

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 5 月 12 日 (12.05.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/042737 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/16, A61K 39/00, 48/00, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/016089
- (22) 国際出願日: 2004 年 10 月 29 日 (29.10.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-374808 2003 年 11 月 4 日 (04.11.2003) JP
特願2004-187028 2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (Dनावेक रिसर्च INC.) [JP/JP]; 〒3050856 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野 慎士 (OKANO, Shinji) [JP/JP]; 〒8120041 福岡県福岡市博多区吉塚 4 丁目 1 5-3-3 0 1 Fukuoka (JP). 米満吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒8130043 福岡県福岡市東区名島 5-3 1-3 Fukuoka (JP). 居石克夫 (SUEISHI, Katsuo) [JP/JP]; 〒8150073 福岡県福岡市南区大池 1-2 9-2 2 Fukuoka (JP). 柴田 智子 (SHIBATA, Satoko) [JP/JP]; 〒8120061 福岡県福岡市東区筥松 2-1 4-1 5-7 0 1 Fukuoka (JP). 長谷川護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒3050856 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING TRANSGENIC DENDRITIC CELL

(54) 発明の名称: 遺伝子導入された樹状細胞の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of transferring a gene into a dendritic cell which comprises the step of contacting a minus strand RNA virus with the dendritic cell; a method of constructing a transgenic dendritic cell which comprises the step of contacting a minus strand RNA virus with the dendritic cell; a transgenic dendritic cell constructed by this method; and a method of activating a dendritic cell which comprises the step of contacting a minus strand RNA virus with the dendritic cell. Thus, it becomes possible to efficiently deliver a gene into a dendritic cell. A dendritic cell having an antigen gene or a cytokine gene transferred thereinto is useful as a vaccine.

(57) 要約: 本発明は、マイナス鎖 RNA ウイルスを樹状細胞を接触させる工程を含む、樹状細胞に遺伝子を導入する方法を提供する。また本発明は、遺伝子が導入された樹状細胞の製造方法であって、マイナス鎖 RNA ウイルスと樹状細胞とを接触させる工程を含む方法を提供する。また本発明は、この方法により製造された、遺伝子が導入され樹状細胞を提供する。さらに本発明は、マイナス鎖 RNA ウイルスと樹状細胞とを接触させる工程を含む、樹状細胞を活性化させる方法を提供する。本発明により、樹状細胞への効率的な遺伝子送達が可能となった。抗原遺伝子またはサイトカイン遺伝子を導入された樹状細胞はワクチンとして有用である。

WO 2005/042737 A1

明 細 書

遺伝子導入された樹状細胞の製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は樹状細胞に遺伝子を導入する方法に関する。本発明の方法は、癌および感染症などに対するワクチンの製造のために利用できる。

背景技術

- [0002] 樹状細胞 (dendritic cell; DC) は末梢血液、皮膚、リンパ器官及び胸腺などに存在する抗原提示細胞 (APC) の1つであり、リンパ組織及び非リンパ組織に広く分布している (Steinman, R. M. 1991, Ann. Rev. Immunol. 9:271; Banchereau, J.B. および R.M. Steinman, 1998, Nature 392:245 参照)。樹状細胞は強力な抗原提示能を有し、樹状細胞上のクラスI、クラスIIに抗原ペプチドを発現させ、それぞれ、CD4、CD8 T細胞を活性化する。これにより特定の抗原 (病原微生物の抗原、腫瘍関連抗原、移植抗原など) に対する生体内の免疫応答を誘導する。
- [0003] 樹状細胞の遺伝子改変は、臨床上的様々な有益な効果をもたらす。例えば、T細胞応答に必要な副刺激を誘導する分子 (CD80、CD86など) を発現する成熟樹状細胞を作製すれば、この樹状細胞を用いて抗原に対する強力な適応免疫の賦活化 (例えば、ウイルスや腫瘍に対するワクチンなど) が可能であるし、副刺激を誘導する分子のない、あるいは、抑制性の刺激を与える分子を発現する樹状細胞を使用すれば、抗原に対する免疫寛容 (例えば、移植抗原や自己免疫性疾患の原因となる抗原に対する不応答性の獲得など) を誘導することができる。これらの適用例として、例えば樹状細胞へのインターロイキン (IL)-12遺伝子の導入による免疫賦活化 (Gene Therapy 2000; 7,2113-2121)、およびFasリガンド遺伝子の導入による抗原特異的T細胞の除去 (J Immunol. 200; 164; 161-167) などが報告されている。また腫瘍免疫治療に関しては、樹状細胞に腫瘍抗原を遺伝子導入することによって、腫瘍に対する免疫を誘導することが期待できる。

非特許文献1:Steinman, R. M., 1991, Ann. Rev. Immunol. 9:271

非特許文献2:Banchereau, J.B. および R.M. Steinman, 1998, Nature 392:245

- 非特許文献3: Akiyama, Y. et al., 2000, Gene Therapy, 7: 2113-2121
- 非特許文献4: Min, W.P., 2000, J. Immunol., 164: 161-167
- 非特許文献5: Hsu, F.J. et al., 1996, Nat. Med. 2, 52-58
- 非特許文献6: Nestle, F.O., et al., 1998, Nat. Med. 4, 328-332
- 非特許文献7: Camporeale, A., et al., 2003, Cancer Res. 63, 3688-3694
- 非特許文献8: Bon, L. A., et al., 2003, Nat. Immunol. 4, 1009-1015
- 非特許文献9: Xia, D.J., et al., 2002, Gene therapy , 9, 592-601
- 非特許文献10: Mullins, D.W. et al., 2003, J. Exp. Med. 198, 1023-1034
- 非特許文献11: Okada, T. et al., 2003, Gene therapy 10, 1891-1902
- 非特許文献12: Nakahara, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 4112-4118
- 非特許文献13: Teitz-Tennenbaum, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 8466-8475
- 非特許文献14: Imboden, M. et al., 2001, Cancer Res. 61, 1500-1507
- 非特許文献15: Goldszmid, R. S. et al., 2003, J. Immunol. 171, 5940-5947
- 非特許文献16: Strome, S.E. et al., 2002, Cancer Res. 62, 1884-1889

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明は、樹状細胞に遺伝子を導入する方法を提供する。また本発明は、遺伝子が導入された樹状細胞の製造方法を提供する。また本発明は、本発明の方法により遺伝子導入された樹状細胞の利用を提供する。また本発明は、本発明の方法により遺伝子が導入された樹状細胞を提供する。さらに本発明は、樹状細胞への遺伝子導入のためのウイルスベクターを提供する。また本発明は、樹状細胞を活性化する方法を提供する。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者らは、マイナス鎖RNAウイルスベクターは樹状細胞への遺伝子導入のための非常に優れたベクターであることを見出した。遺伝子導入効率は、マイナス鎖RNAウイルスベクターを短時間樹状細胞に接触させるだけでよく、発現は長期にわたって検出可能であった。また、マイナス鎖RNAウイルスベクターを樹状細胞に感染させるだけで、樹状細胞を活性化させることができた。

樹状細胞への遺伝子導入は様々な免疫療法への適用が期待されているが、これまで樹状細胞への遺伝子導入手法は煩雑であったり、導入効率が十分ではなかった。本発明により、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いて、非常に単純な手順で、樹状細胞に外来遺伝子を導入することができることが実証された。本発明の方法を用いれば、樹状細胞への遺伝子送達を効率的に実施することが可能となり、免疫療法における樹状細胞の遺伝子改変への適用が期待される。

- [0006] すなわち本発明は、樹状細胞に遺伝子を導入する方法等に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお同一の請求項を引用する請求項に記載の発明の1つまたは複数の組み合わせからなる発明は、それらの請求項に記載の発明に既に意図されている。すなわち本発明は、
- [1] 遺伝子導入された樹状細胞の製造方法であって、樹状細胞またはその前駆細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程を含む方法、
 - [2] 成熟樹状細胞の製造方法であって、樹状細胞またはその前駆細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程を含む方法、
 - [3] 接触工程が、未成熟樹状細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程である、[1]または[2]に記載の方法、
 - [4] 接触工程が、CD34⁺細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程である、[1]から[3]のいずれかに記載の方法、
 - [5] 接触前または後の細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養する工程さらに含む、[1]から[4]のいずれかに記載の方法、
 - [6] 該ベクターがサイトカイン遺伝子を有する、[1]から[5]のいずれかに記載の方法、
 - [7] サイトカインがインターフェロン β である、[6]に記載の方法、
 - [8] マイナス鎖RNAウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、[1]から[7]のいずれかに記載の方法、
 - [9] パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、[8]に記載の方法、
 - [10] 細胞がヒト細胞である、[1]から[9]のいずれかに記載の方法、

[11][1]から[10]のいずれかに記載の方法により製造された、該ベクターを保持する細胞、

[12]成熟樹状細胞である、[11]に記載の細胞、

[13][11]または[12]に記載の樹状細胞を腫瘍部位に投与する工程を含む、腫瘍増殖を抑制する方法、

[14]樹状細胞に腫瘍抗原を接触および/または発現させる工程をさらに含む、[13]に記載の方法、に関する。

発明の効果

[0007] 樹状細胞は高い免疫誘導能を有するため、本発明の方法により所望の抗原遺伝子または免疫活性化遺伝子を樹状細胞に導入することにより、癌および感染症などの免疫治療に有用な樹状細胞(DC)ワクチンを製造することが可能となる。例えば、腫瘍免疫治療に関しては、樹状細胞に腫瘍抗原を提示をさせるために、腫瘍細胞の cell lysate (細胞溶解物)と混合する方法、ペプチドパルスする方法、および樹状細胞に腫瘍抗原遺伝子を導入する方法などを用いることができる。これらの中でも樹状細胞に腫瘍抗原を遺伝子導入する方法は、腫瘍ライセートおよびペプチドパルスよりもin vivoでの腫瘍抗原提示時間の延長が期待でき、さらにHLAの制限(ペプチドの場合; ペプチドは抗原由来のあるペプチドを使用するが、HLAとの結合の関係上、HLAの種類が変われば、その抗原の中の使用するペプチドの部位が変化する)などを受けなくなる利点を有する。

[0008] 樹状細胞に遺伝子を導入するベクターとして、プラスミドを導入するリポソーム法、electroporationなどあるが、導入効率が低く、非実用的とみなされている(Cancer gene Ther 1997, 4, 17-25s)。実用的なベクターとして、以下の3種類のベクターがある。i) アデノウイルスベクター(J. Immunotherapy 2002; 25; 445-454, Gene therapy 2000; 7; 249-254)、ii) レトロウイルスベクター(J. Leuko. Biol., 1999; 263-267., Br. J. Haematol. 2000; 108; 817-824)、iii) レンチウイルスベクター(J. Gene Med. 2001; 3; 311-320, J. Immunol. Meth. 2002; 153-165, Mol. Ther., 2002; 283-290, Cancer Gene Therapy 2002; 9: 715-724)。

[0009] これらのうち、ii) のレトロウイルスベクターは増殖期の細胞にしか導入できない。ま

た、細胞傷害性のあるポリブレンなどの導入補助因子が必要で、導入に時間がかかる。そのため、細胞のviability (生存性) が低下しやすいという欠点がある。また、末梢血より誘導された樹状細胞へは導入効率がさらに悪いため、一般に、CD34陽性の細胞にベクターを導入した後に、樹状細胞へ分化誘導するという方法が使用される。このとき、骨髄細胞や臍帯血やG-CSFでimmobilizationした末梢血が必要となるので、非常に患者に侵襲的である。また、樹状細胞へのレトロウイルスベクターの導入は、樹状細胞の活性化状態を上げることができない。また、レトロウイルスベクターは、ウイルス核酸を細胞のゲノムに組み込むため、ゲノム損傷が懸念される。また、一般に導入効率が低く、ソーティングなどによりベクター導入細胞のセレクションが必要である。

- [0010] iii) のレンチウイルスベクターも、レトロウイルスベクターと同様、ベクターの導入に時間がかかる。そのため、細胞のviabilityが低下する可能性がある。レンチウイルスは静止期の細胞にも遺伝子を導入することで知られているが、樹状細胞がある程度分化し、増殖活性を失った時の効率は、postentry restriction (J. Virol.; 75; 5448-5456) のため概して非常に悪い(数%)。また、末梢血より誘導された樹状細胞へは導入効率がさらに悪いため、CD34陽性の幹細胞に導入した後にin vitroで樹状細胞を得るという方法でしか使用できない(この際、骨髄細胞や臍帯血やG-CSFでimmobilizationした末梢血が必要となり、患者に侵襲的である)。この問題は、近年のベクター改変技術によって克服されつつあり、SIVの場合、helper constructにおいてvpx (proviral DNAの核内移行を促進する)を残すことによって、あるいは、HIVでDNA-flapシーケンスの挿入(これもproviral DNAの核内移行を促進する)することによって、末梢血由来単球及び分化した樹状細胞への遺伝子導入が可能となった(Mol. Ther. 2002; 283-290)。しかし、尚も、単球より樹状細胞を分化させる早期の段階で感染させる必要があるので、樹状細胞の分化が挿入遺伝子によって、障害を受ける可能性がある。また、導入効率がドナー間でばらつきがある。また、ベクターの導入は樹状細胞の活性化状態を上げることができない。また、上記のレトロウイルスベクターと同様、ゲノム損傷、悪性腫瘍発生の危険性があり、現時点での実用化の障壁となっている。また、導入効率が低く、一般にセレクションが必要であったり、導入効率の改善のた

めに導入に高い濃度のタイターが必要で、臨床応用に適用しにくい。また、遠心などの補助操作またはpolyblenなどの補助因子が必要となり、導入手技が煩雑で、長時間必要となる。また、ベクターの精製にコストがかかる問題もある。

[0011] 一方、i) のアデノウイルスに関しては、その導入効率(約80%)と分化した樹状細胞へ直接遺伝子導入できることから、樹状細胞遺伝子導入用ベクターとして期待されているが、導入所要時間は時間依存性で最大導入効率を得るために72時間程度必要(J. Immunotherapy 2002; 25; 445-454)である。さらに、マイナス鎖RNAウイルスと比較し、10倍～100倍のタイターが必要である。さらに決定的なことには、遺伝子導入効率を高くするMOIではアロT細胞の混合リンパ球反応(mixed lymphocyte reaction; MLR)を低下させる免疫抑制作用がある(Gene Therapy 2000; 7; 249-254)ことが問題となっている(特に高いDC:Tの比率で)。また、episomeの希釈のため、CD34陽性細胞などの幹細胞に遺伝子導入後に樹状細胞を分化させる方法が困難になることがある。

[0012] 樹状細胞への遺伝子導入のために必要な条件としては、高い導入効率、遺伝子導入の手技的安定性、簡便性、臨床的安全性、樹状細胞のT細胞活性化能力保持などが挙げられるが、これまで、これらの条件を全て兼ね備えたベクターが存在するとは言いがたかった。これに対してマイナス鎖RNAウイルスベクターを用いた場合、遺伝子導入は非常に短期間の接触で終了し、100%近い導入効率を得ることができ、しかもアロT細胞応答の抑制程度は比較的軽度であり、T細胞の刺激性が保持された。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、細胞質内で蛋白発現能力を所持し、核内への移行やゲノムへの遺伝子挿入の必要性がなく安全であることを考慮に入れると、上記のすべての条件を満たしたベクターであるといえる。また、免疫賦活(腫瘍免疫など)に使用するにあたって、上記のi)からiii)のベクターでは遺伝子導入によって樹状細胞の活性化状態が変化しないが、マイナス鎖RNAウイルスベクターの遺伝子導入は樹状細胞の活性化を惹起するため、導入後のサイトカインなどでの活性化処理の工程が省略可能で、細胞のviabilityの維持やコスト削減、さらなるex vivoでの操作時間の削減に寄与するものと考えられる。また、マイナス鎖RNAウイルスベクターで遺伝子導入された樹状細胞を用いて、T細胞移入療法に必要な活性化T細胞、特に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞などをex vivoで効率良く、短期間、簡単に誘導できることも確

