	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	B
C12N 7/00	(2006.01)	C12N 7/00	

請求項の数 10　(全 18 頁)

(21)出願番号	特願平8-535494
(86)(22)出願日	平成8年5月22日(1996.5.22)
(65)公表番号	特表平11-511005
(43)公表日	平成11年9月28日(1999.9.28)
(86)国際出願番号	PCT/GB1996/001230
(87)国際公開番号	WO1996/037623
(87)国際公開日	平成8年11月28日(1996.11.28)
審査請求日	平成15年3月7日(2003.3.7)
(31)優先権主張番号	9510272.9
(32)優先日	平成7年5月22日(1995.5.22)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者
オックスフォード・バイオメディカ・（ユーケイ）・リミテッド
イギリス国オックスフォード　オーエックス４・４ジーエイ，ジ・オックスフォード・サイエンス・パーク，ロバート・ロビンソン・アベニュー，メダワー・センター
(74)代理人
弁理士　社本　一夫
(74)代理人
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人
弁理士　栗田　忠彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】レトロウイルスベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

レトロウイルスに基づくレトロウイルスベクターであって、当該ベクターは、ＤＮＡプロウイルスの形状であるときに宿主細胞ゲノム中に挿入されることができるパッケージ可能なＲＮＡゲノムを含み、上記ＲＮＡゲノムは、ＤＮＡプロウイルス中に

（ａ）調節因子によって誘導可能である調節されたプロモーターと、

（ｂ）（ａ）におけるプロモーターの転写制御下にある選択された１つ又は複数の遺伝子とを与える配列を含むが、

但し、レトロウイルスのＵ３およびＲの５’ＬＴＲプロモーター機能の代わりに、調節されたプロモーター（ａ）がプロウイルスの５’末端反復配列（ＬＴＲ）中に存在し、そして、選択された１つ又は複数の遺伝子がＬＴＲの間に配置されている、レトロウイルスベクター。

【請求項２】

選択された遺伝子が第１治療遺伝子である、請求項１記載のレトロウイルスベクター。

【請求項３】

レトロウイルスがＭＬＶである、請求項１又は２記載のレトロウイルスベクター。

【請求項４】

構成プロモーターと、第２治療遺伝子又は選択可能なマーカー遺伝子との発現カセットをさらに含む、請求項１～３のいずれか１項記載のレトロウイルスベクター。

【請求項５】

同じ又は異なる転写単位上に存在する複数個の治療遺伝子を含む、請求項１～４のいずれか１項記載のレトロウイルスベクター。
【請求項６】
調節遺伝子の不在下において、ＤＮＡプロウイルスからの選択された１つ又は複数の遺伝子の低い基底発現が存在する、請求項１～５のいずれか１項記載のレトロウイルスベクター。
【請求項７】
プロモーターの制御下にある、請求項１～６のいずれか１項記載のレトロウイルスベクターに関してパッケージ可能なＲＮＡゲノムをコードするＤＮＡ構築体。
【請求項８】
プロモーターがＣＭＶプロモーターである、請求項７記載のＤＮＡ構築体。
【請求項９】
選択された遺伝子が存在せず、構築体が選択された１つ又は複数の遺伝子が挿入されうる挿入部位を有する、請求項７又は８記載のＤＮＡ構築体。
【請求項１０】
請求項７～９のいずれか１項記載のＤＮＡ構築体によってトランスフェクトされたパッケージング細胞ラインであって、請求項１～６のいずれか１項記載のレトロウイルスベクターを産生することができる、パッケージング細胞ライン。
【発明の詳細な説明】
本発明はレトロウイルスベクターと、レトロウイルスベクターのＲＮＡゲノムをコードするＤＮＡ構築体とに関する。特に、本発明は例えばＨＩＶのようなレトロウイルス感染症の治療又は予防の遺伝子療法のためのレトロウイルスベクターに関する。
熱心な研究努力にも拘わらず、ＨＩＶ感染症及びＡＩＤＳの治療法としての低分子量化合物の開発における成功は限定されている。同様に、近い将来において保護又は治療用ワクチンが開発されるようには思われない。この状況は、生物学的治療法にさらに大きく重点を置くべきであるという最近の提案を生じており（Ｌｅｈｒｍａｎ、１９９４）、ＨＩＶ－１感染の臨床アプローチとしての遺伝子療法の見通しに現在非常に関心がもたれている。リボザイム、トランスードミナントタンパク質(trans-dominant protein)、ｓｃＦｖ分子、アンチセンス構築体及びＴＡＲとＲＲＥデコイ（Ｙｕ等、１９９４に概要）を包含する、幾つかの分子が抗ＨＩＶ治療法として提案されている。これらの分子は既に感染した細胞に対する療法と、未感染細胞における保護“細胞内免疫感作”（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ、１９８８）との両方として作用すると考えられる。さらに、毒素(自殺遺伝子(suicide gene))又は免疫学的マーカーの使用も感染細胞を殺して、患者におけるウイルス負担(viral load)を軽減する手段として提案されている。
これらの分子の多くに関して、発現が調節可能であることが望ましい。これは明らかに自殺遺伝子の場合であるが、治療タンパク質の構成的発現も、幾らかの細胞障害性を惹起するか又は宿主免疫反応を招来する可能性があるという点で望ましくないと考えられる。さらに、インターフェロン反応の不適当な誘導を含めて、有害な副作用も細胞内のＲＮＡ分子の発現から起こりうる。ＨＩＶの場合には、ウイルスＬＴＲプロモーター自体が誘導プロモーターである特徴を有して、ウイルスコード化(virally encoded)Ｔａｔトランス作用因子タンパク質の不存在下で低い基底転写レベルを誘導する（Ａｒｙａ等、１９８５）。Ｔａｔ誘導性はＬＴＲのＵ３領域における配列及びＲ領域のＴＡＲ配列の性質である（ＢｅｒｋｈｏｕｔとＪｅａｎｇ、１９９２）。それ故、ＨＩＶ　ＬＴＲが治療遺伝子の発現を誘導しうることは、その発現をＨＩＶによって感染された細胞に限定すると考えられる。幾つかのグループがＬＴＲのこの性質の利用方法の探求を開始しており、ＨＩＶ感染時の遺伝子の誘導発現を実証している（Ｃａｒｕｓｏ等，１９９２、Ｂｒａｄｙ等，１９９４）。
ＭＬＶに基づくレトロウイルスベクターによってＴａｔ誘導治療遺伝子（ＴＩＴＧ）を送達するための現在の方法は、ＴＩＴＧをベクターの内部に入れることである。レトロウイルスＬＴＲ転写単位内に第２プロモーターを配置する（センス方向又はアンチセンス方向

）ことの主要な欠点は、遺伝子発現の減少を生じる可能性があることである（Ｋａｄｅｓｃｈ等，１９８６、Ｗｉｌｌｉａｍｓ等，１９８６、Ｍｃｌｖｏｒ等，１９８７、Ｂｏｗｔｅｌｌ等，１９８８）。活性プロモーターから下流に配置されたときにプロモーターの活性がしばしば低下し（Ｃｕｌｌｅｎ等，１９８４、ＥｍｅｒｍａｎとＴｅｍｉｎ，１９８４、ＥｍｅｒｍａｎとＴｅｍｉｎ，１９８６、Ｏｖｅｒｅｌｌ等，１９８８）、内部プロモーターはベクターＬＴＲ駆動遺伝子(LTR driven gene)を選択しない場合にも長時間培養において不安定でありうることが判明しているので（Ｘｕ等，１９８９、Ｌｉ等，１９９２）、このことは驚くべきことではない。さらに、内部に配置された遺伝子の発現が例えばＨＩＶ　ＬＴＲのような調節されたプロモーターの制御下にある場合には、上流レトロウイルスプロモーターからの転写読み通し(readthrough)も問題になりうる。

５’ベクタープロモーターからの読み通し又は干渉を防止するために幾つかの方法が開発されている。読み通しによる望ましくない発現を防止するための最も簡単なオプションはＴＩＴＧをベクターＬＴＲに対して逆方向に配置させることである（Ｂｒａｄｙ等，１９９４、Ｌｉｅｍ等，１９９３）。しかし、この形態(configuration)は形質導入又は発現のレベルを低下させる可能性があり（Ｓｔｕｈｌｍａｎ等，１９８９、Ｐｏｚｎａｎｓｋｙ等，１９９１）、ベクターＬＴＲに由来するアンチセンス転写体による遺伝子発現を抑制するえられる。

他の可能性は、自己－不活化（ＳＩＮ）ベクターを用いることである。（Ｙｕ等，１９８６）。この場合に、ベクタープラスミド中の３’Ｕ３配列の一部が欠失して、形質導入されたベクター中に非機能性プロモーターを生じる。残念ながら、これらのベクターは低い力価のパッケージされたベクターを生じ（Ｈａｎｔｚｏｐｏｕｌｏｓ等，１９８９）、このようなベクターは現在の遺伝子療法用途に受容されない。

第３方法は、形質導入後に遺伝子とプロモーターが両ＬＴＲに２重コピーで存在するように（ＤＣベクター）、プロモーター－遺伝子カセットを３’ベクターＬＴＲのＵ３領域にクローン化することである（Ｈａｎｔｚｏｐｏｕｌｏｓ等，１９８９）。上流単位からの転写はレトロウイルスプロモーターからの干渉をあまり受けない。しかし、この形態はベクターの３’末端と５’末端とにおけるプロモーター－遺伝子カセットの存在を必然的に生じ、この場合にこれは残留５’ベクターＬＴＲと内部構成プロモーターとの両方からの読み通し発現をまだ受けやすい。Ｕ３領域にプロモーターと遺伝子との両方を含めることは、ＬＴＲのサイズの伸長が安定性の低下に関連するので、不安定性の問題をも招来する可能性がある（Ｒｈｏｄｅ等，１９８７）。

それ故、レトロウイルス調節タンパク質－誘導プロモーターの転写制御下で宿主細胞に遺伝子を導入することができる、新規で、より効果的なレトロウイルスベクターが明らかに必要である。特に、ウイルス力価、即ち、パッケージされたベクターの力価を低下させずにＴＩＴＧの排他的な５’配置を可能にする、例えばＭＬＶに基づくベクターである、このようなベクターが必要である。さらに、形態が遺伝子の、例えばＴａｔ依存性のような、その後の調節タンパク質依存性の発現に有意に干渉すべきではない。さらに、１例としてのＭＬＶに特に関しては、ＭＬＶゲノム５’末端における例えばＨＩＶプロモーターのような誘導プロモーターの導入は、ウイルスゲノムのシス作用性配列に依存する、ＭＬＶライフサイクルの下記プロセスに有意に干渉してはならない：

１．ＭＬＶレトロウイルスコアによるベクターゲノムのパッケージング；
２．ＭＬＶ逆転写酵素（ＲＶ）によるＲＮＡゲノムの逆転写；
３．ＭＬＶインテグラーゼ（ＩＮ）によるゲノムのＤＮＡコピーの組込み。

それ故、本発明は１態様において、ＤＮＡプロウイルスの形状であるときに宿主細胞ゲノム中に挿入されることができ、ＤＮＡプロウイルス中に、

（ａ）調節因子によって誘導可能である調節されたプロモーターと、
（ｂ）（ａ）におけるプロモーターの転写制御下にある選択された遺伝子（単数又は複数）と

を与える配列を含むパッケージ可能なＲＮＡゲノムを含む、第１レトロウイルスに基づくレトロウイルスベクターであって、第１レトロウイルスの５’ＬＴＲプロモーター機能の

代わりに、調節されたプロモーター（ａ）がプロウイルスの５’末端反復列（ＬＴＲ）中に存在し、選択された遺伝子（単数又は複数）（ｂ）がＬＴＲの間に配置されている上記レトロウイルスベクターを提供する。

他の態様では、本発明は、プロモーターの制御下において、本明細書に述べるレトロウイルスベクターのパッケージ可能なＲＮＡゲノムをコードするＤＮＡ構築体を提供する。このＤＮＡ構築体において、選択された遺伝子（単数又は複数）は存在することも存在しないことも可能であるが、存在しない場合にも構築体は選択された遺伝子（単数又は複数）をそれに挿入することができる挿入部位を有する。

他の態様では、本発明は、本明細書に述べるようなＤＮＡ構築体によってトランスフェクトされたパッケージング細胞ラインを含み、本明細書に述べるようなレトロウイルスベクターを産生することができるレトロウイルスベクター産生系を提出する。

さらに他の態様では、本発明は、本明細書に述べるようなレトロウイルスベクターの遺伝子療法のための使用と、このような療法に由来する感染又は形質導入されたターゲット細胞を提供する。

第１レトロウイルスはＭＬＶであることができる、ＭＬＶは最も広範囲に用いられているレトロウイルスベクター系であり、ヒト遺伝子療法用途に用いられている。しかし、この代わりに、他のレトロウイルスも用いることができ、この例はＡＳＬＶ、ＳＮＶ及びＲＳＶを包含し、これらのレトロウイルスの全てがレトロウイルスベクター産生系のためにパッケージング成分とベクター成分とに分割されている。

明らかであるように、ベクターとして機能するためには、本発明によるレトロウイルスベクターは逆転写系（相容性の逆転写酵素とプライマー結合部位）と組込み系（相容性のインテグラーゼと組込み部位）とを有して、プロウイルスへの転換と、宿主細胞ゲノム中への二本鎖ＤＮＡの組込みとを可能にする必要がある。さらに、ベクターゲノムはパッケージングシグナルを含有する必要がある。これらの系とシグナルとは以下でさらに詳細に説明するが、一般にベクターが基づく第１レトロウイルスによって与えられる。本発明によるベクターは特定の第１レトロウイルスに基づくが、これが遺伝子的に又は他の方法で（例えば、パッケージング細胞系の特定の選択によって）変化した形(version)のレトロウイルスであることができることも明らかである。例えば、第１レトロウイルスゲノムがパッケージされ、逆転写を受け、融合する(integrate)ことができるために必要でない、第１レトロウイルスゲノムの部分は、排除することができる。また、例えば異なるｅｎｖ遺伝子を使用することによってベクターを変化させて、ベクターの宿主範囲および感染又は形質導入される細胞種類を変化させることができる。

調節されたプロモーターはある一定の条件下においてのみ選択された遺伝子（単数又は複数）の発現を可能にする。本明細書に述べる好ましい実施態様では、調節プロモーターは第２レトロウイルスからの調節タンパク質によって誘導可能である。しかし、原則として、ある一定条件下でのみ活性である如何なる発現制御要素も本発明によるベクターにおいて使用されて、このベクターによってコードされる遺伝子（単数又は複数）の条件付き発現を可能にすることは明らかである。このことは例えば遺伝子産物の特定細胞種類へのターゲッティングに有用であると考えられる。核因子(nuclear factor)κＢエンハンサーはＴ細胞活性化に応答するので、活性化Ｔ細胞をターゲットするのに用いることができる。遺伝子の貴金属誘導は、メタロチオネインプロモーターの成分を使用することによって達成されることができる。ステロイドホルモンによる発現制御はもう１つの有用なアプローチである。

既に考察した第２ウイルスは、調節された遺伝子応対を与えられることが望ましくかつ誘導プロモーターに作用する、ＨＩＶ又は他の任意のレトロウイルスであることができる。例はＭＭＴＶとＨＴＬＶ－１である。ＨＩＶ－１とＨＩＶ－２とが明らかに重要な候補である。

プロモーター活性を誘導する調節因子は、第２レトロウイルスによって産生され、プロウイルスＤＮＡ上の部位を介しての遺伝子発現を調節することができる任意のタンパク質であることができる。ＨＩＶに関して、これはＴａｔであることが好ましいが、この代わり

に、例えばＲｅｖタンパク質であることができる。ＴａｔはＲのＴＡＲ領域に作用するが、適当に機能するためにはＵ３領域の配列をも必要とする。Ｕ３とＲの両方のある一定の区分は、効果的なＴａｔ応答要素をなお残しながら、除去することができる。ＨＩＶ－２Ｕ３における欠失は低い基底転写レベルを有するプロモーターを生じるが、これらのプロモーターはまだ依然としてＴａｔに応答性である（Ｂｒａｄｙ等，１９９０）。したがって、ＨＩＶが第２レトロウイルスである調節タンパク質誘導プロモーターは好ましくはＨＩＶからのＵ３とＲの両方の機能性部分である。或いは、ＨＩＶ　Ｔａｔタンパク質に応答する、他のレトロウイルスからのある一定のＵ３及び／又はＲ配列又はそれらの部分（例えば、ＨＩＶからのＲに結合したＲＳＶからのＵ３）が使用可能である。また、ＨＩＶ－２からのＵ３は第２レトロウイルスとしてＨＩＶ－１と共に機能する。

調節されたプロモーターの制御下の選択された遺伝子は、特定の目的を果たす遺伝子産物をコードする、例えば、これは検出可能な産物を生成することによってマーカーとして作用するか又は好ましくは、これはその産物が感染若しくは疾患に対して、特に例えばＨＩＶのような第２レトロウイルスによる感染に対して有効である治療遺伝子である。治療遺伝子は、例えばアンチセンスＲＮＡ、リボザイム、ターゲットタンパク質のトランスドミナント陰性(transdominant negative)突然変異体、毒素、条件付き毒素、抗体又はヘルパーＴ細胞又は細胞傷害性Ｔ細胞を誘導する抗原、一本鎖抗体又は腫瘍サプレッサータンパク質をコードすることができる。