認められた。更には、ベクターを幹細胞に遺伝子導入後に樹状細胞を分化させた場合の導入効率も約70%近くに達し、レンチウイルスベクターに匹敵した。これらの特徴は、臨床応用におけるマイナス鎖RNAウイルスベクターの適応範囲を拡大させる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]末梢血単球濃縮細胞の単核細胞に由来する樹状細胞の表現型を示す図である。PIで判別できた生細胞にゲートをかけ、抗CD11c-PE結合抗体及び抗HLA-class II(DR,DP,DQ) FITC結合抗体を用いて、CD11cおよびHLA-class II(DR,DP,DQ)の発現を観察した(左のマトリックス)。更にCD11cおよびHLA-class II(DR,DP,DQ) が共に陽性のゲートを選択し、1)抗CD14-APC結合抗体、2)抗CD1a-APC結合抗体、3)抗CD80-biotin結合抗体(2次的にstreptavidin-APCで染色)を使用して、それぞれの発現レベルをCD11cとのドットプロットで示した(右の3つのマトリックス)。なお、実施例中の“Class II”はHLA-DR、DQ、DPを全て認識する抗体を使用した結果を、“HLA-DR”はHLA-DRを特異的に認識する抗体を使用した結果を表す。
- [図2]SeV-GFPを導入したDCにおけるGFPおよびcostimulatory moleculesの発現を示す図である。
- [図3]ヒト単球由来樹状細胞へのSeV-GFPの導入効率と樹状細胞の活性化を示す図である(感染後2日目)。
- [図4]ヒト単球由来樹状細胞へのSeV-GFPの導入効率と樹状細胞の活性化を示す図である(感染後4日目)。
- [図5]ヒト単球由来樹状細胞へのSeV-GFPの導入効率と樹状細胞の活性化を示す図である(感染後8日目)。
- [図6]SeV-GFP導入後のDC数の変化を示す図である。
- [図7]SeV-GFP導入後のGFP発現期間を示す図である。
- [図8]ヒトDCへのSeV-GFP導入導入効率におけるLPS刺激の効果を示す図である。
- [図9]ヒトDCへのSeV-GFP導入導入効率におけるLPS刺激の効果を示す図である。
- [図10]DCへの遺伝子導入におけるインキュベーション時間の検討結果を示す図である。
- [図11]臍帯血由来のDCへの遺伝子導入を示す図である。

[図12]臍帯血由来のDCへの遺伝子導入を示す図である。

[図13]遺伝子導入後のcostimulatory moleculesの発現を示す図である (LPS刺激との比較)。

[図14]遺伝子導入後のcostimulatory moleculesの発現を示す図である (LPS刺激との比較)。

[図15]遺伝子導入後のcostimulatory moleculesの発現を示す図である (LPS刺激との比較)。

[図16]遺伝子導入後の食食能を示す図である。

[図17]遺伝子導入後の食食能を示す図である。

[図18]マイナス鎖RNAウイルスベクターの導入後の単球由来DCのサイトカイン産生を示す図である。

[図19]マイナス鎖RNAウイルスベクターの導入後の樹状細胞上のマーカー蛋白質の発現を示す図である。

[図20]マイナス鎖RNAウイルスベクターの導入後の樹状細胞上のマーカー蛋白質の発現を示す図である。

[図21]SeV-GFPを導入したDCのアロT細胞刺激能を示す図である。

[図22]マイナス鎖RNAウイルスベクターの導入により、MART-1特異的CTLをインビトロで誘導した結果を示す図である。

[図23]皮下接種されたB16メラノーマ細胞の増殖曲線を示す図である。

[図24]YAC-1ターゲット細胞の⁵¹Cr放出アッセイの結果を示す図である。

[図25]TRP2ペプチド+EL-4の⁵¹Cr放出アッセイの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明は、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いて遺伝子導入された樹状細胞を製造する方法を提供する。この方法は、導入したい所望の遺伝子を保持するマイナス鎖RNAウイルスベクターを、樹状細胞またはその前駆細胞に接触させる工程を含む方法である。本発明者等は、マイナス鎖RNAウイルスベクターが極めて高い効率で樹状細胞へ遺伝子を導入できることを見出した。しかもベクターの導入は樹状細胞を活性化させ、サイトカインで刺激することなしに成熟樹状細胞に分化させた。得られ

た成熟樹状細胞は、T細胞を活性化する能力を保持していた。本発明の方法は、樹状細胞に所望の抗原を提示させたり、あるいは樹状細胞で所望のサイトカインまたはその他の生理活性因子を発現させるために有用である。本発明の方法により遺伝子改変された樹状細胞は免疫系を活性化する高い能力を有しており、感染症、癌、その他、免疫誘導により有益な効果を期待できる所望の疾患の予防および治療において好適に用いられ得る。ベクターと樹状細胞との接触は、*in vivo*または*in vitro*で行うことができ、例えば培養液、生理食塩水、血液、血漿、血清、体液など所望の生理的水溶液中で実施すればよい。

- [0015] マイナス鎖RNAウイルスベクターの導入効率は、樹状細胞が非活性化状態(未成熟状態)の方が、成熟樹状細胞に対するものよりも有意に高い。従って、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、未成熟樹状細胞に接触、または未成熟樹状細胞を含む細胞画分と混合することが好ましい。そのような方法も、本発明における樹状細胞に遺伝子を導入する方法に含まれる。樹状細胞は、細菌またはリポポリサッカライド(LPS)、二本鎖RNAなどとの接触により活性化される。遺伝子導入する樹状細胞をこのような方法で別途活性化させる場合は、活性化してからベクターを導入してもよいが、ベクターの導入効率が低下しないようにするため、活性化の操作をベクターの導入前ではなく、マイナス鎖RNAウイルスベクターにより遺伝子を導入した後(またはマイナス鎖RNAウイルスベクターを樹状細胞に接触させるのと同時に)に行うことが好ましい。
- [0016] 単純な技術により高い効率で遺伝子送達が起こることは、マイナス鎖RNAウイルスベクターを介した樹状細胞への遺伝子送達の重要な優位性の1つである。レトロウイルスベクターなどを介した樹状細胞への遺伝子送達は効率が低く、さらに遺伝子導入の際にポリブレンなどの毒性のある薬剤を必要とする場合がある。一方でマイナス鎖RNAウイルスベクターは特別な薬剤を必要とすることなく、単に樹状細胞を含む溶液中にベクターを添加するだけでより優れた遺伝子送達を達成することができた。さらに、樹状細胞へのマイナス鎖RNAウイルスベクターを介する遺伝子送達は、非常に短い暴露(30分以下)で最適効率を達成することができた。臨床場面を考えると、これらの特徴は、樹状細胞の*ex vivo*および*in vivo*などにおける遺伝的改変を単純化し、操作に依存した細胞生存性の喪失などの悪影響を最小化し得るものである。

- [0017] ベクターと樹状細胞との接触においては、MOI(多重感染度; 細胞1つあたりの感染ウイルス数)は1〜500の間にすることが好ましく、より好ましくは2〜300、さらに好ましくは3〜200、さらに好ましくは5〜100、さらに好ましくは7〜70である。ベクターと樹状細胞との接触は短い時間でも十分であり、例えば1分以上、好ましくは3分以上、5分以上、10分以上、または20分以上接触させればよく、例えば1〜60分程度、より特定すれば5分〜30分程度であってよい。もちろん、それ以上の時間接触させてもよく、例えば数日間またはそれ以上接触させてもよい。接触は体内でも体外でも実施し得る。例えば、体内から取り出した樹状細胞またはその前駆細胞を体外でマイナス鎖RNAウイルスベクターと接触させ、ベクターを導入後に体内に戻すex vivo遺伝子導入において、本発明の方法は好適に用いられる。
- [0018] また、本発明の方法の特徴の1つは、樹状細胞へ遺伝子を導入した後、長期間にわたって導入遺伝子の発現が持続することである。本発明の方法により、ベクターを樹状細胞に感染させてから2日間以上、例えば3日間以上、5日以上、10日以上、14日以上、30日以上、50日以上、さらに60日以上にわたって、導入細胞において導入遺伝子の発現が検出される。
- [0019] また本発明は、未成熟樹状細胞に選択的に遺伝子を導入する方法であって、該遺伝子を保持するマイナス鎖RNAウイルスベクターを、未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む細胞集団中に共存させる工程を含む方法を提供する。未成熟樹状細胞に選択的とは、成熟樹状細胞に比べ未成熟樹状細胞へ有意に高い割合で遺伝子が導入されることを言う。すなわち、全成熟樹状細胞中でベクターが導入された成熟樹状細胞の割合よりも、全未成熟樹状細胞中でベクターが導入された未成熟樹状細胞の割合の方が、有意に高い。例えば本発明は、導入したい遺伝子を保持するマイナス鎖RNAウイルスベクターを、未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む細胞集団中に添加する工程を含む方法を提供する。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、成熟樹状細胞に比べ未成熟樹状細胞へ優先的に遺伝子を導入するので、この方法により未成熟樹状細胞に選択的に遺伝子を導入することができる。これらの方法も、本発明における樹状細胞に遺伝子を導入する方法に含まれる。
- [0020] 樹状細胞(Dendritic cell; DC)とは、成熟状態において樹枝状形態をとり、抗原を

提示してT細胞を活性化する能力を持つ細胞である。樹状細胞には、生体内各種組織器官に分布する骨髓細胞由来の樹枝状形態をとる細胞群、および骨髓または血液由来の幹細胞から、in vitroでサイトカイン等を利用して分化誘導をかけた生体内組織器官に分布する樹枝状形態をとる細胞と同等の細胞群が含まれる。具体的には、樹状細胞には、例えばリンパ球系樹状細胞(Th2への誘導または免疫寛容を誘導するものであってもよい)、骨髓球系樹状細胞(一般的に用いられる樹状細胞。未熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む)、ランゲルハンス細胞(皮膚の抗原提示細胞で重要な樹状細胞)、相互連結細胞(リンパ節、脾臓のT細胞領域にあり、T細胞への抗原提示に働いていると考えられている細胞)、ろ胞樹状細胞(B細胞への抗原提示細胞として重要、抗原と抗体複合体、抗原と補体複合体を抗体レセプター、補体レセプターにより、樹状細胞上に提示することで、B細胞に抗原提示している。)などを含むものであり、好ましくは、MHCクラスIおよびクラスIIを高発現しており、さらに好ましくはCD11cを発現している細胞である。

[0021] また、樹状細胞は、樹枝状形態を有し、CD11c、HLA-class II (HLA-DR、-DP、または-DQ)、CD40、およびCD1aからなる群より選択される表面マーカーの2つ以上が陽性の細胞であってよい。本発明において樹状細胞は、より好ましくは、HLA-class II⁺およびCD11c⁺の細胞、より好ましくはCD1a⁺、HLA-class II⁺、およびCD11c⁺の細胞で、かつT細胞マーカー(CD3)、B細胞マーカー(CD19、CD20)、NK細胞マーカー(CD56)、好中球マーカー(CD15)、単球マーカー(CD14)を発現していない細胞である。ベクターの導入に使用される樹状細胞集団のCD14⁺の割合は、例えば10%以下、好ましくは5%以下、更に好ましくは1%以下がよい。

[0022] また、本発明において樹状細胞には成熟樹状細胞および未成熟樹状細胞が含まれる。未成熟樹状細胞とは、T細胞活性化能力が低い樹状細胞を言う。具体的には、未成熟樹状細胞は、LPS (1 micro-g/ml) を添加し2日間培養して成熟を誘導した樹状細胞に比べ、抗原提示能が1/2未満、好ましくは1/4未満のものであってよい。抗原提示能は、例えばアロT細胞活性化能(混合リンパ球試験;アロT細胞と樹状細胞の混合培養で、T細胞対樹状細胞の割合は1:10で培養、好ましくはその比率を変化させて培養したもので、培養終了8時間前に³H-thymidineを添加し、そのT細胞

胞のDNA内の取込み量によって、T細胞増殖能力を定量したもの:図21参照;文献 Gene Therapy 2000; 7; 249-254)、あるいはペプチドを用いた特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導能試験(樹状細胞に、ある抗原のあるClass I 拘束性の既知のペプチドを添加して、樹状細胞を採取したのと同じ健康人末梢血のT細胞を共培養(3日目以降はIL-2を25U/ml、好ましくは100U/ml)(好ましくは21日間3回の樹状細胞による刺激、更に好ましくは14日間2回の樹状細胞の刺激)し、得られたエフェクター細胞を⁵¹Crでラベルされたターゲット細胞(ペプチドの拘束性のClass I陽性の腫瘍細胞)を20:1、10:1、5:1、2.5:1、好ましくは100:1、50:1、25:1、12.5:1で4時間混合培養してターゲット細胞の⁵¹Cr遊出量で定量したもの;図22参照;文献 Arch Dermatol Res 2000; 292; 325-332)により定量することができる。また未成熟樹状細胞は、好ましくは抗原貪食能を持ち、更に好ましくはT細胞活性化のための副刺激を誘導する受容体の発現が低発現(例えば上記のようにLPS誘導した成熟DCに比べ有意に)あるいは陰性である。一方で、成熟樹状細胞とはT細胞活性化などの為の抗原提示能力が高い樹状細胞を言う。具体的には、成熟樹状細胞は、LPS (1 micro-g/ml) を添加し2日間培養して成熟を誘導した樹状細胞の抗原提示能の1/2以上、好ましくは同等以上の抗原提示能を持つ細胞であってよい。また成熟樹状細胞は、好ましくは抗原貪食能が低いか、または持たず、更に好ましくはT細胞活性化のための副刺激を誘導する受容体の発現が高いものをいう。また、樹状細胞の活性化とは、未成熟樹状細胞から成熟樹状細胞への移行を言い、活性化樹状細胞には、成熟樹状細胞、および、活性化刺激により副刺激を誘導するCD80、CD86の発現を上昇させている途中経過の樹状細胞が、その範疇に含まれる。CD11c陽性の樹状細胞においては、CD83陽性が成熟樹状細胞の指標とされる。

[0023] 例えば成熟樹状細胞は、好ましくは CD40、CD80、CD86およびHLA-class IIの発現が強陽性の細胞であってよい。更に好ましくは、成熟樹状細胞はCD83を発現する。例えば、CD80、CD83、およびCD86からなる群より選択されるマーカーを基に、未成熟樹状細胞と成熟樹状細胞を見分けることができる。未成熟樹状細胞ではこれらのマーカーは弱いか、好ましくは陰性であるが、成熟樹状細胞では陽性である。

[0024] 上記のように、未成熟樹状細胞は、通常、高い貪食能を保持している。樹状細胞に

LPS (1 micro-g/ml) を添加し2日間培養すると、樹状細胞は活性化され貪食能は低下する。貪食能は、樹状細胞内への小分子の取り込み量または取り込み細胞の割合を測定して知ることができる。好ましくは、貪食能は、樹状細胞内への小分子の取り込み量で決定される。例えば、1 micro-m程度の着色ビーズを用いて、樹状細胞内へのビーズの取り込みを測定することができる。4℃で陽性となるバックグランドを差し引いて定量する。高い貪食能とは、樹状細胞内への小分子の取り込み量が、樹状細胞を上記のようにLPS (1 micro-g/ml) で2日間刺激した樹状細胞の4倍以上、より好ましくは5倍以上、より好ましくは6倍以上の貪食能を言う。あるいは、小分子の取り込み細胞の割合が2倍以上、より好ましくは3倍以上である。低い貪食能とは、樹状細胞内への小分子の取り込み量が、LPS (1 micro-g/ml) で2日間刺激した樹状細胞の4倍未満、より好ましくは2倍未満、より好ましくは1.5倍未満である。あるいは、小分子の取り込み細胞の割合で測定した場合に、2倍未満、より好ましくは1.5倍未満である。

[0025] 成熟樹状細胞の判別は当業者が通常行っており、上記の各マーカーおよびその発現の測定方法も当業者に周知である。例えばCD11cは約150 kDの接着糖蛋白 (p150, インテグリンalpha鎖) である。CD11cはCD18と結合してCD11c/CD18複合体を形成し、フィブリノーゲンへの結合力を有し、また、iC3bおよびICAM-1の受容体となることが報告されている。また、CD11c/CD18は刺激を受けた上皮の受容体に結合する接着分子として働きうることが報告されている (Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Barclay, N.A. et al., eds., 1993, The Leucocyte Antigen FactsBook, CD11 Section, Academic Press Inc., San Diego, California, p. 124; Stacker, S.A. and T.A. Springer, 1991, J. Immunol. 146:648)。

[0026] CD1aは約49 kDのポリペプチドでbeta 2ミクログロブリンと結合する。CD1aはMHC class I抗原と構造的に類似しており、抗原提示に機能するとみなされる (Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Hanau, D. et al., 1990, J. Investigative Dermatol. 95: 503; Calabi, F. and A. Bradbury.,

1991., Tissue Antigens 37: 1)。

[0027] CD14は53-55 kDのグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型単鎖糖蛋白で、細網樹状細胞およびある種のランゲルハンス細胞で発現する。CD14はLPSと血清LPS結合蛋白質 (LPB) の複合体に対する高親和性の表面受容体として同定された (McMichael, A.J. et al., eds., 1987, Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Wright, S.D. et al., 1990, Science 249:1434)。

[0028] CD40は45-48 kDのI型膜嵌入型蛋白質 (type I integral membrane glycoprotein) であり、抗CD40抗体は細胞マーカーとしてよく使用されている (Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Galy, A.H.M.; and H. Spits, 1992, J. Immunol. 149: 775; Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4494; Itoh, H. et al., 1991, Cell 66: 233; Barclay, N.A. et al., 1993, The Leucocyte Antigen Facts Book., Academic Press)。

CD80は約60 kDの膜貫通型糖蛋白であり Ig supergene familyの一員である。CD80はT細胞で発現するCD28およびCD152 (CTLA-4) のリガンドである (Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Schwartz, R.H., 1992, Cell 71: 1065; Azuma, M. et al., 1993, J. Exp. Med. 177: 845; Koulova, L. et al., 1991, J. Exp. Med. 173: 759; Freeman, G.J. et al., 1998, J. Immunol. 161: 2708; Behrens, L. et al., 1998, J. Immunol., 161(11):5943; Guesdon, J.-L. et al., 1979, J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139)。

[0029] CD83は約45 kDの膜貫通蛋白質でIg superfamilyの一員である。CD83は短鎖のV型Igの細胞外ドメインとC末の細胞質tailを持つ。CD83は主に胞樹状細胞、循環樹状細胞、リンパ組織の相互連結 (interdigitating) 樹状細胞、in vitroで生成させた樹

状細胞、および胸腺樹状細胞に発現する(Zhou, L-J., and T.F. Tedder, 1995, J. Immunol. 154: 3821; Zhou, L-J. et al., 1992, J. Immunol. 149: 735; Summers, K.L. et al., 1995, Clin Exp. Immunol. 100:81; Weissman, D. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 92: 826; Hart, D.N.J., 1997, Blood 90: 3245)。

CD86 (B70/B7-2) は約75 kDの細胞表面蛋白質でCD28およびCTLA-4の第2のリガンドであり初期免疫応答におけるT細胞の副刺激に重要な役割を持つ(Azuma M. et al., 1993, Nature 366: 76; Nozawa Y. et al., 1993, J. Pathology 169: 309; Engle, P. et al. 1994., Blood 84: 1402; Engel, P. et al., CD86 Workshop Report. In: Leukocyte Typing V. Schlossman, S.F. et al. eds., 1994, Oxford University Press; Yang, X.F. et al., 1994, Upregulation of CD86 antigen on TPAstimulated U937 cells, 1994, (abstract). American Society of Hematology, Nashville, TN; Guesdon, J.-L. et al., 1979, J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139)。

[0030] CCR7はBLR-2、EBI-1、およびCMKBR7とも呼ばれる7回膜貫通型G蛋白質結合受容体であり、CCケモカインである MIP-3beta/Exodus 3/ELC/CCL19 および 6Ckine/Exodus 2/SLC/TCA4/CCL21 の受容体である(Sallusto, F. et al., 1999, Nature 401:708-12; Lipp, M. et al., 2000, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 251:173-9; Birkenbach, M. et al., 1993, J. Virol. 67:2209-20; Schweickart, V. L. et al., 1994, Genomics 23:643-50; Burgstahler, R. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215:737-43; Yoshida, R. et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:13803-9; Yoshida, R. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:7118-22; Yoshida, R. et al., 1998, Int. Immunol. 10:901-10; Kim, C. H. et al., 1998, J. Immunol. 161:2580-5; Yanagihara, S. et al., 1998, J. Immunol. 161:3096-102)。

[0031] HLA-class IIはDR, DP, およびDQがあり、その全てに結合する抗体により網羅的に検出することができる(Pawelec, G. et al., 1985, Human Immunology 12:165; Ziegler, A. et al., 1986, Immunobiol. 171:77)。HLA-DRはMHCのヒトclass II抗原の1つでalpha鎖(36 kDa)とbetaサブユニット(27 kDa)からなる膜貫通糖蛋白質である。表皮のランゲルハンス細胞ではCD1a抗原と共発現する。CD1aは抗原提示において細胞の相互作用に主要な役割を果たす(Barclay, N.A. et al., 1993, The Leucocyte

Antigen Facts Book. p. 376. Academic Press)。

- [0032] またヒト以外の哺乳動物に関しても、上記のマーカー遺伝子の相同遺伝子産物を指標に樹状細胞を特定することができる。これらのマーカーに対する抗体は、例えば BD Biosciences社 (BD PharMingen) より入手することができ、その詳細は同社または販売代理店のウェブサイトで知ることができる。
- [0033] また、樹状細胞マーカーに関しては、以下のKiertscherらおよびOehlerらの文献も参照のこと (Kiertscher SM, Roth MD, Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4, J. Leukoc. Biol., 1996, 59(2):208-18; Oehler, L. et al., Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics., J. Exp. Med., 1998, 187(7):1019-28)。また、フローサイトメトリーに関しては、Okanoら、およびStitesらの文献を参照することができる (Okano, S. et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes., Gene Ther., 2003, 10(16):1381-91; Stites, D. et al., Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence., Clin. Immunol. Immunopathol., 1986, 38:161-177)。各マーカーの発現については、例えば、isotype control antibodyで染色した時に、陽性率が1%以下の蛍光強度を境界として、それ以上は陽性、それ未満は陰性と判断される。
- [0034] 樹状細胞またはその前駆細胞の調製は、公知の方法に従ってまたは準じて行うことができる。例えば、血液 (例えば末梢血または臍帯血)、骨髓、リンパ節、他のリンパ器官、脾臓、皮膚などから分離することができる。好ましくは、樹状細胞は、本発明に使用するために血液または骨髓から得られる。また、本発明で用いられる樹状細胞は、皮膚のランゲルハンス細胞、輸入リンパ管のベール細胞、ろ胞樹状細胞、脾臓の樹状細胞、およびリンパ器官の指状突起細胞などであってもよい。また本発明で用いられる樹状細胞は、CD34⁺由来樹状細胞、骨髓由来樹状細胞、単球由来樹状細胞、脾細胞由来樹状細胞、皮膚由来樹状細胞、濾胞樹状細胞、および胚中心樹状細胞からなる群から選択される樹状細胞が含まれる。CD34⁺由来樹状細胞は、臍帯血または骨髓等から得た造血幹細胞または造血始原細胞等から、顆粒球コロニー刺

激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、腫瘍ネクロシスファクター (TNF)-alpha、IL-4、IL-13、ステムセルファクター (SCF)、Flt-3リガンド、c-kitリガンド、またはその組み合わせなどにより分化させることができる。例えば、末梢血の単球をGM-CSFおよびIL-4により未成熟樹状細胞に分化させ、さらにTNF-alphaで刺激することにより成熟樹状細胞へと分化させることができる。

[0035] 樹状細胞およびそれ以外の細胞を含む組成物から樹状細胞を選択(または濃縮)する場合は、樹状細胞以外の細胞を取り除くいわゆるネガティブ選択を実施することが好ましい。ネガティブ選択を用いることにより、DC-granulocytesのprecursor(J. Exp. Med., 1998, 187: 1019-1028; Blood, 1996, 87: 4520-4530) が除去されずに残り、接着性のCD14細胞から分化したDCだけでなく、それらのprecursorから分化したDCをあわせて回収することが可能と考えられる。これにより、ベクター導入による細胞障害性を軽減することが期待できる。

[0036] 例えば、T細胞、NK細胞、B細胞などに特異的な抗体を用いて、これらの細胞を取り除くことにより、樹状細胞を濃縮することが可能である。具体的には、例えば、CD2、CD3、CD8、CD19、CD56、CD66bから選択される表面マーカーまたはその任意の組み合わせの発現がlowまたはnegativeの細胞を得ることが好ましい。より好ましくは、CD2、CD3、CD8、CD19、CD56、およびCD66bの全てがlowまたはnegativeの細胞である。そのために、これらのマーカーに対する抗体を用いて、これらのマーカーを発現する細胞を除去するとよい(Hsuら(1996) Nature Med. 2: 52)。なお、ネガティブ選択においては、本実施例に示されているような多価抗体を用いて行うことができるし、あるいは磁気細胞分離 (MACS) のためにビーズ等を用いても、同様のセレクションを実施することが可能である。血球分離等を持ちいて単核球を採取するなど、細胞を大量に調整する場合は、ビーズを用いることが好ましい。例えば生体から得た細胞溶液から単球をエンリッチし、これに対してネガティブ選択を行って調製した樹状細胞を本発明において好適に用いることができる。

[0037] また、マイナス鎖RNAウイルスを導入する前に接着細胞により得られた末梢血単球を樹状細胞へ分化させたものを選択すると、ベクターの導入効率が低下することがある。本発明で用いられる樹状細胞はこれに限られるものではないが、未成熟樹状細胞

胞の比率を低下させないように、マイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる前の細胞培養は、固体支持体(例えば培養ディッシュまたはボトルなどの培養容器)に接着した細胞を選択する工程を含まないことが好ましい。すなわち本発明は、マイナス鎖RNAウイルスベクターと樹状細胞との接触の前24時間以内に、固体支持体に付着した細胞を選択する工程を含まないような方法を提供する。より好ましくは、マイナス鎖RNAウイルスベクターと樹状細胞との接触の前の2日、3日、5日、または7日以内に、固体支持体に付着した細胞を選択する工程を含まないようにするとよい。

[0038] また、これに限られるものではないが、マイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる前に、CD14⁺細胞を選択する工程を含まないことが好ましい。すなわち本発明は、マイナス鎖RNAウイルスベクターと樹状細胞との接触の前24時間以内に、CD14⁺細胞を選択する工程を含まないような方法を提供する。より好ましくは、マイナス鎖RNAウイルスベクターと樹状細胞との接触の前の2日、3日、5日、または7日以内に、CD14⁺細胞を選択する工程を含まないようにするとよい。

[0039] 樹状細胞の具体的な単離方法は、例えば Cameron et al., 1992, Science 257: 383、Langhoff et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7998、Chehimi et al., 1993, J. Gen. Virol. 74: 1277、Cameron et al., 1992, Clin. Exp. Immunol. 88: 226、Thomas et al., 1993, J. Immunol. 150: 821、Karhumaki et al., 1993, Clin. Exp. Immunol. 91: 482 などに記載されている。また、フローサイトメトリーによる樹状細胞の単離については、例えば、Thomas et al., 1994, J. Immunol. 153: 4016、Ferbas et al., 1994, J. Immunol. 152: 4649、および O'Doherty et al., 1994, Immunology 82: 487 に記載されている。また、磁気細胞選別については、例えば Miltenyi et al., 1990, Cytometry 11: 231-238 に記述されている。

[0040] また、例えばヒト樹状細胞の単離および増殖に関しては、Macatonia et al., 1991, Immunol. 74: 399-406、O'Doherty et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 1067-1078、Markowicz et al., 1990, J. Clin. Invest. 85: 955-961、Romani et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 83-93、Sallusto et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 1109-1118、Berhard et al., 1995, J. Exp. Med. 181: 1099-1104 などに記載の方法を用いてもよい。また、骨髓、臍帯血、または末梢血等から得られるCD34⁺細胞および末梢血由来の単核細胞

からの樹状細胞形成については Van Tendeloo et al., 1998, Gene Ther. 5: 700-707 に記載の方法を用いて実施してもよい。

[0041] 本発明においては、樹状細胞またはその前駆細胞（例えばCD11c⁺細胞またはCD34⁺細胞）を高濃度で含む細胞画分にマイナス鎖RNAウイルスベクターを混合することが好ましい。前駆細胞とは、適当なサイトカイン（すなわちG-CSF、GM-CSF、TNF- α 、IL-4、IL-13、SCF、Flt-3リガンド、c-kitリガンド、またはそれらの組み合わせ）の存在下で樹状細胞に分化することができる細胞を言い、好ましくは4週間以内、より好ましくは20日以内、より好ましくは18日以内、より好ましくは16日以内に樹状細胞に分化できる細胞である。このような細胞には、CD34⁺幹細胞が挙げられる。樹状細胞への分化は、例えばSCF (50 ng/ml)、GM-CSF (500 U/ml)、TNF- α (50 ng/ml) の存在下で3日間程度培養後、SCF (50 ng/ml)、GM-CSF (500 U/ml)、IL-4 (250 U/ml)、TNF- α (50ng/ml) の存在下で培養することで実施することであってよい。また細胞画分とは、細胞の分離（または分画）により得られた細胞集団である。細胞画分は、細胞および薬学的に許容される担体を含む組成物であってよい。担体としては、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、培養液、血清など、生細胞を懸濁することができる所望の溶液が挙げられる。本発明の方法においてベクターの接触に用いられる細胞画分は、全生細胞中の樹状細胞および／またはその前駆体の割合が、例えば30%以上、好ましくは40%以上、好ましくは50%以上、好ましくは60%以上、好ましくは70%以上である。

[0042] また、マイナス鎖RNAウイルスベクターに接触させる樹状細胞中には、未成熟樹状細胞が含まれることが好ましい。ベクターを混合する樹状細胞を含む細胞画分は、全生細胞中の未成熟樹状細胞の割合が、例えば10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上である。

[0043] マイナス鎖RNAウイルスを用いる本発明の方法は、様々な利点を有している。例えばマイナス鎖RNAウイルスを用いれば、ベクターの感染のみで、活性化樹状細胞が得られ、後の成熟樹状細胞を得るための工程が省略できる。樹状細胞を免疫賦活に用いるためには活性化が必要であるので、ベクターの感染だけで活性化を起こせる

ことには利点がある。また、この性質を利用し、in vitroでT細胞移入療法に必要な活性化T細胞、特に細胞傷害性T細胞などを効率良く短期間で誘導することができる。マイナス鎖RNAウイルスを導入していない樹状細胞ではCTLを誘導できず、他のベクターでこれまで報告されている性質から、他のベクターの遺伝子導入のみではin vitroでのCTL誘導は困難である。従って、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ベクターの導入のみでT細胞を活性化(CTL誘導)が可能という利点を有している(図22参照)。また、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、高い導入効率、遺伝子導入の安定性、簡便性、安全性、樹状細胞のT細胞活性化能力保持を全て兼ね備えたベクターである点で、他のベクターに比べ優れている。

[0044] また、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、幹細胞に遺伝子導入した後に、樹状細胞を分化させる場合にも有用である。マイナス鎖RNAウイルスベクターを幹細胞に遺伝子導入した後に、樹状細胞への分化を誘導した場合、遺伝子導入効率は70%近くに達する。これは、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターの改変型に匹敵する。アデノウイルスベクターは、導入後のepisomeの希釈により発現が低下するため、幹細胞から遺伝子導入することは困難である。マイナス鎖RNAウイルスは、幹細胞に導入後に樹状細胞分化を行う方法、および、末梢血単核球より分化させた樹状細胞に遺伝子を導入する方法、の両者に適用が可能である。