２個以上の遺伝子が存在し、調節されたプロモーターの転写制御下にある場合には、例えばピコルナウイルスＲＮＡからの内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）が存在して、両遺伝子が単一転写体から翻訳されることを可能にする。ＩＲＥＳ配列を組込むレトロウイルスは他人によって構築されている。

第２遺伝子又はさらなる遺伝子も別のプロモーターの制御下で存在することができる。この遺伝子は例えば選択可能なマーカー又は、上記治療剤群に含まれる他の治療剤をコードすることができる。この遺伝子の発現は構成的であることができ；選択可能なマーカーである場合には、これはトランスフェクトが成功した(successfully transfected)パッケージング細胞、又は特に高い力価のレトロウイルスベクターを産生しているパッケージング細胞を選択するために有用でありうる。或いは又はさらに、選択可能なマーカーは、レトロウイルスベクターによる感染が成功し、それら自身のゲノムに組込まれたプロウイルスを有する細胞を選択するために有用でありうる。遺伝子療法をおこなう１つの方法は、患者から細胞を抽出し、抽出した細胞をレトロウイルスベクターによって感染させて、これらの細胞を患者に戻して再導入することである。患者に細胞を再導入する前に、感染若しくは形質導入された細胞を豊富にする手段、又は感染若しくは形質導入されたような細胞のみを陽性として選択する手段を提出するために、選択可能なマーカーを用いることができる。この手段は療法の成功の機会を高めることができる。選択可能なマーカーは例えば薬物耐性遺伝子、代謝酵素遺伝子、又は当分野で既知の任意の他の選択可能なマーカーであることができる。

１より多くの調節された遺伝子の他に１より多くの構成的に発現された遺伝子が存在しうることは理解されるであろう。

しかし、レトロウイルスベクターの多くの遺伝子療法用途に関して、マーカー遺伝子の発現の選択が実現可能でも必然的でもないことは明らかであろう。実際に、選択マーカーの発現が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究に便利であっても、ｉｎ　ｖｉｖｏでは、外来マーカータンパク質に対して向けられる細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＲ）の不適当な誘導のために有害でありうる。また、ｉｎ　ｖｉｖｏ用途に対しては、内部プロモーターを有さないベクターが好ましいと考えられる。内部プロモーターの存在は例えば、パッケージング細胞ラインから得られる形質導入力価と組込まれたベクターの安定性とに影響を与える可能性がある。したがって、ニシストロン性(bicistronic)又は多シストロン性(polycistronic)であることができ、１つ又は２つ以上の抗ＨＩＶ遺伝子をコードする単一転写単位ＴＩＮベクターが、ｉｎ　ｖｉｖｏで用いるために好ましいベクター設計であると考えられる。

パッケージ可能なＲＮＡゲノムをコードする、本発明によるＤＮＡ構築体は好ましくは、

第１又は第２レトロウイルス以外のソースから生じるプロモーターを含む。産生体細胞ライン(producer cell line)においてベクターＲＮＡの高いレベルの発現を生じる、例えばＣＮＶプロモーターのような、強力なプロモーターが特に好ましい。
次に、本発明を添付図面を用いてさらに説明する：
図１は本発明によるベクターの例示的形態を示す：
（ａ）単一治療遺伝子を有する単一Ｔａｔ誘導転写単位；
（ｂ）条件付き毒素と、薬物選択マーカー又は第２治療遺伝子用の構成的プロモーター（ＳＶ４０）とを有するＴａｔ誘導転写単位；
（ｃ）２治療遺伝子とＩＲＥＳとを有する単一Ｔａｔ誘導転写単位；および
（ｄ）２治療遺伝子を有し、１つはリボザイムである単一Ｔａｔ誘導転写単位。
図２は（Ａ）本発明によるＭＬＶに基づくＴａｔ誘導ベクターの原理と（Ｂ）ｐＴＩＮ４１４とを示し；
図３Ａと３Ｂとは本発明による特定の原型ベクターｐＴＩＮ５０２とｐＴＩＮ４１４とを示し；
図４は実施例に用いた種々なレトロウイルスパッケージング成分とベクターと示し；
図５は実施例２．３からの結果を示し：ＨＩＶ－１感染がＴＩＮベクター５’ＬＴＲからの発現を誘導する；
図６は実施例２．４からの結果を示し：抗ＨＩＶ　ＴＩＮベクターがＨＩＶ－１感染から保護する；
図７は実施例２．５からの結果を示し：単一転写単位ＴＩＮベクターによるＨＩＶ－１感染からの保護である。
ＭＬＶとＨＩＶとを含むベクターの特定の例を与える図２Ａは、本発明によるベクターを構築することができる要素を示す。図２Ａは５’末端から、第２レトロウイルスのＲ領域の少なくとも機能的部分と、第１レトロウイルスのＵ５領域の全て若しくは機能的部分と、第１鎖逆転写のための第１レトロウイルスの機能的プライマー結合部位と、第１レトロウイルスの機能的ＲＮＡパッケージング部位と、第２鎖逆転写のための第１レトロウイルスの機能的プライマー結合部位と、治療遺伝子がＤＮＡコピーに挿入されうる部位と、第１レトロウイルスの組込み系によって認識される短い（１０～１００ヌクレオチド）配列と、第２レトロウイルスのＵ３領域の全て若しくは実質的な部分と、５’末端のＲ領域に相当する第２レトロウイルスのＲ領域とを含むパッケージ可能なＲＮＡゲノムを示す。
図２Ａはさらに、逆転写とベクターの組込みとから得られる組込み済みプロウイルスを示し、このプロウイルスはセンス鎖上に５’～３’を表示する下記組成：第１レトロウイルスの組込み系によって認識される第１レトロウイルスからの短い（１０～１００ヌクレオチド）配列と、第２レトロウイルスのＵ３領域の全て若しくは実質的な部分と、第２レトロウイルスのＲ領域の機能的部分と、第１レトロウイルスの組込み系によって認識される、第１レトロウイルスのＵ５領域の全て若しくは機能的部分と、第１レトロウイルスの機能的パッケージング部位とプライマー結合部位と、治療遺伝子が第２レトロウイルスのＬＴＲプロモーターの制御下にあるように挿入されることができる部位と、第１レトロウイルスからの機能的第２鎖合成プライマー部位と、第１レトロウイルスの組込み系によって認識される第１レトロウイルスからの短い配列（１０～１００ヌクレオチド）（この短い配列は前の短い配列と同じである）と、第２レトロウイルスのＵ３領域の全て若しくは実質的な部分（この成分は前のＵ３領域と同じである）と、第２レトロウイルスのＲ領域の機能的部分（この成分は前のＲ領域と同じである）と、第１レトロウイルスの組込み系によって認識される、第１レトロウイルスのＵ５領域の全て若しくは機能的部分とを有する。
形質導入後に５’ベクターＬＴＲとしてＴａｔ誘導プロモーターを含有するＭＬＶに基づくＴａｔ誘導（ＴＩＮ）ベクターの新規なシリーズを、我々は構築した。ＴＩＮベクターは、ＭＬＶ機構(machinery)によるベクターゲノムの効率的なパッケージングと、逆転写と、組込みとのために必要であることが予想される特徴を有する。逆転写中に形成されたハイブリッドＨＩＶ－１／ＭＳＶ５’ＬＴＲは、Ｔａｔの不存在下でヒト細胞中の低レベ

ルの発現を指示するが、Ｔａｔ発現プラスミドのトランスフェクション又はＨＩＶ－１による感染後には高度に誘導されるというＨＩＶ－１プロモーターの特徴を有する。形質導入されたＴＩＮベクターがＨＩＶ－１感染後に高度に誘導されるというそれらの能力を少なくとも６か月間保有することを実証するデータを、我々は有している。さらに、産生体細胞（標準ＭＬＶパッケージングライン又は我々の一過性トランスフェクション系（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５））における高レベルのベクターゲノムの産生を促進するために、我々は天然ベクターＭＬＶ　ＬＴＲではなくＣＭＶプロモーターから駆動されるパッケージ可能なベクター転写体を設計している。

これらのベクターの幾つかの形態が考えられる（図１）。これらのベクターの中の最も簡単なものはＨＩＶ　ＬＴＲ（ａ、ｃ及びｄ）からの治療遺伝子及び／又は選択可能な遺伝子の排他的な発現を可能にする。我々は、５’遺伝子のＴａｔ誘導発現と、３’遺伝子の構成的発現とを可能にする２つのプロモーターベクターのシリーズをも構築している（ｂ）。２つのプロモーターＴＩＮベクターは例えば構成的に発現された薬物耐性遺伝子からの形質導入された細胞の選択と、ＨＩＶ感染時の治療遺伝子のＴａｔ誘導発現とを可能にする。あるいは、これらのベクターを用いて、ＨＩＶに対する２段階アタックを開始して、１つの抗ＨＩＶ分子の構成的発現と第２遺伝子のＴａｔ誘電発現の両方を可能にすることができる。このような使用の例は、トランスドミナントタンパク質の構成的発現と、感染が細胞に固定するならば自殺遺伝子の“ラスト　リゾート（last resort）”発現である。ＴＩＮベクターにおける多重転写単位の使用はもちろん、多重翻訳単位を有するが単一ＨＩＶ　ＬＴＲ形態の使用も内部リボソーム侵入配列（ＩＲＥＳ）を用いることによって可能である（ｃ）（Ａｄａｍ等，１９９１）。ｍＲＮＡの翻訳されない領域に付加的な抗ＨＩＶ成分、例えばリボザイム配列（ｄ）を組込むことも単一Ｔａｔ誘導転写体の範囲内で可能であると考えられる。図１において、ベクターの要素は次のように表される：ＨＩＶ－Ｔａｔ－誘導ＨＩＶプロモーター；ＴＫ－チミジンキナーゼ；ＳＶ－ＳＶ４０プロモーター；ネオ細菌ネオマイシン耐性遺伝子；ＩＲＥＳ内部リボソーム侵入配列；Ｒｚリボザイム。

我々はまた、Ｔａｔの不存在下でＨＩＶ　ＬＴＲプロモーターから低い基底レベルの転写が下流の構成的プロモーターを干渉する問題を軽減し、形質導入済み細胞における構成的遺伝子の安定な発現を容易にすることも予想している。Ｔａｔの不存在下におけるＨＩＶプロモーターに不活化も、これらのベクターの重要な安全性であり、組込まれたベクターに隣接する下流細胞遺伝子の不適当な転写の危険性を最小にする。

この系の明らかな利点は、標準的なＭＬＶに基づくベクターテクノロジーによって形質導入されることができる単純な転写単位からの遺伝子発現のＨＩＶ制御を達成することである。この系を生成するために必要な成分の組合せは今までに組み立てられていない。

ＭＬＶに基づくＴａｔ誘導（ＴＩＮ）ベクターの成分

我々は標準的ＭＬＶ成分によってパッケージ可能である一連のベクターを構築しているが、これらは逆転写されることができ、細胞の感染又は形質導入後にＭＬＶ機構によって組み込むことができ、形質導入済みベクターから治療遺伝子のＴａｔ誘導発現を可能にする。このようなベクターの基本的成分は次のとおりである（図２）：

１．Ｔａｔ誘導性．ＨＩＶ　ＬＴＲプロモーターのＴａｔ誘導性はこのプロモーターのＵ３領域における配列と、またＲにおけるＴＡＲ要素との性質である（Ｂｅｒｋｈｏｕｔ　ｅｔ　Ｊｅａｎｇ，１９９２）。さらに、ＨＩＶ－２からのＵ３領域とＲＳＶとを包含する、幾つかの他のプロモーターもＨＩＶ－１　Ｕ３領域に代わって、Ｔａｔトランス活性化を可能にする（Ｌｉｕ等，１９９４）。逆転写後に５’ＬＴＲにおいてＵ３要素が出現するためには、Ｕ３要素がウイルスＲＮＡの３’ＬＴＲ中に存在しなければならない。それ故、このベクターはＨＩＶ　Ｕ３と５’ＬＴＲにおけるＲ配列とを含有する。

２．逆転写．ＭＬＶ　ＲＴはプライマー結合部位（ＰＢＳ）において逆転写を開始する。初期（－）鎖合成はＵ５及びＲ配列に伸長して、第１“ストロングストップ(strong stop)”ＤＮＡ鎖を形成する。次にＲＴのＲＮＡｓｅＨ部分がこのハイブリッド中のＲＮＡを分解し、暴露されたＤＮＡをプロウイルスの３’ＬＴＲ中の相同Ｒ領域とハイブリダイズ

することを可能にする。５’と３’Ｒ領域の相同はポリメラーゼが鎖を切り替えて、３’ＬＴＲから（－）鎖に沿って合成を続けることを可能にする。（＋）鎖ＤＮＡ合成はゲノムＲＮＡ鎖のＲＮＡｓｅ分解後のポリプリントラクト(tract)におけるＲＮＡフラグメントの選択的保有によって開始される（ＫａｔｚとＳｋａｌｋａ，１９９４において考察）。それ故、ベクターに含有されるＭＬＶポル指示(directed)逆転写のための最小必要条件は（－）鎖ＤＮＡ合成を開始するためのＰＢＳと、（＋）鎖ＤＮＡ合成を開始するためのＰＰＴと、第１鋳型切り替えを可能にするための同じ５’Ｒ配列と３’Ｒ配列である。同じＲ配列のための必要条件は、５’ＬＴＲと３’ＬＴＲの両方にＨＩＶ　Ｒ配列を有することによって満たされる。さらに、５’Ｕ５領域における第２構造も逆転写の開始のために重要であることを示唆する証拠が存在するので（Ｃｏｂｒｉｎｋ等，１９９１）、我々はＭＬＶ　Ｕ５配列を５’ＬＴＲ中に維持している。３’Ｕ５配列はゲノムＲＮＡ転写体中に出現しないが；ゲノム転写中の３’Ｒ／Ｕ５ボーダーにおける正確な停止を保証するために、我々は３’ＬＴＲにＨＩＶ　Ｕ５領域を用いる。

３．組込み．逆転写分子の末端は、レトロウイルスインテグラーゼが認識する２～２３ｂｐの短い、時には不完全な、逆位反復配列を含有する（ＫａｔｚとＳｋａｌｋａ，１９９４において考察）。ＭＬＶに関しては、線状モデル基質の末端における９塩基のみでｉｎ　ｖｉｔｒｏ組込み分析系におけるほぼ野生型レベルの組込みのために充分であることが実証されている（ＢｕｓｈｍａｎとＣｒａｉｇｉｅ，１９９０）。これらの配列はベクターの３’Ｕ３領域と５’Ｕ５領域と末端から駆動される。この必要条件は３’Ｕ３の５’末端におけるＭＬＶ配列の３６塩基と、ＭＬＫ５’Ｕ５領域の全体とを含有するベクターによって満たされる。

４．パッケージング成分．レトロウイルス粒子中へのベクターゲノミの効率的なパッケージングはシス作用性配列の数に依存する（ＬｉｎｉａｌとＭｉｌｌｅｒ，１９９０において考察）。最も重要な配列はパッケージングシグナル、即ち、ゲノムの５’領域におけるＲＮＡの高度に組織化された領域(highly structured region)である。さらに、ｇａｇ　ｐ１５における配列を含めて、ゲノムの他の領域はパッケージング効率を高めることが判明している。この領域は例えばＬＸＳＮのような標準的ＭＬＶレトロウイルスベクターに包含され（ＭｉｌｌｅｒとＲｏｓｍａｎ，１９８９）、我々の構築体にも保持される。

５．一過性トランスフェクション後の高力価レトロウイルスストック

我々は最近、一過性トランスフェクションによって高力価レトロウイルスベクター（10^7／ｍｌ）を迅速に産生するための系を考案している（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５）この系の重要な特徴は、強力なＣＭＶプロモーターが産生体細胞ラインにおけるベクターＲＮＡの高レベル発現を駆動しており、ベクターＲＮＡの転写開始部位が通常のＬＴＲ指示開始部位と正確に同じであるように配置されていることである。これを達成するために、我々５’ＬＴＲにおけるＨＩＶ　Ｒ領域の開始に隣接するその転写開始部位までにＣＭＶプロモーターを配置している。この原理は、レトロウイルス転写単位の統合性が維持される限り、他の異種プロモーターにも適用されることができる。

この系はハイブリッドＭＬＶ－ＨＩＶベクターに関して述べられているが、同じ原理が他のレトロウイルス組合せにも適用されることができ、この場合には１つのレトロウイルスはトランスで与えられるそれ自身のパッケージング成分（例えば、ＳＮＶ、ＲＳＶ、ＡＳＬＶ等）によって必要とされるシス作用性配列に寄与し、他方のレトロウイルスはそのＬＴＲプロモーターの条件付き発現という性質のために用いられる。このようなレトロウイルスプロモーターの他の例はＨＴＬＶ－１プロモーター（Ｔａｘタンパク質に依存する）とステロイドーホルモン誘導ＭＭＴＶ　ＬＴＲ（Ｍａｊｏｒｓ，１９９０において考察）である。例えば、自殺遺伝子の発現を指示するためのＨＴＬＶ－１　ＬＴＲの使用は、成人Ｔ細胞白血病の治療法として用途を見い出すことができる。