[0045] また、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、MOIを高く(例えば10以上、好ましくは20以上、より好ましくは30以上、例えば40以上、さらには50以上)すれば、細胞傷害性に有為な影響なく、安定してほぼ100%の導入効率で細胞に導入することが可能である。さらに、マイナス鎖RNAウイルスは宿主ゲノムに遺伝子を組み込まないため、腫瘍発生などのリスクが低いという利点も有している。

[0046] 本発明においてマイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖)のRNAをゲノムとして含むウイルスである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、特に一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(非分節型(non-segmented) マイナス鎖RNAウイルスとも言う)が挙げられる。「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖[すなわちマイナス鎖]RNAをゲノムに有

するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。

[0047] また、マイナス鎖RNAウイルスベクターとは、マイナス鎖RNAウイルスをベースとする感染力を持つウイルス粒子であって、遺伝子を細胞に導入するための担体である。ここで「感染力」とは、マイナス鎖RNAウイルスベクターが細胞への接着能を保持しており、接着した細胞の内部にベクターに含まれる遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。好ましい態様では、本発明のマイナス鎖RNAウイルスベクターは、ベクターのゲノムRNA中に外来遺伝子が発現できるように組み込まれている。本発明のマイナス鎖RNAウイルスベクターは、伝播能を有していてもよく、伝播能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

[0048] 組み換えウイルスとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルス、またはそのウイルスの増幅産物を言う。組み換えポリヌクレオチドとは、両端または片端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖の結合が改変(切断および/または結合)されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。例えば、ウイルスゲノムをコードするcDNAから、ウイルス再構成する方法が知られている(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624 (1999))。

- [0049] 本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、転写される配列をセンスまたはアンチセンスに含む核酸を言う。遺伝子はRNAであってもDNAであってもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また遺伝子は蛋白質をコードしていなくてもよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。
- [0050] 本発明において好適に用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスのセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス(SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。
- [0051] 本発明において用いることができるウイルスをさらに例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、

dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが挙げられる。

[0052] より好ましくは、パラミクソウイルス亜科(レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む)に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属(genus *Respirovirus*) (パラミクソウイルス属(*Paramyxovirus*)とも言う)に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラゴ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

[0053] マイナス鎖RNAウイルスベクターはゲノムRNAに搭載遺伝子をアンチセンスにコードしている。ゲノムRNAとは、マイナス鎖RNAウイルスのウイルス蛋白質と共にリボヌクレオプロテイン(RNP)を形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、このRNAが複製されて娘RNPが形成される機能を持つRNAである。一般にマイナス鎖RNAウイルスのゲノムは、3'リーダー領域と5'トレイラー領域の間に、ウイルス遺伝子がアンチセンス配列として並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列(E配列) - 介在配列(I配列) - 転写開始配列(S配列) が存在し、これにより各遺伝子のORFをコードするRNAが別々のシストロンとして転写される。

[0054] マイナス鎖RNAウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に

、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

レスピロウイルス属 NP P/C/V M F HN - L

ルブラウイルス属 NP P/V M F HN (SH) L

モービリウイルス属 NP P/C/V M F H - L

例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV、AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169;

MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962, HN(HまたはG) 遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

- [0055] これらのウイルス蛋白質をコードするORFおよび外来遺伝子のORFは、ゲノムRNAにおいて上記のE-I-S配列を介してアンチセンスに配置される。ゲノムRNAにおいて最も3'に近いORFは、3'リーダー領域と該ORFとの間にS配列のみが必要であり、EおよびI配列は必要ない。またゲノムRNAにおいて最も5'に近いORFは、5'トレイラー領域と該ORFとの間にE配列のみが必要であり、IおよびS配列は必要ない。また2つのORFは、例えばIRES等の配列を用いて同一シストロンとして転写させることも可能である。このような場合は、これら2つのORFの間にはE-I-S配列は必要ない。例えば、野生型のパラミクソウイルスの場合、典型的なRNAゲノムは、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をアンチセンスにコードする6つのORFが順に並んでおり、それに続いて5'トレイラー領域を他端に有する。本発明のゲノムRNAにおいては、ウイルス遺伝子の配置はこれに限定されるものではないが、好ましくは、野生型ウイルスと同様に、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をコードするORFが順に並び、それに続いて5'トレイラー領域が配置されることが好ましい。ある種のウイルスにおいては、ウイルス遺伝子が異なっているが、そのような場合でも上記と同様に各ウイルス遺伝子を野生型と同様の配置とすることが好ましい。一般にN、P、およびL遺伝子を保持しているベクターは、細胞内で自律的にRNAゲノムから遺伝子が発現し、ゲノムRNAが複製される。さらにFおよびHN遺伝子等のエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子、およびM遺伝子の働きにより、感染性のウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。従って、このようなベクターは伝播能を有するウイルスベクターとなる。樹状細胞に導入したい外来遺伝子は、後述するように、このゲノム中の蛋白質非コード領域に挿入すればよい。

[0056] また、本発明のマイナス鎖RNAウイルスベクターは、野生型ウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってよい。例えば、M、F、またはHN遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが含まれていないウイルスベクターも、本発明において好適に用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはウイルス遺伝子に欠損を有するため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および／またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組み換えマイナス鎖RNAウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P、およびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる(WO00/70055 および WO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000))。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いてウイルスを製造することもできる。これらの蛋白質群は、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

[0057] また、本発明において用いられるウイルスベクターとして、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウイルスのゲノムがコードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有するウイルスベクターを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。細胞への感染能を与える所望の蛋白質が用いられる。例えば、他のウイルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus; VSV)のG蛋白質(VSV-G)を挙げることができる。VSV-G蛋白質は、任意のVSV株に由来するものであってよい。例えば

Indiana血清型株(J. Virology 39: 519-528 (1981))由来のVSV-G蛋白を用いることができるが、これに限定されない。また本発明のベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質を任意に組み合わせて含むことができる。例えば、このような蛋白質として、ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適である。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質などが挙げられる。レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス(MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用い得る。また、MuMLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる(例えばpCL-10A1(Imgenex)(Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996))。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。これらの蛋白質は、細胞外ドメインをF蛋白質またはHN蛋白質の細胞内ドメインと結合させた融合蛋白質として用いてもよい。このように本発明において用いられるウイルスベクターには、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。ウイルスのゲノムRNAにはこれらのエンベロープ蛋白質をゲノムにコードされないように設計すれば、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

[0058] また、本発明において用いられるウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、ベクターの樹状細胞への特異性を制御し得る。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子(例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上などにある遺伝子)の発現により供給されてもよい。

[0059] またウイルスベクターは、例えばウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために

、またはRNAの転写効率または複製効率を高めるために、ベクターに含まれる任意のウイルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されていてよい。具体的には、例えば複製因子であるN、P、およびL遺伝子の中の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、エンベロープ蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン(hemagglutinin)活性とノイラミニダーゼ(neuraminidase)活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、F蛋白質を改変することにより膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質および/またはHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたウイルスベクターを作製することもできる。

[0060] またマイナス鎖RNAウイルスベクターは、アクセサリ遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリ遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性のない遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

[0061] マイナス鎖RNAウイルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み(integration)は起こらない(Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。マイナス鎖RNAウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばセンダイウイルス(SeV)を連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を

長期間に渡って安定に発現する事が示されている(Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性(flexibility)など性質上のメリットがある。このように、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ヒトの遺伝子治療のための高効率ベクターの新しいクラスとなることが示唆される。伝播能を有するSeVベクターは、外来遺伝子を少なくとも4kbまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事も可能である。

[0062] またセンダイウイルスは、齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている(Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用できることを示唆し、センダイウイルスベクターが、ヒト樹状細胞を標的とした遺伝子治療の有望な選択肢の一つとなることを結論づけるものである。

[0063] ウイルスベクターは、ゲノムRNA中に外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子を含む組換えウイルスベクターは、上記のウイルスベクターのゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする樹状細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、あるいは欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。外来遺伝子の挿入位置は、例えばウイルスゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位を選択することができ、例えばゲノムRNAの3'リーダー領域と3'端に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'端に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。また、FまたはHN遺伝子などを欠失するゲノムでは、その欠失領域に外来遺伝子をコードする核酸を挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入することが望ましい(Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。挿入した外来遺伝子とウイルスORFとの間には、E-I-S配列が構

成されるようにする。E-I-S配列を介して2またはそれ以上の遺伝子をタンデムに並べて挿入することができる。

[0064] ベクターに搭載する外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子の上流(ネガティブ鎖の3'側)に付加する転写開始配列の種類により調節することができる(WO01/18223)。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、ネガティブ鎖の3'の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5'の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。一般に、外来遺伝子の高い発現が得られることが有利と考えられるため、外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3'端近くに挿入することが好ましい。具体的には、3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間に挿入される。あるいは、3'に一番近いウイルス遺伝子のORFと2番目の遺伝子のORFの間に挿入してもよい。野生型パラミクソウイルスにおいては、ゲノムの3'に最も近いウイルス蛋白質遺伝子はN遺伝子であり、2番目の遺伝子はP遺伝子である。逆に、導入遺伝子の高発現が望ましくない場合は、例えばベクターにおける外来遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、ウイルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるようにすることも可能である。

[0065] マイナス鎖ウイルスベクターを製造するには、哺乳動物細胞において、ウイルスの成分であるRNPの再構成に必要なウイルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、ウイルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりネガティブ鎖ゲノム(すなわちウイルスゲノムと同じアンチセンス鎖)を生成させてもよく、あるいはポジティブ鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖)を生成させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはポジティブ鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を

利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。

- [0066] 例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスベクターは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/micro-L以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、NotI部位を利用してウイルスゲノムRNAをコードするDNAに外来遺伝子を挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異導入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅し回収する。2つのプライマーの5'部分にNotI部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端をNotI部位とする。ウイルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウイルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列が配置されるように、プライマー中にE-I-S配列を含めるように設計する。

- [0067] 例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

- [0068] リバース側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、最終的なPCR増幅産物のNotI断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する(いわゆる「6のルール(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。このプライマーにE-I-S配列を付加する場合には、挿入断片のオリゴDNAの3'側にセンダイウイルスのS配列、I配列、およびE配列の相補鎖配列、好ましくはそれぞれ 5'-CTTTCACCCT-3' (配列番号:1)、5'-AAG-3'、および 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (配列番号:2)を付加し、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成DNAの3'の末端とする。
- [0069] PCRは、Taqポリメラーゼまたはその他のDNAポリメラーゼを用いる通常の方法を用いることができる。増幅した目的断片はNotIで消化した後、pBluescript等のプラスミドベクターのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにゲノムcDNAのNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。
- [0070] 例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる(Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。例えば、NotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列(5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (配列番号:3)を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA(pSeV(+))のリーダー配列とN蛋白質のORFとの間に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖(antigenomic strand)由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18⁺b(+)を得る(Hasan, M. K. et

al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。pSeV18⁺b(+)のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

- [0071] このようにして作製した組み換えウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、上記のウイルス蛋白質(L、P、およびN)存在下で細胞内で転写させることにより、ウイルスベクターを再構成することができる。本発明は、樹状細胞導入用マイナス鎖RNAウイルスベクターを提供する。また本発明は、遺伝子が導入された樹状細胞の製造における、マイナス鎖RNAウイルスベクターの使用、および成熟樹状細胞の製造における、マイナス鎖RNAウイルスベクターの使用に関する。また本発明は、樹状細胞導入用マイナス鎖RNAウイルスベクターの製造のための、マイナス鎖RNAウイルスベクターのウイルスゲノムRNAをコードするDNAを提供する。また本発明は、本発明のベクターの製造に適用するための、該ベクターのゲノムRNAをコードするDNAの使用に関する。組み換えウイルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる(WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明のベクターを再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

- [0072] 具体的な手順は、(a) マイナス鎖RNAウイルスゲノムRNA (ネガティブ鎖RNA) またはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードするcDNAを、N、P、およびL蛋白質を発現する細胞で転写させる工程、(b) 生成したマイナス鎖RNAウイルスを含む培養上清を回収する工程、により製造することができる。転写のために、ゲノムRNAをコードするDNAは適当なプロモーターの下流に連結される。転写されたゲノムRNAは N、L、およびP蛋白質の存在下で複製されRNP複合体を形成する。そして M、HN、およびF蛋白質の存在下でエンベロープに包まれたウイルス粒子が形成される。ゲノムRNAをコードするDNAは、例えばT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAを細胞にトランスフェクトしてもよい。
- [0073] DNAからのゲノムRNAの最初の転写に必要なT7 RNAポリメラーゼ等の酵素は、これを発現するプラスミドまたはウイルスベクターの導入によって供給することができるし、または、例えば細胞の染色体にRNAポリメラーゼ遺伝子を、発現を誘導できるように組み込んでおき、ウイルス再構成時に発現を誘導することにより供給することもできる。またゲノムRNA、およびベクター再構成に必要なウイルス蛋白質は、例えばこれらが発現するプラスミドの導入によって供給する。これらのウイルス蛋白質の供給において、野生型またはある種の変異マイナス鎖RNAウイルスなどのヘルパーウイルスを用いることもできる。
- [0074] ゲノムRNAを発現するDNAを細胞内に導入する方法には、例えば次のような方法、(i) 目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、(ii) 目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、(iii) 目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。
- [0075] (ii)としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。(i)としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貪食小胞に取り込まれるが、核内

にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を 2〜4% CO_2 、35°C、15〜24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20〜30 micro-g/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。 (ii)の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10^5) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。 (iii)の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で (i)または (ii)の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

[0076] 以上、3つのカテゴリーの中で (ii)の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない。

[0077] cDNAからのウイルスの再構成は具体的には例えば以下のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質 (100 units/ml ペニシリンGおよび100 micro-g/ml ストレプトマイシン) を含む最少必須培地 (MEM) を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2 (ATCC CCL-7) をほぼ100%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 micro-g/ml psoralen (ソラレン) 存在下、紫外線 (UV) 照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1:

569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2〜60 micro-g、より好ましくは3〜20 micro-gの組換えセンダイウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウイルスRNPの生成に必須なトランスに作用するウイルス蛋白質を発現するプラスミド(0.5〜24 micro-gのpGEM-N、0.25〜12 micro-gのpGEM-P、および0.5〜24 micro-gのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect (QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は例えば2:1:2とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば1〜4 micro-gのpGEM-N、0.5〜2 micro-gのpGEM-P、および1〜4 micro-gのpGEM-L程度で適宜調整する。

- [0078] トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 micro-g/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40 micro-g/mlのシトシンアラビノシド(AraC) (Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48〜72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物をLLC-MK2細胞に再度トランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンまたはポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が進行しベクターが増幅する。得られたウイルス溶液を希釈(例えば 10^6 倍)して再増幅を繰り返すことにより、ワクシニアウイルスvTF7-3は完全に除去することができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返す。得られたベクターは-80℃で保存することができる。エンベロープ蛋白質をコードする遺

伝子を欠損した伝播能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞を重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる(国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070参照)。

[0079] 回収されたウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる(WO00/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、GFP(緑色蛍光蛋白質)などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる(例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる(WO00/70070)。

[0080] ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来の LLC-MK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに有する感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている(中西ら編,(1993),「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9-12日間 37-38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間(例えば3日間)卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。

尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代眞人,「ウイルス実験プロトコル」,永井、石浜監修,メジカルビュー社, pp.68-73,(1995))。

[0081] 例えば、F遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる(WO00/70055 および WO00/70070参照)。

<1> F遺伝子欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス(SeV)全長ゲノムcDNA、pSeV18⁺ b(+)(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) (「pSeV18⁺ b(+)」は「pSeV18⁺」ともいう)のcDNAを SphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F遺伝子欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF(ATG-TGA=1698bp)を除いて例えばatgcatgccggcagatga(配列番号:4)で連結し、F遺伝子欠失型SeVゲノムcDNA(pSeV18⁺/ΔF)を構築する。PCRは、Fの上流には[forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/配列番号:5, reverse: 5'-tttccggcatgcatgtttcccaagggagagttttgcaacc/配列番号:6]、F遺伝子の下流には[forward: 5'-atgcatgccggcagatga/配列番号:7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/配列番号:8]のプライマー対を用いたPCRの産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F遺伝子欠損部位を含む領域の断片(4931bp)を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18⁺のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18⁺/ΔFを得る。

外来遺伝子は、例えばpUC18/dFSSのF遺伝子欠失部位にある制限酵素 NsiI および NgoMIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、NsiI-tailed プライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

[0082] <2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子(SeV-F)を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物が

誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdlw(Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121)のユニークサイト SmaI部位に挿入し、プラスミドpCALNdLw/Fを構築する。

F遺伝子欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 micro-g/mlを添加したMEMで37℃、5% CO₂で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit (Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に導入する。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 micro-gのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37℃の5%CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL)を1200 micro-g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法(Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol 72,1115-1121 (1998))により例えば moi=3で感染させて行うことができる。

[0083] <3> F遺伝子欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18⁺/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにしてLLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を5×10⁶ cells/dish で

100mmのシャーレに播く。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、細胞培養24時間後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) をMOI 2程度で室温で1時間感染させる。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いることができる。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、ゲノムRNAを発現するプラスミド、およびマイナス鎖RNAウイルスのそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白質を発現する発現プラスミドを、適当なリポフェクション試薬を用いてこの細胞にトランスフェクトする。プラスミドの量比は、これに限定されないが、好適には順に 6:2:1:2:2:2 とすることができる。例えば、ゲノムRNAを発現するプラスミド、並びにN、P、L、および FプラスHN蛋白質を発現する発現プラスミド (pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HN; WO00/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) を、それぞれ12 micro-g, 4 micro-g, 2 micro-g, 4 micro-g及び4 micro-g/dishの量比トランスフェクトする。数時間培養後、血清を含まないMEMで細胞を2回洗浄し、40 micro-g/mLの Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 micro-g/mLの Trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁する (10^7 cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) と混合し (10^6 cells/25 micro-L DOSPER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞にトランスフェクション (10^6 cells /well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM (40 micro-g/ml AraC, 7.5 micro-g/ml トリプシンを含む) で培養し、上清を回収する。F以外の遺伝子、例えばHNまたはM遺伝子を欠損したウイルスも、これと同様の方法で調製することができる。

- [0084] ウイルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているウイルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウイルス蛋白質が、他のベクターか

らの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、ウイルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウイルス遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、ウイルス遺伝子が欠損しているため、ウイルス遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができる。また、ウイルス遺伝子の欠損により増殖性が無いこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

[0085] マイナス鎖RNAウイルスにより導入する外来遺伝子としては、特に制限はないが、天然の蛋白質としては、例えばホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、細胞内シグナル分子、酵素、ペプチドなどが挙げられる。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、キメラ毒素などの融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質(受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子などが挙げられる。また、分泌シグナル、膜局在化シグナル、または核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。導入遺伝子としてアンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどを発現させて、特定の遺伝子の機能を抑制することもできる。外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接(ex vivo)投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を樹状細胞から発現させることが可能である。また本発明の方法は、再生医療における遺伝子治療ベクターとしても利用できる。

[0086] 本明細書に記載したウイルス製造方法に従えば、本発明のウイルスベクターは、例えば 1×10^5 CIU/mL以上、好ましくは 1×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 1×10^7 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^7 CIU/mL以

上、より好ましくは 1×10^8 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^8 CIU/mL以上の力価でウイルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウイルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990); WO00/70070)。

[0087] 回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、吸着、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその任意の組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ベクターを含む溶液中でベクターの成分が主要な割合を占めることを言う。例えば実質的に純粋なウイルスベクター組成物は、溶液に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウイルスベクターの成分として含まれる蛋白質の割合が10% (重量/重量) 以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。例えばパラミクソウイルスベクターであれば、具体的な精製方法としては、セルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができるが、これらに制限されない。

[0088] ベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。このような担体または媒体としては、例えば脱イオン水、滅菌水、塩化ナトリウム溶液、デキストロース溶液、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸含有リンゲル溶液、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などが挙げられ、これらとベクターを適宜組み合わせることで製剤化することが考えられる。また、リボソームの膜安定化剤(例えばコレステロール等のステロール類)を含んでいてもよい。また、抗酸化剤(例えばトコフェロールまたはビタミンEなど)を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤

等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。また本発明のベクター組成物は溶液、凍結乾燥物、またはエアロゾルの形態の組成物であってよい。凍結乾燥物の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種蛋白質等を含んでいてもよい。本発明のベクターを含む組成物は樹状細胞に遺伝子を導入するための試薬として、さらに樹状細胞を標的とする遺伝子治療に用いる医薬として有用である。またベクター溶液はワクチンとして有用である(J.I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995))。また、本発明のベクターにより樹状細胞で抗原ペプチドを発現させれば、このペプチドを提示する細胞はワクチンとして使用できる。ワクチン組成物は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全Freund'sアジュバント、MF59 (オイルエマルジョン)、MTP-PE (マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide)、および QS-21 (soapbark tree *Quilaja saponaria* 由来)などのアジュバントを組み合わせることもできる。

[0089] また、組成物の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2と一本鎖IL-12との組み合わせ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, 1999)、ii) IL-2とインターフェロン- γ (米国特許第 5,798,100号)、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)、iv) GM-CSF と IL-4 の組み合わせ(J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999))などが挙げられる。

[0090] 樹状細胞に提示させる抗原は、マイナス鎖RNAウイルスベクターにコードさせたり、あるいはベクターを導入した樹状細胞に添加(すなわちパルス)したり、または別の所望のベクターで発現させることができる。抗原としては、感染微生物、ウイルス、寄生虫、病原体、および癌などに関連する所望の抗原が挙げられる。これらは、構造タンパク質または非構造タンパク質であってよい。このような抗原(またはそのプロセスされたペプチド)は、樹状細胞表面のMHC分子に結合して細胞表面に提示され、免疫応答が誘導される。

[0091] ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に

対して適用することができる。感染症の治療としては、例えば感染性微生物の抗原蛋白のエピトープを解析し、これを樹状細胞で発現または提示させることができる。

例えば病原体由来の抗原としては、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、デルタ型肝炎ウイルス、乳頭腫ウイルス抗原、単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘-帯状疱疹ウイルス(VZV)、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、HIV、およびマラリアなどが有する蛋白質またはその部分ペプチドが挙げられる。これらの抗原蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスは、予防的および治療的に用いることができる。具体的には、例えばインフルエンザにおいては、強毒株H5N1型等のエンベロープ、日本脳炎においては、例えば日本脳炎ウイルスのエンベロープ蛋白質(Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えばHIV gagまたはSIV gag 蛋白質(J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIVエンベロープ蛋白質、Nef蛋白質、その他のウイルス蛋白質などが挙げられる。コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット(CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8, Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク(Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8):949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000))などが挙げられる。また、その他の病原性ウイルスの抗原蛋白質をベクターから発現させることもできる。また、日本脳炎のJE-E抗原タンパク質(特開昭64-74982、特開平1-285498)、ヒト単純ヘルペスウイルスのgD2タンパク質(特開平5-252965)、C型肝炎ウイルス由来ポリペプチド(特開平5-192160)、偽狂犬病ウイルス由来ポリペプチド(特表平7-502173)などを用いることもできる。例えば、これらの病原性微生物に感染した患者由来の細胞を解析して、抗原提示細胞(APC)において提示された抗原蛋白のエピトープを同定し、これを用いてもよい。HLA型を適宜選択することにより、所望のHLA型に対するエピトープを同定して用いることも好ましい。

- [0092] 腫瘍に対する免疫応答を特異的に促進させるには、1以上の腫瘍抗原を発現するマイナス鎖RNAウイルスベクターを樹状細胞に導入、またはマイナス鎖RNAウイルスベクターで活性化した樹状細胞に腫瘍抗原をパルスする。腫瘍抗原は腫瘍細胞に

特異的なもの（すなわち、腫瘍細胞に存在するが、非腫瘍細胞には存在しないもの）であっても、同じタイプの非腫瘍細胞よりも腫瘍細胞に高レベルで存在するものであってもよい。この樹状細胞を投与することにより免疫系が刺激される。CTLが主なエフェクターとして働く場合は、抗原としては細胞内外に発現する所望の腫瘍抗原を用いることができる。樹状細胞を用いて、CD4 T細胞の活性化から引き続くB細胞の活性化による抗体産生を惹起し、抗体をエフェクターとして作用させる場合には、抗原としては細胞表面に表出するものが好ましく、例えば、細胞表面受容体または細胞接着蛋白質を用いることができる。腫瘍抗原の例としては、卵巣癌等にするMuc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド（米国特許第 5,744,144号）、子宮頸癌を引き起こすヒト乳頭腫ウイルス蛋白質E6およびE7、メラノーマ抗原MART-1、MAGE-1、-2、-3、gp100およびチロシナーゼ、前立腺癌抗原PSA、その他にも、CEA（Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 90-96）、およびHer2neu（HER2p63-71、p780-788; Eur. J. Immunol. 2000; 30: 3338-3346）などが挙げられる。

[0093] 本発明によって調製される樹状細胞は、癌および感染症に対する有効な免疫療法において有用であり、腫瘍抗原もしくは感染症関連抗原の遺伝子が導入された樹状細胞またはその樹状細胞で刺激されたT細胞による免疫感作は、患者において抗腫瘍または抗感染症免疫を誘導する有効な方法となる。本発明は、本発明の方法により得られた樹状細胞の免疫反応の誘導における使用にも関する。すなわち本発明は、本発明の方法により得られた樹状細胞の、免疫療法における使用、具体的には、例えば腫瘍または感染症の治療における使用に関する。また本発明は、本発明の方法により得られた樹状細胞の、免疫活性化剤の製造における使用に関する。すなわち本発明は、本発明の方法により得られた樹状細胞の、免疫治療剤の製造における使用、具体的には、例えば抗腫瘍剤（腫瘍増殖抑制剤）または感染症治療薬の製造における使用に関する。

[0094] また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドをエピトープとして利用することが考えられる（Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-94）。

[0095] また、樹状細胞からサイトカイン類を発現させれば、免疫系を刺激して、感染微生物

物または癌に対する免疫応答を高めることから、サイトカインをコードする遺伝子を導入した樹状細胞でも、癌その他のサイトカイン治療が有効と考えられる疾患の治療において有用である。免疫刺激性サイトカインをコードする遺伝子を搭載するマイナス鎖RNAウイルスベクターが導入された樹状細胞は効果的な免疫誘導剤となる。例えば、免疫刺激性サイトカインとして、インターロイキン(例えば、IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-23、IL-27)、インターフェロン(例えば、IFN-alpha、IFN-beta、IFN-gamma)、腫瘍壊死因子(TNF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)-beta、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インスリン様増殖因子(IGF)-I、IGF-2、Flt-3リガンド、Fasリガンド、およびc-kitリガンド、ならびに他の免疫調節タンパク質(ケモカインおよびコステミュラトリー分子など)が含まれる。

[0096] これらのサイトカインのアミノ酸配列は当業者には周知であり、IL-4については、例えば、Araiら(1989)、J. Immunol. 142(1) 274-282、IL-6については、例えば、Yasukawaら(1987)、EMBO J., 6(10): 2939-2945、IL-12は、例えば、Wolfら(1991)、J. Immunol. 146(9): 3074-3081、IFN-alphaは、例えば、Grenら(1984) J. Interferon Res. 4(4): 609-617、およびWeismannら(1982) Princess Takamatsu Symp. 12: 1-22、TNFは、例えば、Pennicaら(1984) Nature 312: 724-729、G-CSFは、例えば、Hiranoら(1986) Nature 324:73-76、GM-CSFは、例えば、Cantrellら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(18): 6250-6254 を参照することができる。より具体的には、GM-CSFをコードする核酸配列としては Accession number NM_000758の84-461番目の配列(アミノ酸配列はNP_000749の18-144番目)を含む配列が挙げられる。IL-4をコードする核酸配列としては、Accession number NM_000589の443-829番目の配列(アミノ酸配列はNP_000580の25-153番目)を含む配列が挙げられる。これらのサイトカインをコードする天然の遺伝子または遺伝子暗号の縮重を利用して、機能的サイトカインをなおコードする変異遺伝子を含むベクターを設計し、樹状細胞に導入することができる。

[0097] また、これらのサイトカインの改変体を発現するように遺伝子改変してもよい。例え

ば、前駆体および成熟体の2つの形態を持つサイトカイン(例えば、シグナルペプチドの切断により活性フラグメントを生成するもの、または蛋白質の限定分解により活性フラグメントを生成するものなど)について、前駆体または成熟体のいずれかを発現するように遺伝子改変してもよい。その他の改変体(例えば、サイトカインの活性フラグメントと異種配列(例えば、異種シグナルペプチド)との間の融合タンパク質)を用いてもよい。

[0098] 例えば実施例に示すように、IFN-beta遺伝子を搭載したマイナス鎖RNAウイルスベクターを導入した樹状細胞は、細胞傷害性Tリンパ球を非常に強く活性化させ、抗原である腫瘍の増殖を有意に抑制する。樹状細胞はベクターの導入により活性化されるので、毒性のあるLPS等で樹状細胞を刺激する必要もない。このように、IFN-beta遺伝子を搭載したマイナス鎖RNAウイルスベクターを導入した樹状細胞は、抗腫瘍免疫治療のための有望な治療薬となる。IFN-beta遺伝子はヒトおよびマウスを含む多くの霊長類、哺乳類で周知であり、例えばヒトIFN-beta遺伝子は配列番号:12(成熟型ポリペプチドは配列番号:13の21-187番目)、マウスIFN-betaは配列番号:14(成熟型ポリペプチドは配列番号:15の21-182番目)が挙げられる(Derynck, R. et al., Nature 285, 542-547 (1980); Higashi, Y. et al., J. Biol. Chem. 258, 9522-9529 (1983); Kuga, T. et al., Nucleic Acids Res. 17, 3291 (1989))。シグナルペプチドは、適宜他の蛋白質のシグナル配列に置換してもよい。

[0099] IFN-beta遺伝子は、上記の既知のIFN-beta cDNAおよび蛋白質の配列を基にホモロジー検索等により探し出すことができる(例えばBLAST; Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)。あるいは、既知のIFN-beta cDNA塩基配列を基に設計したプライマーを用いたRT-PCRにより得ることもできるし、またはIFN-beta cDNAをプローブにしてストリンジントな条件におけるハイブリダイゼーションにより、ヒト、マウス、ラット、およびその他の哺乳動物cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得ることも容易である。ハイブリダイゼーションの条件は、IFN-beta cDNAのコード領域を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。プローブは該核酸の断片であってよく、その長さは通常20塩基以上、

好ましくは30塩基以上、より好ましくは50塩基以上である。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5×SSC (1×SSC は 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrateを含む)、7%(W/V) SDS、100 micro-g/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト液 (1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは52℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60℃、さらにこの好ましくは65℃、最も好ましくは68℃で2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中 (例えば 0.1×SSC中) で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