実施例

実施例１

構築の詳細

これらの実施例に用いられる種々なレトロウイルスパッケージング成分とベクターとを図

４に示す。プラスミドｐＨＩＴ６０はＭＬＶｇａｇ－ｐｏｌ発現プラスミドである（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５）。ｐＨＩＴ４５６はプラスミドＳＶ－Ａ－ＭＬＶ－ｅｎｖに由来するＭＬＶアンホトロピックエンベロープ発現プラスミドであり（Ｐａｇａ等，１９９０）、エコトロピック(ecotropic)発現構築体ｐＨＩＴ１２３と本質的に同じである（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５）。レトロウイルスベクターｐＨＩＴ１１１（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５）はＬＺＳＮの誘導体であり（Ａｄａｍ等，１９９１）、ｐＨＩＴ４１４はＴＩＮベクター同等物である。これに続くＴＩＮベクターは特有のＳｐｅｌ部位とＮｈｅｌ部位との間の内部配列の置換によってｐＴＩＮ４１４から誘導された。Ｓｐｅｌ部位はｌａｃＺ遺伝子の上流の翻訳されないｇａｇコーディング領域内に配置され、Ｎｈｅ１部位はＭＬＶ配列とＨＩＶ－１配列の接合部における３’Ｕ３領域に存在する。プラスミドｐＴＩＮ５００はｐＢＡＢＥｐｕｒｏからのＳｐｅｌ－Ｎｈｅｌ内部フラグメントを含有する。ベクターｐＴＩＮ５０１は、フランキングＥｃｏＲ１部位を組込み、ｐＴＩＮ５００の固有ＥｃｏＲＩクローニング部位中に挿入されたＰＣＲプライマーを用いてプラスミドｐＭ１０（Ｍａｌｉｎ等、１９８９）から増幅されたＲｅｖＭ１０コーディング配列を含有する。ｐＴＩＮ５０２は、ｐＴＩＮ５０１からＳＶ４０プロモーターとプロマイシン（ｐｕｒｏ）耐性遺伝子とをこのカセットに隣接するＡｃｃ１部位を用いて除去することによって生成された。

原型ＴＩＮベクターの２つを図３に示す。図３Ａは単純な１つの遺伝子ＴＩＮベクター、ＴＩＮ５０２を示すが、これはトランスドミナントＲｅｖタンパク質ＲｅｖＭ１を発現する（Ｍａｌｉｍ等，１９８９）。図３Ｂは、内部ＳＶ４０プロモーターからのネオマイシン耐性を構成的に発現し、ＨＩＶ　ＬＴＲの制御下でＬａｃＺ発現を有する２つのプロモーターベクターＴＩＮ４１４を示す。ＴＩＮ４１４の詳細な構築を例として以下に示す。図３Ａと３Ｂでは、ＨＩＶ－１配列の番号付けはＨＸＢ２に関するＬｏｓ　Ａｌａｍｏｓデータベース転換によるものである。ＭＬＶ誘導配列は、ベクターＬＸＳＮ名称によって番号付けされた（Ａ）ベクターＬＸＳＮ（Ｇｅｒｂａｎｋ受入番号Ｍ２８２４８）と；（Ｂ）ベクターＬＺＳＮ（Ａｄａｍ等，１９９１）からのものである。（Ａ）におけるＲｅｖＭ１０はＥｃｏＲ１制限部位を含有するプライマーを用いて、プラスミドｐＭ１０（Ｍａｌｉｎ等，１９８９）から増幅された。

ＴＩＮ４１４の詳細な構築

ＣＭＶプロモーターと、ＭＬＶベクターＬＺＳＮ（Ａｄａｍ等，１９９１）とＨＩＶ－１プロウイルスクローンＷ１３（Ｋｉｍ等，１９８９）とに由来する配列の位置(co-ordinate)が表示される。標準的組換えＤＮＡ技術とさらに、分子の異なる部分の間の正確な接合を生成するための組換えＰＣＲとを用いて、分子が生成される（Ｈｉｇｕｃｈｉ，１９９０）。

具体的には、

１．５’ＣＭＶ駆動ＬＴＲの構築

プラスミドｐＰＥ６１１（Ｂｒａｄｄｏｃｋ等，１９８９）はＨＩＶ－１　Ｒ領域の始点（位置＋１～＋８０）に正確に結合したヒトＣＭＶプロモーター（－５２１から＋１まで）を含有する。このプラスミドからのＸｂａＩ－ＢａｍＨ１フラグメントをクローニングベクターｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に連結して、プラスミドｐＲＶ４０４を得た。鋳型としてプラスミドｐＬＮＳＸを用いて、プライマー５’－ｇｃｇａｇｃｔａｇｃｔｔｃｇａａｔｃｇｔｇｇｔｃｔｃｇｃｔｇｔｔｃｃｔｔｇｇ－３’－［配列番号：１］と５’－ｇｇｃｃｇｃｔａｇｃｇｔｔｃａｇａａｃｔｃｇｔｃａｇｔｔｃｃａｃｃａｃ－３’［配列番号：２］とを用いて、実施した。このようにして得られたＰＣＲ生成物をＮｈｅＩによって消化させて、そのＮｈｅＩ部位においてｐＲＶ４０４に連結して、プラスミドｐＲＶ４０５を得た。配列５’－ｔｔａａｇｃｃｔｃａａｔａａａｇｃｔｔｇｃｃｔｔｇａｇｔｇｃｔｔｃａｔｃ－３’［配列番号：３］と５’－ｃｇｇａｔｇａａｇｃａｃｔｃａａｇｇｃａａｇｃｔｔｔａｔｔｇａｇｇｃ－３’［配列番号：４］の２つのオリゴヌクレオチドを一緒にアニールして、ＡｆｌｌｌとＢｓｔＢ１の上に存在するオーバーハング(overhangs)に対応するいずれかの端部に一本鎖領域を含有する短い二

重鎖（duplex）を形成した。この分子をＡｆｌｌｌとＢｓｔＢ１によって切断されたプラスミドｐＲＶ４０５に連結して、プラスミドｐＲＶ４０６を得た。

２．３’ＬＴＲの構築

ｐＬＮＳＸからＨｉｎｄＩＩＩ－ＸｂａＩフラグメントをクローニングベクターｐＳＰ７２に連結して、プラスミドｐＲＶ４００を得た。プラスミドｐＢＸ＋は、ＨＩＶ－１ゲノムからの全３’ＬＴＲを含有するＷ１３からのＢａｍＨＩ－ＸｂａＩフラグメントを含有する。ＰＣＲ増幅をプライマー５’－ｃｃｇｃｇｃｔａｇｃｇａｔａｔｃｃｔｔｇａｔｃｔｇｔｇｇａｔｃｔａｃｃａｃ－３’［配列番号：５］と５’－ｇｃｇａｇｇｇｔａｃｃｇｔｃｇａｃｔｇｃｔａｇａｇａｔｔｔｔｃｃａｃａｃｔｇａｃ－３’［配列番号：６］を用いてｐＢＸ＋上で実施した。ＰＣＲ生成物をＫｐｎＩとＮｈｅＩとによって消化させて、ＫｐｎＩとＮｈｅＩとによって消化されたプラスミドｐＲＶ４００に連結して、プラスミドｐＲＶ４０１を得た。ｐＲＶ４０１のＣｌａＩ－ＫｐｎＩフラグメントを、ＣｌａＩとＫｐｎＩとによって消化されたｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔに連結して、プラスミドｐＲＶ４０８を得た。

３．内部配列の添加

ｐＲＶ４０６からのＳａｃＩＩ－ＳｐｅＩフラグメントをプラスミドｐＲＶ４０８に連結して、プラスミドｐＲＶ４１２を形成した。ｐＲＶ４１２からのＳｐｅＩ－ＮｈｅＩフラグメントをＬＺＳＮからのＳｐｅＩ－ＮｈｅＩフラグメントと置換して、ベクターｐＴＩＮ４１４を得た。

実施例２

特徴付け

１．ベクターＴＩＮ４１４は標準ＭＬＶ成分によって効率的に形質導入される

我々が以前に発表したプロトコール（Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５）に従って２９３Ｔ細胞の一過性トランスフェクションによって、レトロウイルスベクターを生成した。２つのプラスミド成分ーｇａｇ－ｐｏ１発現プラスミド（ｐＨＩＴ６０）とアンホトロピック又はエコトロピックエンベロープ構築体（それぞれ、ｐＨＩＴ４５６又はｐＨＩＴ１２３）上に、ＭＬＶパッケージング成分をトランスで供給する。ベクターゲノム成分は標準ＭＬＶベクター（ｐＨＩＴ１１１）又は同等なＴＩＮベクター、ｐＴＩＮ４１４であった。トランスフェクションの４８時間後に培養上清を回収し、０．４５μｍフィルターに通して濾過して、８μｇ／ｍｌポリブレンの存在下でターゲット細胞に形質導入するために４時間用いた後に、新鮮な培地を添加した。トランスフェクションの４８時間後に得られたウイルスストックを用いて、ＮＩＨ３Ｔ３細胞（エコトロピックエンベロープ）又はＨｅＬａ細胞（アンホトロピックエンベロープ）を感染させ、Ｇ４１８（０．４ｍｇ／ｍｌ）によって選択されたコロニーに安全に形質導入した。１０日間の選択後に各レトロウイルスストックの力価を、Ｓｏｎｅｏｋａ等，１９９５の記載に従って算出した（表１）。これらのデータから、ベクターＴＩＮ４１４の関連するＭＬＶベクターＨＩＴ１１１と丁度同じように効率的に形質導入されることが理解できる。このことは、ＴＩＮベクター構築体がＭＬＶによって効率的にパッケージされ、逆転写され、組込まれることを実証する。

２．形質導入済みベクターＴＩＮ４１４からのＬａｃＺ発現はＴａｔ誘導性である

ベクターｐＨＩＴ１１１又はｐＴＩＮ４１４によって形質導入されたＧ４１８耐性ＨｅＬａ及びＮＩＨ３Ｔ３細胞の集団を上述したように製造して、ＨｅＬａ－１１１、３Ｔ３－４１４等と名付けた。これらの集団は内部ＳＶ４０プロモーターからのネオマイシン耐性の発現のために、Ｇ４１８に対して十分に耐性であった。β－ガラクトシダーゼ活性のレベルを４集団の全てにおいて、Ｔａｔ発現プラスミド又は対照ＣＭＶベクタープラスミドによるトランスフェクション後に測定した。表２に示す結果は、Ｔａｔの不存在下ではＴＩＮ４１４ＨＩＶＬＴＲプロモーターからのβ－ガラクトシダーゼ活性レベルが低いが、ＨｅＬａ細胞中のＴａｔによって発現が非常に増大することを実証する。予想されたように、Ｔａｔは齧歯類ＮＩＨ３Ｔ３細胞ライン中ではＨＩＶＬＴＲ活性に殆ど影響を与えなかった。このことは抗ＨＩＶ治療遺伝子のＴａｔ仲介誘導のモデル系を表す。

３．ベクターＴＩＮ４１４からのＬａｃＺ発現はＨＩＶ感染によって誘導可能である

ｐＴＩＮ４１４、ｐＨＩＴ６０及びｐＨＩＴ４５６又はｐＨＩＴ１１１、ｐＨＩＴ６０及びｐＨＩＴ４５６を上記のように２９３Ｔ細胞のトランスフェクトした。上清を用いて、前単球細胞ラインＵ９３７にｐＨＩＴ１１１（図５Ａ～Ｃ）又はｐＴＩＮ４１４（図５Ｄ～Ｆ）によって形質導入した。Ｕ９３７細胞はＣＤ４＋であり、ＨＩＶ－１によって効率的に感染されることができる。ネオマイシン耐性集団をＧ４１８によって１４日間選択して、十分に形質導入された集団を得て、標準β－ガラクトシダーゼ染色方法を用いてＬａｃＺ発現に関して分析した（図５Ｂと５Ｅ）。Ｕ９３７－ＨＩＴ１１１集団は高レベルのｌａｃＺ発現（約２．５％の細胞が目視可能に青色に染色）を示したが、Ｕ９３７－ＴＩＮ４１４集団は示さなかった（＜０．１％細胞が目視可能に青色）。各集団からの２ｘ１０^{6}細胞をペレット化し、細胞を１ｍｌの６ｘ１０^{5}ＴＣＩＤ５０含有HIV_{111B}ウイルス（１μｇ／ｍｌｐ２４）中に再懸濁させることによってＨＩＶ－１に感染させた。３７℃における２時間のインキュベーション後に、さらに５ｍｌの培地を細胞に加えて、細胞を４日間インキュベートして、ウイルス拡散を可能にした。上清のサンプルを３～４日間毎に採取して、既述されたように（Ｃａｎｎｏｎ等，１９９４）Ｑｕａｎｔ－Ｔ　ＲＴキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を用いて逆転写酵素（ＲＴ）活性に関して分析した（図５ＡとＤ）。さらに、細胞のサンプルを種々な時点において採取して、固定細胞のＸ－ｇａｌ染色（図５ＢとＥ）と細胞抽出物中の酵素活性に関する発光分析（図５ＣとＦ－ＲＬＵは相対的光単位である）の両方を用いてβ－ガラクトシダーゼ発現に関して分析した。Ｕ９３７－ＨＩＴ１１１集団におけるβ－ガラクトシダーゼ発現は感染後１０日目まで青色に見える約２．５％細胞に一定に留まり、１４日目に最大１１％までの上昇が観察された。これとは対照的に、Ｕ９３７－ＴＩＮ４１４集団におけるβ－ガラクトシダーゼ発現はＨＩＶ－１感染後高度に誘導され、未感染集団における＜０．１％の青色染色細胞から感染後１４日目の９６％まで上昇し、この集団におけるＨＩＶ－１感染の拡散を示した。発光分析でモニターしたβ－ガラクトシダーゼ活性も同様に上昇した。１４日目における酵素活性量の比較はＵ９３７－ＨＩＴ１１１集団に関しては１．７の感染：未感染比を生じたが、Ｕ９３７－ＴＩＮ４１４集団は感染細胞の１０２倍の増加を示した。これらのデータはＨＩＶ－１感染後のＴＩＮ４１４におけるＴＩＮベクター５’ＬＴＲからの発現の誘導を実証する。ｌａｃＺを抗ＨＩＶ遺伝子に置換した場合には、細胞がＨＩＶに感染すると、抗ＨＩＶ遺伝子も誘導されると考えられる。

４．抗ＨＩＶ　ＴＩＮベクターによるＨＩＶ－１感染からの保護　ｐＴＩＮ５０１は、内部薬物選択カセット（プロマイシン）と共に、Ｔａｔ誘導プロモーターから駆動されるトランス－ドミナント突然変異タンパク質ＲｅｖＭ１０を含有する（Ｍａｌｉｎ等，１９８９）。ＲｅｖＭ１０は、構成的に発現されたときに又はＨＩＶ－１　ＬＴＲプロモーターの制御下にあるときの両方で、ＨＩＶ－１感染から細胞を保護することが既に判明している。ｐＴＩＮ５０１の形質導入後に、ＲｅｖＭ１０発現はＴａｔ誘導５’ベクターＬＴＲの制御の下にあると考えられる。

ｐＴＩＮ５０１（■）と親ベクターｐＴＩＮ５００（□）をＵ９３７細胞に形質導入し、１．５μｇ／ｍｌにおける１０日間のプロマイシン（Ｓｉｇｍａ）中での選択によって安定な集団を得た。各集団からの２ｘ１０^{6}細胞を５ｘ１０^{6}$TCID_{50}$／ｍｌにおいて２０μｌ（Ａ）又は２００μｌ（Ｂ）の$HIV-1_{111B}$ウイルスストックで感染させ、この感染を３日間毎にＲＴ活性に関して培養上清を分析することによってモニターした。ＴＩＮ５０１集団においてはＴＩＮ５００集団に比べて、これらの細胞における抗ウイルスＲｅｖＭ１０タンパク質の誘導のために、ウイルス複製速度は顕著に減少した（図６）。このことはこのＴａｔ誘導形態におけるＲｅｖＭ１０の保護効果を実証する。ＴＩＮベクターＬＴＲにおける可能なＴａｔデコイの存在にも拘わらず、我々は非形質導入Ｕ９３７集団（データ示さず）に比べてＴＩＮ５００形質導入した細胞の有意な保護を観察しなかった。

５．単一転写単位ＴＩＮベクター　ベクターｐＴＩＮ５０２（■）をＵ９３７細胞に、１回（図７Ａ）又は３回（図７Ｂ）連続ラウンドの形質導入によって投与した。ｐＨＩＴ１１１を受容した同じ集団を用いて、１回ラウンドの形質導入の形質導入度(transduction

frequency)を細胞の１０～３０％と推定した（データ示さず）。さらに、対照Ｕ９３７集団をベクターｐＴＩＮ４１４（□）によって形質導入した。多数回ラウンドの形質導入を用いた場合には、細胞を４８時間毎に新鮮なレトロウイルスベクターストックに暴露させた。最終形質導入から４８時間後に、薬物選択の不存在下で、ＴＩＮ４１４形質導入集団とＴＩＮ５０２形質導入集団の各々の2×10^6細胞を5×10^6ＴＣＩD_{50}／ｍｌにおいて２００μｌのＨＩＶ－1_{111B}ウイルスストックで感染させ、ウイルス拡散を数時間にわたって培養上清中のＲＴ活性の分析によってモニターした（図７）。ＴＩＮ５０２－形質導入集団は対照のＴＩＮ４１４集団に比べて明らかに保護されたが（図７Ｂ）、これは多数回ラウンドの形質導入に依存し、ＴＩＮ５０２による１回のみの形質導入細胞の保護は存在しなかった。選択されたＴＩＮ５０１集団に比べて多数回形質導入されたＴＩＮ５０２集団においても観察された低いレベルの保護（図６）は、恐らく、ＴＩＮ５０２集団における形質導入されなかった細胞の存在によると考えられた。