- [0100] 哺乳動物IFN-betaの塩基配列またはアミノ酸配列は、一般に既知のIFN-betaの配列 (例えば配列番号:12-15の成熟蛋白質に対応する配列) と高いホモロジーを有する配列を含んでいる。高いホモロジーとは、70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性 (identity) を有する配列である。配列の同一性は、例えばBLASTプログラムにより決定することができる (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)。具体的には、塩基配列の同一性を決定するにはblastnプログラム、アミノ酸配列の同一性を決定するにはblastpプログラムを用い、例えばNCBI (National Center for Biothchnology Information) のBLASTのウェブページにおいて「Low complexity」などのフィルターの設定は全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて計算を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。パラメータの設定は、例えばopen gapのコストはヌクレオチドは5で蛋白質は11、extend gapのコストはヌクレオチドは2で蛋白質は1、nucleotide mismatchのペナルティーは-3、nucleotide matchの報酬は1、expect valueは10、wordsizeはヌクレオチドは11で蛋白質は2、Dropoff (X) for blast extensions in bitsはblastnでは20で他のプログラムでは7、X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastn以外では15、final X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastnでは50で他のプログラ

ムでは25にする。アミノ酸配列の比較においては、スコアのためのマトリックスとしてBLOSUM62を用いることができる。2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、IFN-betaの成熟蛋白質のコード配列(CDS)の外側のギャップは無視して、IFN-betaの成熟蛋白質のCDS全体(例えば配列番号:12の64-561番目または14の64-546番目)またはアミノ酸配列全体(例えば配列番号:13の22-187番目または配列番号:15の22-182番目)に対する同一性の値を計算する。

[0101] また、IFN-betaには多型およびバリエーションが存在する。野生型IFN-betaと同等の活性が維持されたバリエーションを適宜使用することができる。野生型IFN-betaと同等の活性とは、抗ウイルス活性が挙げられ、例えばvesicular stomatitis virusによる細胞毒性を阻害する活性のアッセイにより測定することができる。具体的には、WISH cells (CCL-25; A.T.C.C. (American Type Culture Collection), Manassas, VA, U.S.A.) に vesicular stomatitis-Indiana-virus [VR-1238AF; A.T.C.C.] を接種し、ウイルスによる細胞死を検出し、IFN-betaによる防御を測定する(測定条件は、Knezic, Z., et al. (1993) Antiviral Res. 25, 215-221 に従う)。ウイルスによる細胞死の50%抑制濃度は、1 international unit (IU) と定義される。野生型IFN-betaと同等の抗ウイルス活性を持つポリペプチドは、好ましくは 1×10^6 IU/mg protein以上、より好ましくは 5×10^6 IU/mg protein以上、より好ましくは 1×10^7 IU/mg protein以上の比活性を示す。また、野生型IFN-betaと同等の抗ウイルス活性を持つポリペプチドは、好ましくは野生型IFN-betaの1/10以上の比活性で抗ウイルス活性を示す。

[0102] IFN-betaの多型およびバリエーションは、一般にある1つのIFN-beta分子種(例えば配列番号:12-15)の塩基配列またはアミノ酸配列において1または複数の残基が置換、欠失、および/または挿入された配列を含み得る。公知のIFN-betaの配列との違いは、通常30残基以内、好ましくは20残基以内、好ましくは10残基以内、より好ましくは5残基以内、より好ましくは3残基以内、より好ましくは2残基以内である。アミノ酸の置換は、保存的置換であってもよい。保存的に置換した蛋白質は活性が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、

酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。

[0103] すなわちIFN-beta遺伝子としては、以下に記載の核酸が挙げられる。

(a) 配列番号:13の22-187番目または配列番号:15の22-182番目に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸。

(b) 配列番号:12の64-561番目、配列番号:14の64-546番目、またはそれらの相補配列を含み、配列番号:13の22-187番目または配列番号:15の22-182番目に記載の配列を含むポリペプチドをコードする核酸。

(c) 配列番号:12の64-561番目、配列番号:14の64-546番目、またはそれらの相補配列の核酸断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、野生型IFN-betaと同等の活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

(d) 配列番号:13の22-187番目または配列番号:15の22-182番目に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または挿入された配列を含み、野生型IFN-betaと同等の活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

(e) 配列番号:12の64-561番目、配列番号:14の64-546番目、またはそれらの相補配列と高いホモロジーを有する配列を含む核酸であって、野生型IFN-betaと同等の活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

(f) 配列番号:13の22-187番目または配列番号:15の22-182番目と高いホモロジーを有する配列を含み、野生型IFN-betaと同等の活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0104] マイナス鎖RNAウイルスベクターにより遺伝子改変された樹状細胞は、患者自身のT細胞をin vivoで刺激するのに有用であり、あるいはこの遺伝子改変樹状細胞はT細胞をin vitroで刺激するのに有用である。感作したT細胞を患者に投与し、エキスビが免疫療法を介して患者の免疫系を刺激することもできる。

- [0105] 本発明は、樹状細胞により刺激されたT細胞の製造方法であって、(a) マイナス鎖RNAウイルスベクターを樹状細胞またはその前駆細胞に接触させる工程、(b) 該細胞を成熟樹状細胞に分化させる工程、(c) 該成熟樹状細胞をT細胞に接触させる工程、を含む方法に関する。樹状細胞で提示させる抗原は、ベクターから発現させた蛋白質(またはそのプロセスされた産物)であってもよいし、外から樹状細胞にパルスしてもよい。マイナス鎖RNAウイルスベクターを導入した樹状細胞はT細胞を活性化し、CTLを誘導する。
- [0106] また本発明は、本発明の方法により製造した樹状細胞を用いて、免疫系を刺激する方法に関する。例えば感染症または癌などに罹患した患者において免疫系を刺激する治療を行うことができる。この方法は、樹状細胞またはT細胞を投与する工程を含む方法である。具体的には、(a) マイナス鎖RNAウイルスベクターが導入された樹状細胞の治療上有効量を、患者に投与する工程、あるいは、(b) マイナス鎖RNAウイルスベクターが導入された樹状細胞によって刺激された、治療上有効量のT細胞を患者に投与する工程、を含む方法である。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、外来遺伝子を持たないものであってもよく、あるいは疾患に関連する抗原またはサイトカインの1つまたは複数をコードする遺伝子を持つものであってもよい。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、樹状細胞に感染することにより樹状細胞を活性化するので、外来遺伝子を持たないベクターを感染させた樹状細胞でも、患者の免疫系を活性化させることができる。この樹状細胞に、抗原ペプチドをパルスして、所望の抗原を提示させることで、より効果の高い樹状細胞をうることができる。また、インビトロでT細胞と樹状細胞を接触させる場合、患者からT細胞を採取して、エキスビボ投与を行うことが好ましい。
- [0107] ベクターのインビボでの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われうる。投与は局所あるいは全身であってよい。投与されるベクターは好ましくは約 10^5 CIU/mlから約 10^{11} CIU/ml、より好ましくは約 10^7 CIU/mlから約 10^9 CIU/ml、最も

好ましくは約 1×10^8 CIU/mlから約 5×10^8 CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は 2×10^5 CIU〜 2×10^{11} CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比(例えば平均値)で上記の投与量を換算した量を投与することができる。なお、伝播性のマイナス鎖RNAウイルスベクターを個体または細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑止する必要が生じた際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することもできる。

- [0108] エクスビゴ投与の場合は、体外(例えば試験管またはシャーレ内)で樹状細胞にベクターを接触させる。MOIは1〜500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2〜300、さらに好ましくは3〜200、さらに好ましくは5〜100、さらに好ましくは7〜70である。ベクターの投与対象としては特に制限はないが、例えば、ニワトリ、ウズラ、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ネコ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サル、およびヒトを含む鳥類、哺乳動物(ヒトおよび非ヒト哺乳動物)、およびその他の脊椎動物が挙げられる。
- [0109] ベクターを導入した樹状細胞を投与する場合は、一般的には、筋肉内、腹腔内、皮下もしくは静脈内注射、あるいは、リンパ節への直接注入によって注入することができる。好ましくは皮下、腹腔内注射またはリンパ節への直接注入により、患者に投与する。形質導入された樹状細胞は、一般的には 10^5 〜 10^9 細胞、好ましくは 10^6 〜 10^8 細胞、より好ましくは約 10^7 細胞を患者に投与することができる。
- [0110] マイナス鎖RNAウイルスベクターが導入された樹状細胞は、抗腫瘍剤として有用である。例えばベクターを導入した樹状細胞を腫瘍部位に投与することによって、腫瘍の増殖を抑制することができる。腫瘍部位とは、腫瘍またはその周囲(例えば腫瘍から5 mm以内、好ましくは3 mm以内)の領域を言う。ベクターは外来遺伝子を搭載していなくても抗腫瘍効果が期待できるが、IFN-beta遺伝子をベクターに搭載させることでより高い効果が得られる。樹状細胞を腫瘍に投与する前に、樹状細胞に腫瘍抗原を接触させるとより高い効果を得ることができる。樹状細胞への腫瘍抗原の接触は、

樹状細胞と腫瘍細胞のcell lysate (細胞溶解物) とを混合する方法、腫瘍抗原ペプチドを樹状細胞にパルスする方法、あるいは樹状細胞に腫瘍抗原遺伝子を導入して発現させる方法などを用いることができる。また、IFN-betaまたはIFN-beta遺伝子を搭載するベクターを腫瘍に直接注入することによっても抗腫瘍効果が得られる。例えばIFN-beta遺伝子を搭載するマイナス鎖RNAウイルスベクターは、抗腫瘍剤として優れている。マイナス鎖RNAウイルスベクターを導入した樹状細胞の投与と、IFN-beta遺伝子を搭載するベクターの腫瘍部位への注入を組み合わせれば、より高い抗腫瘍効果が発揮される。

[0111] 樹状細胞により活性化したT細胞を投与する場合は、例えばT細胞は、 1 m^2 の体表面積あたり約 10^5 〜 10^9 細胞、好ましくは 10^6 〜 10^9 細胞、より好ましくは 10^8 〜 10^9 細胞の用量で、静脈内注入によって投与され得る(Ridellら、1992、Science 257: 238-241を参照)。注入は、所望の間隔(例えば、毎月)で繰り返され得る。投与後のレシピエントは、必要に応じて任意の副作用について、T細胞注入の間または注入後にモニターされてよい。このとき、T細胞は樹状細胞を得た患者と同じ患者から得ることが好ましい。あるいは、T細胞を患者から採取し、T細胞を刺激するために用いる樹状細胞は、HLA適合性の健常なドナーに由来してもよい。または逆に、樹状細胞を患者から採取し、T細胞はHLA適合性の健常なドナーに由来してもよい。

[0112] 本発明により製造されるワクチンの有効成分である樹状細胞を含む細胞は、ヒト体内に治療用のワクチンとして接種することから、細胞増殖性を無くしておくことより安全である。例えば、臍帯血由来の単球は分化誘導することにより増殖能が極度に低下することが知られているが、細胞ワクチンとしてより安全に利用するため、加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンC処理などで処理し、ワクチンとしての機能を残したまま、増殖性をなくすことができる。例えば、X線照射を利用する場合、総放射線量1000〜3300 Radで照射することができる。マイトマイシンC処理法は、例えば、樹状細胞に25〜50 micro-g/mlのマイトマイシン Cを添加し、37°C、30〜60分間保温処理することができる。熱による細胞処理方法は、例えば、50〜65°Cで20分間加熱処理を行うことができる。

実施例

[0113] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

[0114] A. 導入効率の検討

(実験1)

健常者より単球をネガティブセレクションで濃縮 (enrichment) した。単球の濃縮のためのネガティブセレクションは、RosetteSepTM-human monocyte enrichment cocktail (Stem Cell Technology Inc.) を用いた。すなわち、tetrameric antibody (抗体2分子が結合している抗体で、一方は赤血球を認識する抗glycophorin A抗体、他方が単核球の表面抗原を認識する抗体でできている) を用い、除去したい細胞を赤血球に結合させ、Ficoll PaqueTM Plus (Pharmacia Biotech Inc.) で除去することにより実施した。このネガティブセレクションにより、CD2、CD3、CD8、CD19、CD56、CD66bを発現している細胞が除去され、残った細胞を単球濃縮細胞として、次のDCの分化誘導に用いた。この時のCD14⁺細胞は65-80%であった。単球濃縮細胞に GM-CSF (500 U/ml) とIL-4 (250 U/ml) を添加し、endotoxin free RPMI + 10%FCSで培養後、DCの作成を行った。3-4日目に半分の培養上清を同じ組成の新しい培養液で培養液交換を行った。副刺激分子 (Costimulatory molecule)、ならびにCD11c、HLA-class II (DR, DP, DQ)、およびCD1aの発現が陽性であることを確認し、その他のlineage marker (CD3、CD56、CD19、CD15およびCD14) を表出していないことも確認した (図1および非提示データ)。この細胞を用いて、ベクターの導入効率を検討した。この時点で、生細胞の90-98%がDCマーカー (CD11c、HLA-class II(DR,DP,DQ)) を発現していた。

なお、本実施例におけるセレクションは上記キットを用いたが、抗体でコートされた磁気ビーズを用いても、同様のセレクションを実施することが可能である。血球分離等を持ちて単核球を採取するなど、細胞を大量に調製する場合は、ビーズを用いることが好ましい。

[0115] (実験2)

実験1より得られたDC (分化誘導後7日目) に、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する

センダイウイルスベクター (SeV-GFP) (伝播型、WO00/70070) をMOIをふって感染させ、経時的に細胞数の変化、GFPの発現、costimulatory moleculesの発現程度について検討した。その結果、MOIについては、MOI 20以上で%GFPは最大となった (図2〜5)。GFPの平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) については、MOI 100まで上げることにより更に上昇させることが可能である (非提示データ)。また、8日目までGFPのMFIは上昇した。costimulatory molecules (CD80およびCD86) については、全体的にMOI 20以上で最大となった。細胞数の減少については、MOIで1〜20の間はあまり変化ないが、MOI 50ではやや減少する傾向が見られたが有意差はなかった (図6)。

[0116] (実験3)

MOI 20でDCにSeV-GFPを感染させ、経時的にFACSを用いて、GFPの発現を検討した。その結果、2週以後は発現が低下する (細胞数も減少) もの、2箇月までは発現細胞を確認できた (図7)。以下の実施例で示すように、マイナス鎖RNAウイルスベクターの感染でDCは活性化される。従って、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いたDCへの遺伝子導入は臨床応用として、ワクチンへの応用が可能である。投与はインビボでもエキスビボでも可能であるが、例えばエキスビボ投与によりベクターを感染させたDCを頻回投与することにより、長期にわたって体内における遺伝子発現を持続させることが可能である。

[0117] (実験4)

活性化と感染効率を検討した。活性化の有無でベクターの感染効率が変わるかどうか検討を行った。7日間培養後のDCに2日間LPS (1 micro-g/ml) で刺激した後、SeV-GFPをMOI 30で感染、2日後にFACSでGFPを解析した。逆にSeV-GFP感染2日後にLPS刺激 (2日間) を同じ条件で施行した。 (図8および9)

結果;ヒトでは、LPSで活性化した後に、%GFPにおいて60%近くの陽性を認めた。これに対してマウスDCでは陽性率は極めて低かった (非提示データ)。しかしヒトにおいてもMFIは非常に低く、活性化した後のDCには遺伝子導入効率の極端な低下を認めた。これに対して、ベクターを導入後にLPSで刺激しても、遺伝子導入効率は変化しなかった。この結果は、マイナス鎖RNAウイルスベクターでDCに遺伝子導入する

場合は、未成熟DC、すなわち活性化を受けていないDCを使用することが好ましいことを示している。

[0118] (実験5)

感染に必要な接触時間の検討を行った(図10)。その結果、約30分以下で遺伝子導入が可能であることが判明した。

[0119] (実験6)

他のウイルスベクターでの報告でCD34細胞に遺伝子導入し、DC分化誘導で遺伝子導入DC作製に成功した報告がある(J. Immunol. Meth. 2002; 153-165)。

SeV-GFPでも同様の方法を試みた。ヒト臍帯血より、CD34マイクロビーズを用いて、CD34陽性幹細胞を分離(CD34 >90%)し、MOI 0、10、100で感染させた後、良く洗浄した。その細胞をRPMI + 10%FCSにSCF (50 ng/ml)、GM-CSF (500 U/ml)、TNF-alpha (50 ng/ml) を添加し、3日間培養後、SCF (50 ng/ml)、GM-CSF (500 U/ml)、IL-4 (250 U/ml)、TNF-alpha (50ng/ml) を添加したメジウムで継代(半量のメジウムを3〜4日に交換)したものをベクターの感染より13日目にGFPの発現を検討した。その結果、遺伝子導入効率は65〜70%に達し、他のベクター以上にGFPの発現効率の良いDCが作製された。感染後のDCは副刺激分子の発現の解析より、感染させていないものと比べて活性化を受けているものが回収された。(図11および12)

以上の実施例から、マイナス鎖RNAウイルスはレンチウイルス、レトロウイルスに比較して、導入効率は格段に優れており、アデノウイルスに劣らない導入効率を極めて簡便に迅速に得ることができることが実証された。また、他のベクターでは活性化マーカーは変動しないが、マイナス鎖RNAウイルスの感染によりDCを活性化を誘導できることが判明した。

[0120] B. 導入後のDC機能の評価

(実験1)

DCにSeV-GFPをMOI 30-50で感染させ、1日後にLPSで刺激(2日間)し、その後、costimulatory moleculesの発現を検討した。コントロールとして、LPS刺激のみ、SeV-GFP感染のみ、およびLPS刺激もSeV-GFP感染もなし、の条件について比較検討した。

結果;得られた結果から、SeV感染のみでもDCの活性化が起こることが示された。

LPSと匹敵するもの;CD80(+)HLA-DR(-)CD83(-)

LPSより強いもの;CD86(+)CCR7(-)

LPSより弱いもの;CD40(-)

(+)はLPS+SeVで相乗効果のあるものを表す。(図13-15)

[0121] (実験2)

MOI 30でDCにSeV-GFPを感染(感染後3日目、感染後1日目に、あるグループはLPSで刺激)させ、実験1と同様の群について、食細胞能力を検討した(1 micro-m PCV-RED latex-microspheres を使用。棒グラフは4℃で陽性となるバックグラウンドを差し引いたもの)。

結果;活性化マーカーでも見たように、SeVで感染したものは、活性化のため、食食能の低下が見られた。特に、GFPの発現が高いもの程、食食能が低かった。従って、例えばDCで腫瘍抗原を提示させるために腫瘍のlysateを使用する場合は、マイナス鎖RNAウイルスベクターをDCに導入する前にlysateとDCを共培養することが好ましい。(図16-17)

[0122] (実験3)

SeVによる樹状細胞の活性化に伴う樹状細胞サイトカイン産生能を検討するために、7日間の培養で得られた単球由来樹状細胞 (MoDC) を12穴のプレートで48時間(8×10^5 /2ml/well:メディウムはX-vivo15TM+2%自己血清+ GM-CSF (500 U/ml)+IL-4 (250 U/ml))、以下の群の条件で培養した上清中のTNF-alpha、IL-1beta、IL-6、IL-8の値をLuminexTM systemで測定した。SeVの感染はMOI 30で2日間培養した。

Unstimulated群:メディウムのみの群

Allantoic fluid群:SeVの浮遊液である鶏卵しょう尿液(SeVは含まない)60 micro-L添加した群

UV-SeV-GFP群:SeV-GFP溶液を紫外線照射し、replication能力を除去した溶液60 micro-L添加した群

SeV-GFP:SeV-GFP溶液を60 micro-L添加した群(replication-competent SeV)

結果:replication-competent SeVでGFPを遺伝子導入した樹状細胞のみ

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6を産生、IL-8の産生を増大した(図18)。この時の、樹状細胞上のCD40、CD80、CD83、CD86、HLA-DRの発現上昇は replication-competent SeVのみに誘導された(図19および20)。このことは、SeVを樹状細胞に遺伝子導入するのみで、免疫応答時に重要な炎症性サイトカイン(proinflammatory cytokine)の樹状細胞による産生を惹起することができることを意味している。また、樹状細胞遺伝子導入時における樹状細胞の膜上のレセプターとSeVの接触による樹状細胞の活性化というよりも、SeVの感染後におこるSeVのRNAの増幅過程が、樹状細胞の活性化に重要であることも示唆している。

[0123] (実験4)

同様の実験群について、それらのDCを3000 radの放射線を照射した後、T細胞の活性化能力について検討した。(doseをふったDCと純化(CD3⁺>95%)のアロあるいは syngenic T細胞と3日間共培養した)。SeV-GFPに対する反応の指標として、syngenic T細胞を用いた。

結果;DC比とT細胞の量が少なく差が比較的顕著でないが、SeV感染単独で、LPSに匹敵するアロT細胞刺激性を持っていることが示された(図21)。なお、DCは放射線照射しないで用いることも可能である。

[0124] C. 癌抗原特異的CTLの誘導

Aに記載の方法でヒト末梢血(HLA-A 0201の健常ドナー)より、CD14⁺細胞を濃縮し、x-vivo 15TM (Cambrex社製) + 2% autologous serumをメディウムとして、GM-CSF (500U/ml)、IL-4 (250U/ml) を添加(3〜4日に一度、半量のメディウムを交換)、未熟樹状細胞を作製した。作製した未熟樹状細胞を次の3群に分け、更に48時間 GM-CSF (500U/ml)、IL-4 (250U/ml) の存在下に培養した。

1群 何も加えない

2群 SeV-GFPの感染(MOI 30)

3群 サイトカインのカクテル(IL-1 β 50ng/ml、IL-6 500ng/ml、IFN- α 2500U/ml、TNF- α 100ng/ml、PGE2 20 micro-M) による刺激

その後、樹状細胞を回収して、MART-1ペプチド(EAAGIGILTV(配列番号:9))をパルス(50 micro-g/ml; 3時間)して、樹状細胞を採取したのと同じ健常人末梢血のT

細胞をネガティブセレクションで濃縮 ($CD3^+ > 97\%$) して、ペプチドパルスした上記3群の樹状細胞と7日間培養した (X-vivo 15TM + 2% autologous serum)。 (3-4日毎、あるいはメディウムの黄変時に半量のメディウムを交換した。最初の刺激時はIL-2なしでT細胞と樹状細胞を混合培養し、3日目からIL-2を100 U/ml添加開始した。) これを2回繰り返し、それぞれの混合培養から、細胞を回収し、CTL assayのエフェクター細胞として使用した。

ターゲット細胞は、T2細胞 (HLA-A2⁺の人から得られたT細胞-B細胞ハイブリドーマでTAP欠損細胞株) を使用した。この細胞は、TAP (class Iへのトランスポーター) がいないため、細胞質内の蛋白の分解により産生されたペプチドをClass Iに誘導できないことから、ペプチドを外来から添加するとそのペプチドがClass Iにloadされて、Class Iの発現が起こる。このターゲットを変異MART-1ペプチド (ELAGIGILTV (配列番号: 10)) (上記の刺激で使ったペプチドに対してT細胞レセプター認識部は変化なく、HLA-A2の結合を強めたもの) をパルスしたもの、Influenzaのペプチド (Flu; third partyとしてのペプチド; GILGFVFTL (配列番号: 11)) をパルスしたものを作製し、Crで細胞をラベルし、上記3群のエフェクターT細胞とこの2種類のtargetを20:1、10:1、5:1、2.5:1 で4時間混合培養してCTL活性を調べた。

以下に実験の組み合わせをまとめた。

エフェクター細胞	ターゲット細胞	図のシンボル
1群のエフェクターT細胞	変異MART1ペプチド + T2細胞	実線の黒四角
2群のエフェクターT細胞	変異MART1ペプチド + T2細胞	実線の黒三角
3群のエフェクターT細胞	変異MART1ペプチド + T2細胞	実線の黒逆三角
1群のエフェクターT細胞	Fluペプチド + T2細胞	点線の黒菱形
2群のエフェクターT細胞	Fluペプチド + T2細胞	点線の黒丸
3群のエフェクターT細胞	Fluペプチド + T2細胞	点線の白四角

結果; 上記3群のDCで活性化をしていないDC (MART1ペプチド+) でT細胞を刺激しても、MART-1特異的CTLは誘導できないが、ポジティブコントロールとして、サイト

カインで活性化(現在腫瘍免疫の樹状細胞療法で最も強く活性化できる方法)した樹状細胞で、T細胞を刺激するとMART-1特異的CTLが誘導できた(ターゲットにパルスする変異MART-1ペプチドに替えて、刺激に用いたMART-1ペプチドを用いても同様の結果が得られた)。SeVで遺伝子導入した樹状細胞を使用した場合、ポジティブコントロールと同程度のCTL活性が得られた(図22)。つまり、CTLアッセイで判定した場合、SeVを感染させるだけで樹状細胞は活性化され、サイトカインで活性化した樹状細胞と同じレベルにin vitroでCTLを誘導できることが示された。T細胞賦活化としてSeVを使用すれば、標的遺伝子の導入とともに活性化が起こせるので、サイトカインなどの活性化因子を添加する必要がなくなり、コスト節減、時間節減、細胞のviabilityの保持に寄与する。

[0125] D. 免疫刺激性サイトカイン遺伝子の導入効果

SeVにより活性化した樹状細胞が抗腫瘍免疫を発揮することができるかをインビボで検討した。腫瘍モデルとして、MHC Class Iを非常に低いレベルでしか発現せず免疫原性に乏しいB16メラノーマの移植モデルを採用した。腫瘍モデルマウスには、C57BL/6マウス(6〜8週齢、メス)(日本チャールズ・リバー)を用い、樹状細胞はC57BL/6マウス(8週齢、メス)(日本チャールズ・リバー)より採取した。樹状細胞は、C57BL/6マウス的大腿骨より骨髓を採取し、SpinSepTM, murine hematopoietic progenitor enrichment cocktail (抗CD5抗体, 抗CD45R抗体, 抗CD11b抗体, 抗Gr-1抗体, 抗TER119抗体, 抗7/4抗体, StemCell technology)を使用し、T cellを除去した後、IL-4およびGM-CSFを添加し1週間培養して得た。1 x 10⁵/100 micro-LのB16メラノーマ細胞をday 0にマウスの腹部皮下(s.c.)接種した。Day 10、17、および24に、活性化刺激を加えない樹状細胞、LPSで活性化させた樹状細胞(LPS DC)、あるいはSeV-GFPまたはマウス インターフェロン β を発現するSeV-IFN β を導入して活性化させた樹状細胞(それぞれSeV GFP DCまたはSeV IFN β DC)を腫瘍周囲に投与した。このとき、樹状細胞に腫瘍抗原(B16のfreeze and thawによる腫瘍ライセート)をパルスしてから投与する実験も行った。これらとは別に、腫瘍接種後10日目(day 10)にSeV-IFN β を直接、腫瘍内注入(intratumoral injection)して抗腫瘍効果を調べる実験も行った。

樹状細胞へのSeVの導入では、上記のように1週間培養した樹状細胞にSeV-IFN β をMOI 40で感染させ、8時間培養した。腫瘍抗原をパルスする場合は、上記のように1週間培養した樹状細胞を回収し、腫瘍抗原となるtumor lysateをパルス (DC : tumor lysate= 1 : 3) し、18時間培養した後、SeV-IFN β をMOI 40で感染させ、8時間培養した。その後、これらの樹状細胞を回収し、 5×10^5 から 10×10^5 細胞数をマウスの腫瘍周囲に投与した。

[0126] 図23に示すように、SeV-IFN β の直接腫瘍内注入では、注入後2週間は腫瘍増殖を抑制したが、その後の再増殖が明確であった。DC/SeV-GFPを用いた場合、有意な抗腫瘍効果が認められ、DC/LPSで処理したマウス、およびDC/SeV-IFN β で処理したマウスにおいて、最も強い腫瘍抑制が観察された。

[0127] 上記の各治療群における抗腫瘍効果をより詳細に検討した。ナチュラルキラー (NK) 細胞活性をアッセイするために、上記の各治療群について、3回のDC療法終了7日後のマウスより脾臓を摘出し、エフェクター細胞を作成した。ターゲットとしてYac-1を使用し、 ^{51}Cr 放出アッセイを行った。また、Tリンパ球の細胞傷害性をアッセイするため、上記のNK細胞活性アッセイに使用した脾臓細胞の残りをを用いて、B16の腫瘍抗原であるTRP-2ペプチドとともに、5日間培養した細胞をエフェクター細胞として用い、mTRP-2ペプチドをパルスしたEL-4ターゲット細胞と共培養し、 ^{51}Cr 放出アッセイを行った。特異的 ^{51}Cr 放出の割合は以下のように計算した。

$$[(\text{試料のcpm} - \text{自発放出のcpm}) / (\text{最大放出のcpm} - \text{自発放出のcpm})] \times 100$$

ここで、最大放出は1% triton X と共にインキュベートしたターゲット細胞、自発放出は培養液のみでインキュベートしたターゲット細胞を用いた。

[0128] ナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化は、直接ベクターを注入したマウスにのみ見られ、樹状細胞投与群では検出されなかった(図24)。これに対して、細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) の活性化は、DC/LPS処理群およびDC/SeV-IFN β で処理したマウスで最も強く、DC/SeV-GFP処理群ではそれよりも若干弱く、SeV-IFN β の直接注入群では検出されなかった(図25)。腫瘍ライセートのパルスは、腫瘍増殖にもCTL応答にも有意に影響しなかった。このように、SeVにより免疫刺激性サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を用いた腫瘍免疫治療は、抗腫

瘍治療効果を発揮することが示された。DC/LPS処理群とDC/SeV-IFN β 処理群の間でCTL活性に若干の違いがあるにも関わらず、同程度の抗腫瘍効果が見られた。IFN β 発現ベクターの直接注入と、樹状細胞を介したIFN β の発現により誘導される抗腫瘍機構には違いがあることから、これらを組み合わせた治療はより効果を発揮することが期待される。

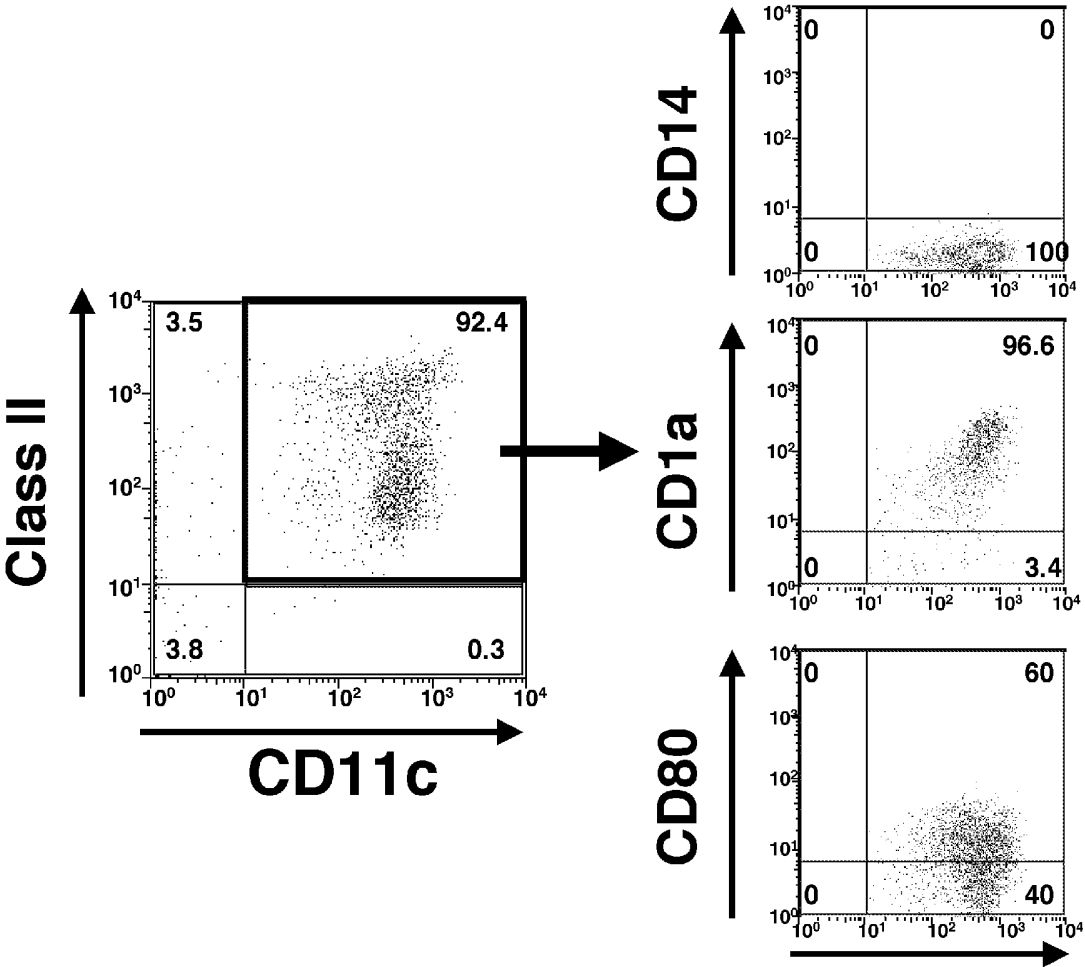
産業上の利用可能性

[0129] 本発明により、樹状細胞に効率的に遺伝子を導入することが可能となった。本発明のベクターは、ウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などに好適に用いられる。樹状細胞は高い免疫誘導作用を有するため、本発明の方法により所望の抗原遺伝子または免疫活性化遺伝子を樹状細胞に導入することにより、抗原特異的細胞性免疫を誘導するDCワクチンを製造することが可能となる。