表１．ｐＴＩＮ４１４はＭＬＶパッケージング系によって効率的に形質導入される

ベクター	ターゲット細胞	力価（ＣＦＵ／ｍｌ）
ｐＨＩＴ１１１	ＮＩＨ３Ｔ３	2×10^5
ｐＴＩＮ４１４		8×10^4
ｐＨＩＴ１１１	ＨｅＬａ	6×10^3
ｐＴＩＮ４１４		8×10^3

表２．ＴＩＮ４１４ＬａｃＺ発現はＴａｔ誘導性である

細胞ライン	相対的Ｂ－ＧＡＬ活性（２回実験）		細胞ライン	相対的Ｂ－ＧＡＬ活性（２回実験）	
HeLa	１１		NIH3T3	１６	
HeLa111	３４	４２	NIH3T3 111	７９２	１７７６
HeLa111+Tat	５７	６５	NIH3T3 111+Tat	１４１３	１７２９
HeLa414	２０	３２	NIH3T3 414	１４６	１０５
HeLa414+Tat	２００	１５４	NIH3T3 414+Tat	１７９	２７９

参考文献

Adam, M.A., N. Ramesh, A.D. Miller and W.A. Osborne. (1991). J. Virol. 65:4985-4990.

Arya, S K., C. Guo, S.F. Josephs and F. Wong-Staal. (1985). Science 229:69-73.

Baltimore, D. (1988). Nature 335:395-396.

Berkhout, B. *and K.-T. Jeang (1992). J. Virol. 66:139-149.*

Bowtell, D.D.L., S. Cory, G.R. Johnson and T.J. Gonda. (1988). J. Virol. 62:2464-2473.

Brady, H., C.G. Miles, D.J. Pennington and E.A. Dzierzak. (1994). PNAS 91:365

Bushman, F.D. and R. Craigie. (1990). J. Virol. 64:5645-5648.

Cannon, P.M., W. Wilson, E.D. Byles, S.M. Kingsman, A.J. Kingsman. 1994. J. Virol. 68:4768-4775.

Caruso, M. and D. Klatzman. (1992). PNAS 89:182-186.

Cobrink, D., A. Aiyar, Z. Ge, M. Katzman, H. Huang and J. Leis. (1991). J. Virol 65:3864.

Cullen, B.R., P.T. Lomedico and G. Ju. *(1984). Nature 307:241-245.*

Emerman , M. and H. Temin. (1984). Cell 39:459-467.

Emerman , M. and H. Temin. (1986). Mol. Cell. Biol. 6:792-800.

Hantzopoulos P.A., B.A. Sullenger, G. Ungers and E. Gilboa. (1989). PNAS 86:3519-3523.

Higuchi, R. 1990. Recombinant PCR, p. 177-183. In M.A. Innis, D.H. *Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), PCR Protocols:* Academic Press, San Diego.

Kadesch, T. and P. Berg (1986). Mol. Cell. Biol. 6:2593-2601.

Katz, R.A. and A.M. Skalka. (1994). Annu. Rev. Biochem. 63:133-173.

Kim, S., R. Byrn, J. Groopeman and D. Baltimore. (1989). J. Virol. 63:3708-3713.

Lehrman, S. (1994) Nature 371, 192

Liem, S.E., A. Ramezani, X. Li and S. Joshi. (1993). Hum. Gene Ther. 4:625-634.

Li, M., P.A. Hantzopoulos, D. Banerjee, S.C. Zhao, B.I. Schwiettzer, E. Gilboa and J.R. Bertino. (1992). Hum. Gene Ther. 3:381-390.

Linial, M.L. and A.D. Miller. (1990). Ed. R. Swanstrom and P.K. Vogt. Springer-Verlag.

Liu, J., C. Woffendin, Z. Yang and G.J. Nabel. (1994). Gene Therapy 1:32-37.

Majors, J. (1990). Ed. R. Swanstrom and P.K. Vogt. Springer-Verlag.

Malim, M.H., S. Bohnlein, J. Hauber and B.R. Cullen (1989). Cell 58:205-214.

McIvor, R.S., M.J. Johnson, A.D. Miller, S. Pitts, S.R. Williams, D. Valerio, D.W. Martin Jr. and I.M. Verna. (1987). Mol. Cell. Biol. 7:8380846.

Miller, A.D. and G.J. Rosman. (1989). Biotechniques 7:980-990.

Morgenstern, J.P., and H. Land. 1990. Nucl. Acids Res. 18:3587-3596.

Overell, R.W., K.E. Weisser and D. Cosman. (1988). Mol. cell. Biol. 8:1803-1808.

Page K.A., N.R. Landau, and D.R. Littman. 1990. J. Virol. 64:5270-5276.

Poznansky, M., A. Lever, L. Bergeron, W. Haseltine and J. Sodroski. (1991). J. Virol. 65:532.

Soneoka, Y., P.M. Cannon, E.E. Ramsdale. J.S. Griffiths, G. Romano, S.M. Kingsman and A.J. Kingsman. (1995). Nucl. Acids Res. 23:628-633.

Stuhlman, H., R. Jaaenisch and R.C. Mulligan (1989). Mol. Cell. Biol. 9:100-108.

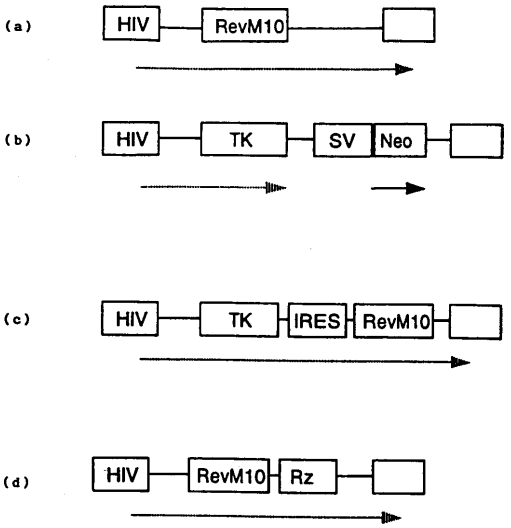
Williams, D.A., S.H. Orkin and R.C. Mulligan. (1986). PNAS 83:2566-2570.

Xu, L., J.K. Lee, J.A. Wolff and T. Friedmann. (1989). Virology 171:331-341.

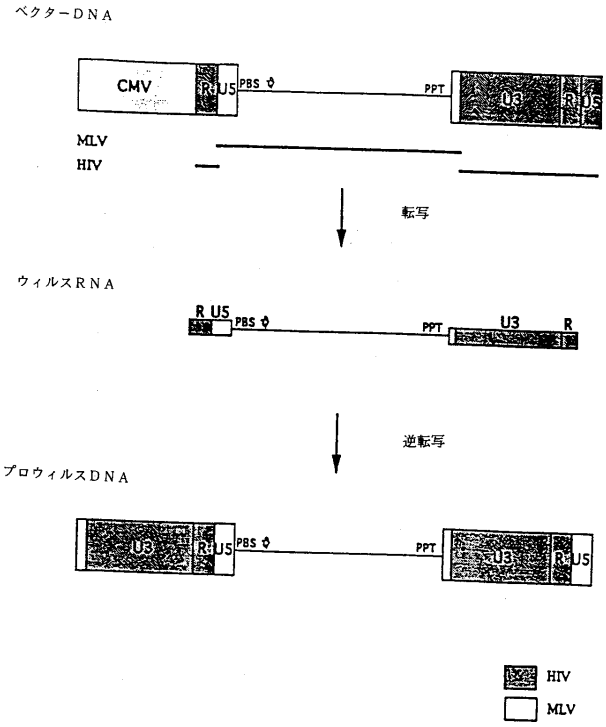
Yu, S.-F., T. von Ruden, P.W. Kantoff, C. Garber, M. Seiberg, U. Ruther, W.F. Anderson, E.F. Wagner and E. Gilboa. (1986). PNAS 83:3194-3198.

Yu, M., E. Poeschla and F. Wong-Staal. (1994). Gene Therapy 1:13-26.

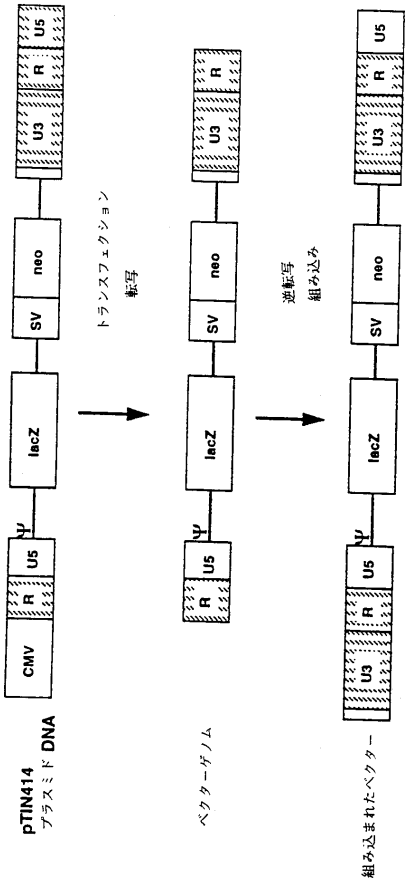
【図１】
Figure 1



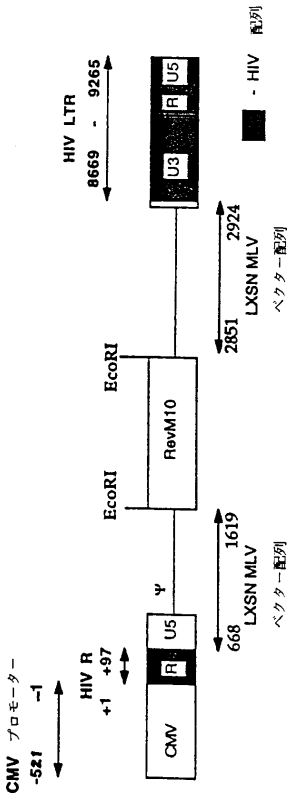
【図２Ａ】
Figure 2A



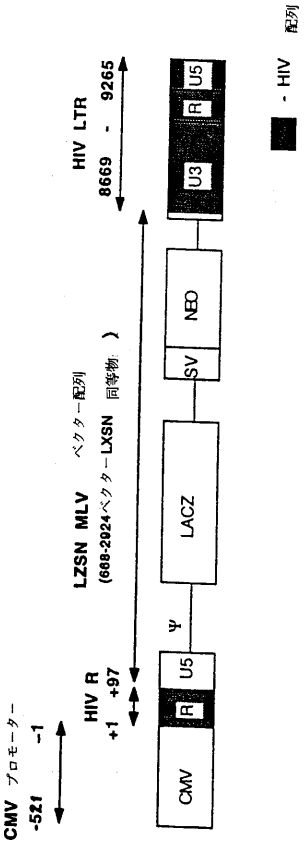
【図２Ｂ】
Figure 2B



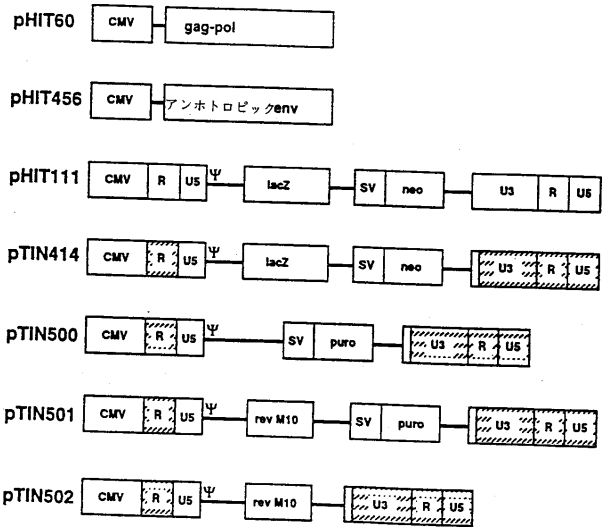
【図３Ａ】
Figure 3A



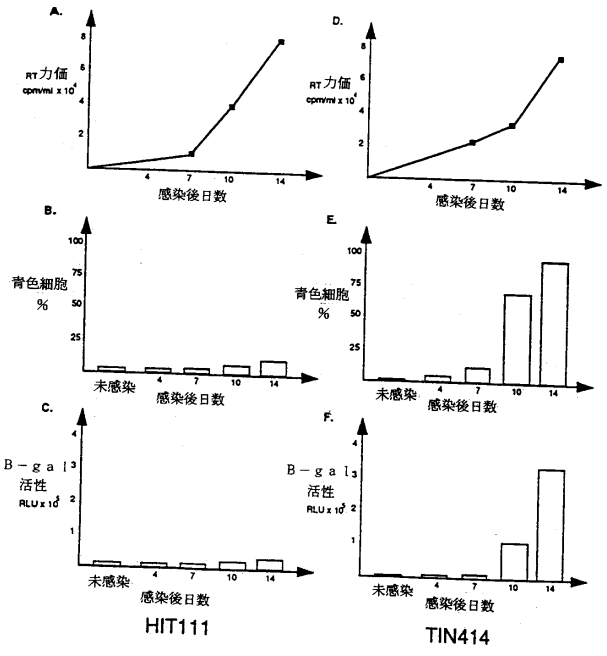
【図３Ｂ】
Figure 3B



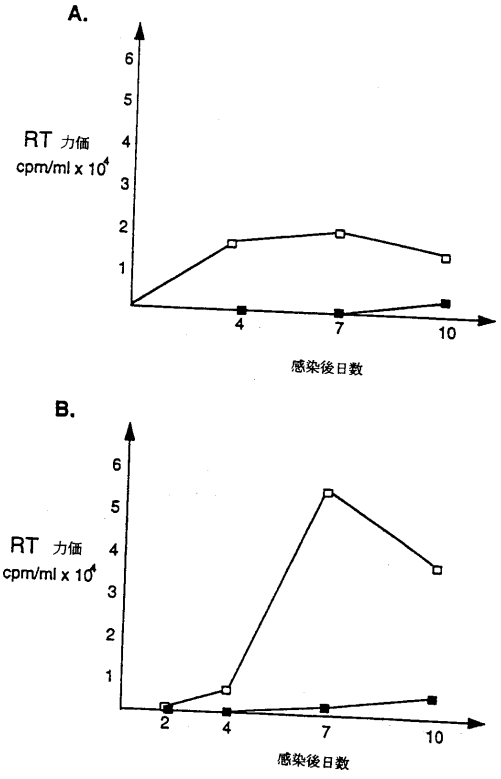
【図４】
Figure 4



【図５】
Figure 5

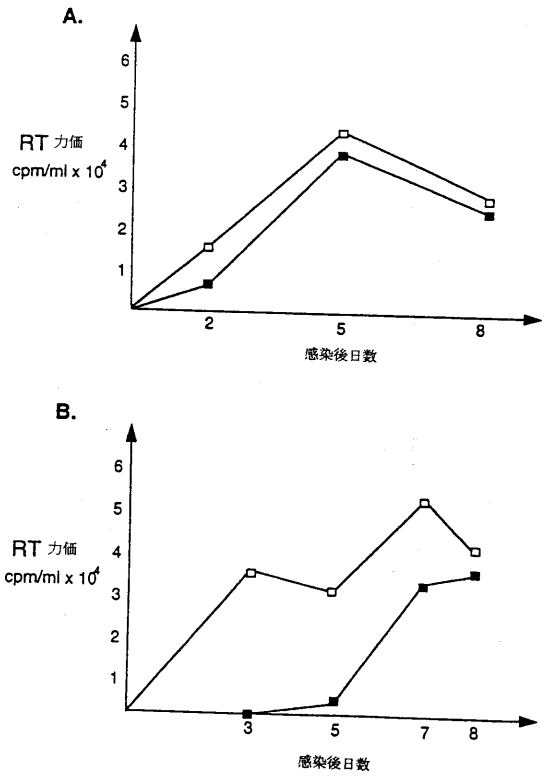


【図６】
Figure 6



【図７】

Figure 7


A.
RT 力価
cpm/ml x 10⁴
6
5
4
3
2
1
2
5
8
感染後日数
B.
RT 力価
cpm/ml x 10⁴
6
5
4
3
2
1
3
5
7
8
感染後日数

フロントページの続き

(74)代理人
弁理士 小林 泰
(74)代理人
弁理士 藍原 誠
(72)発明者 キングスマン，アラン・ジョン
イギリス国オックスフォードシャー オーエックス５・２エスエフ，イスリップ，ミドル・ストリート，グレイストーンズ
(72)発明者 キングスマン，スーザン・メアリー
イギリス国オックスフォードシャー オーエックス５・２エスエフ，イスリップ，ミドル・ストリート，グレイストーンズ
(72)発明者 キャノン，ポーラ・マリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州９００３３－０８００，ロサンジェルス，イーストレイク・アベニュー １４４１，ノリス・キャンサー・センター，ユーエスシー・スクール・オブ・メディスン，ジーン・セラピー・ラボラトリーズ内

審査官 坦ケ 隆幸

(56)参考文献 特表平１０－５０９３１８（ＪＰ，Ａ）
Journal of Virology, 1993, vol.67, p.743-752
Virology, 1993, vol.197, p.825-828
Gene, 1989, vol.84, p.419-427

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
Science Direct
JSTPlus(JDream2)