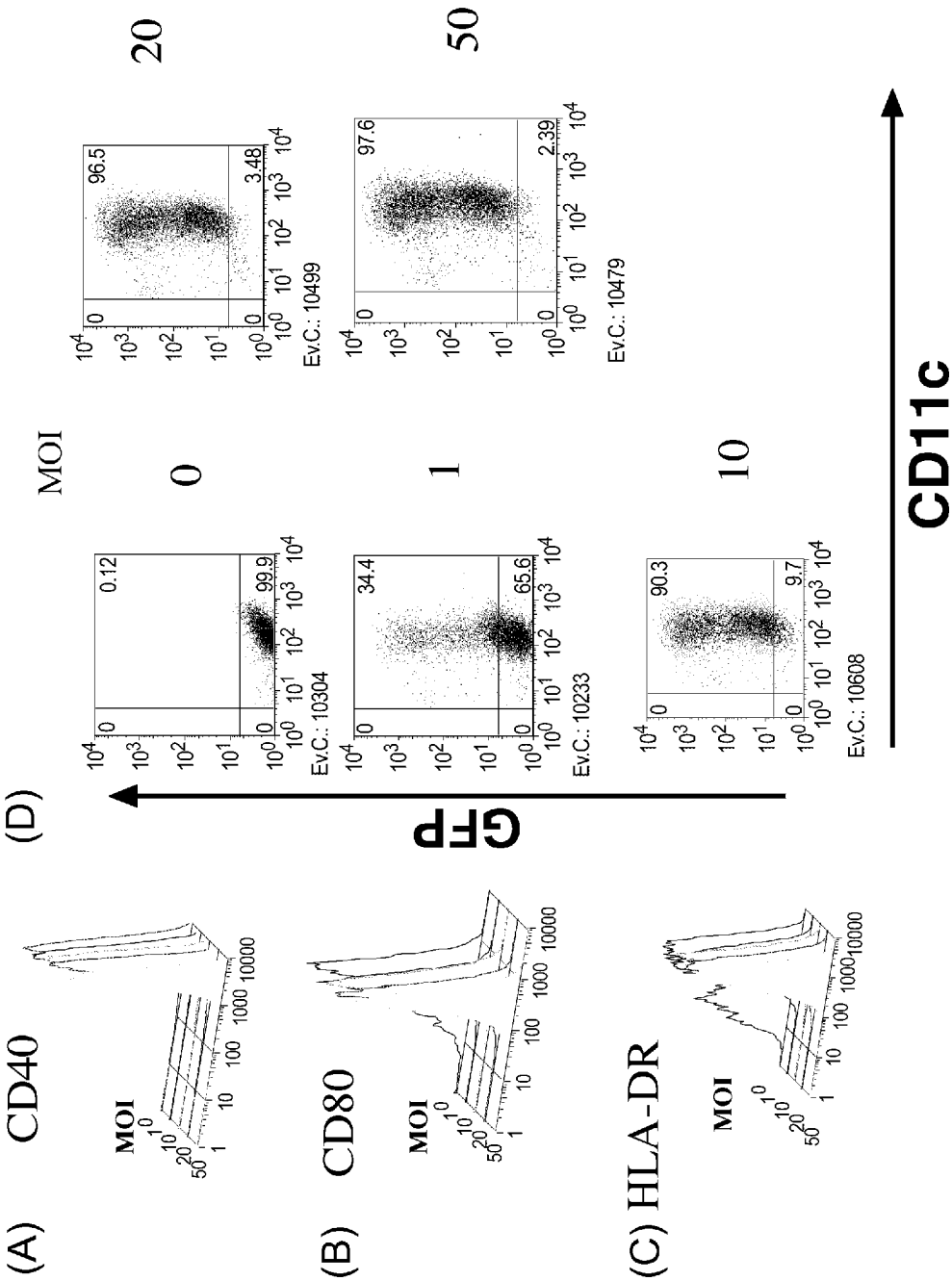
請求の範囲

- [1] 遺伝子導入された樹状細胞の製造方法であって、樹状細胞またはその前駆細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程を含む方法。
- [2] 成熟樹状細胞の製造方法であって、樹状細胞またはその前駆細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程を含む方法。
- [3] 接触工程が、未成熟樹状細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程である、請求項1または2に記載の方法。
- [4] 接触工程が、CD34⁺細胞にマイナス鎖RNAウイルスベクターを接触させる工程である、請求項1または2に記載の方法。
- [5] 接触前または後の細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養する工程さらに含む、請求項3または4に記載の方法。
- [6] 該ベクターがサイトカイン遺伝子を有する、請求項1または2に記載の方法。
- [7] サイトカインがインターフェロン β である、請求項6に記載の方法。
- [8] マイナス鎖RNAウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、請求項1または2に記載の方法。
- [9] パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項8に記載の方法。
- [10] 細胞がヒト細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [11] 請求項1から10のいずれかに記載の方法により製造された、該ベクターを保持する細胞。
- [12] 成熟樹状細胞である、請求項11に記載の細胞。
- [13] 請求項11に記載の樹状細胞を腫瘍部位に投与する工程を含む、腫瘍増殖を抑制する方法。
- [14] 樹状細胞に腫瘍抗原を接触および/または発現させる工程をさらに含む、請求項13に記載の方法。

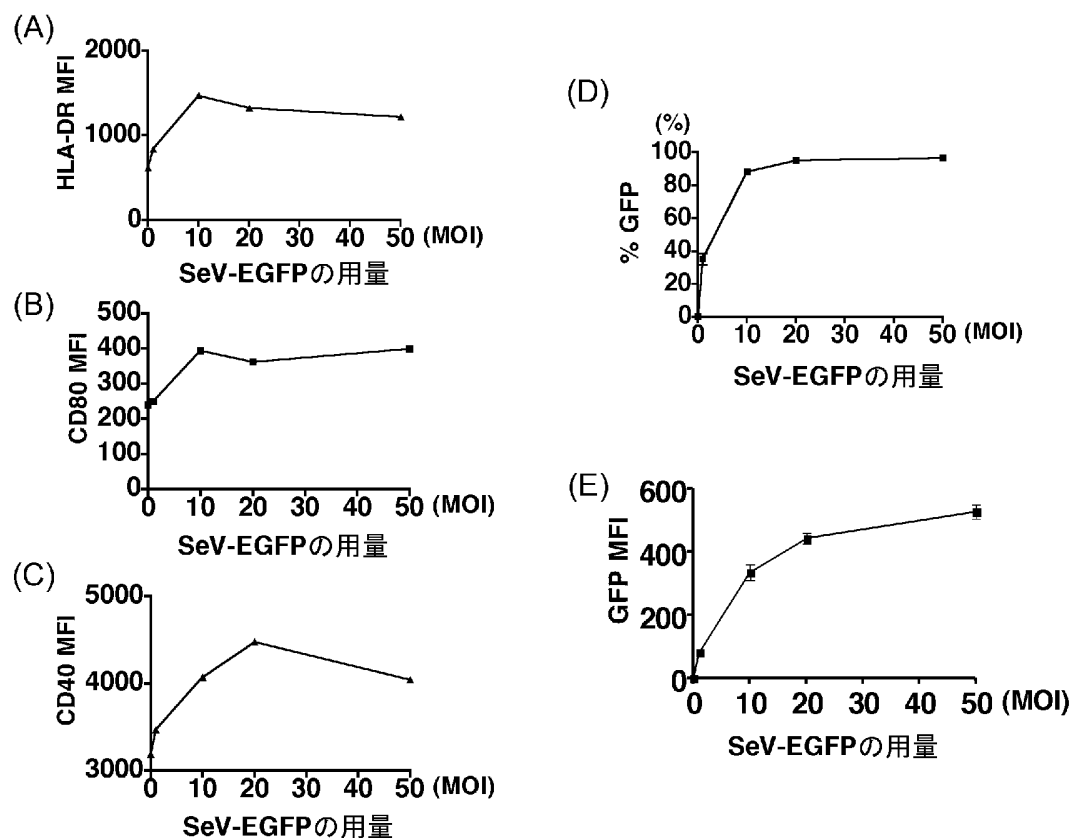
[図1]



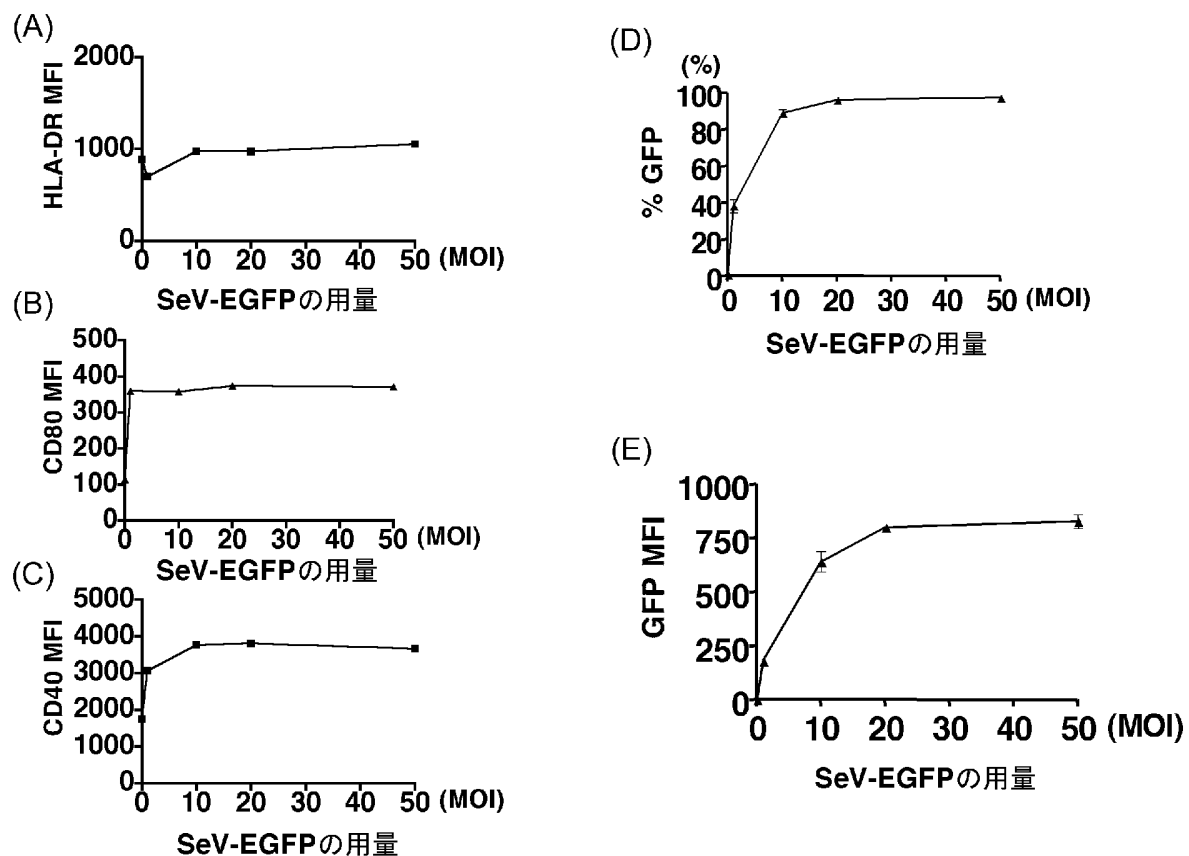
[図2]



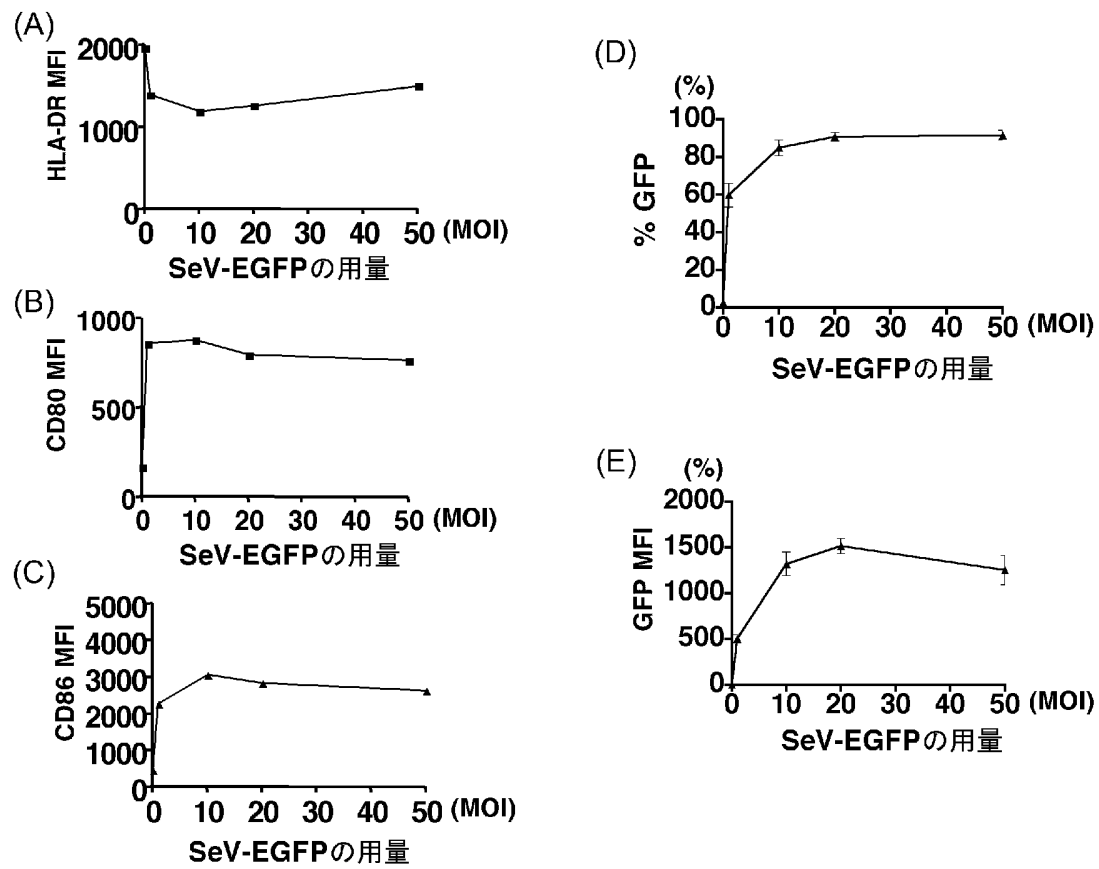
[図3]



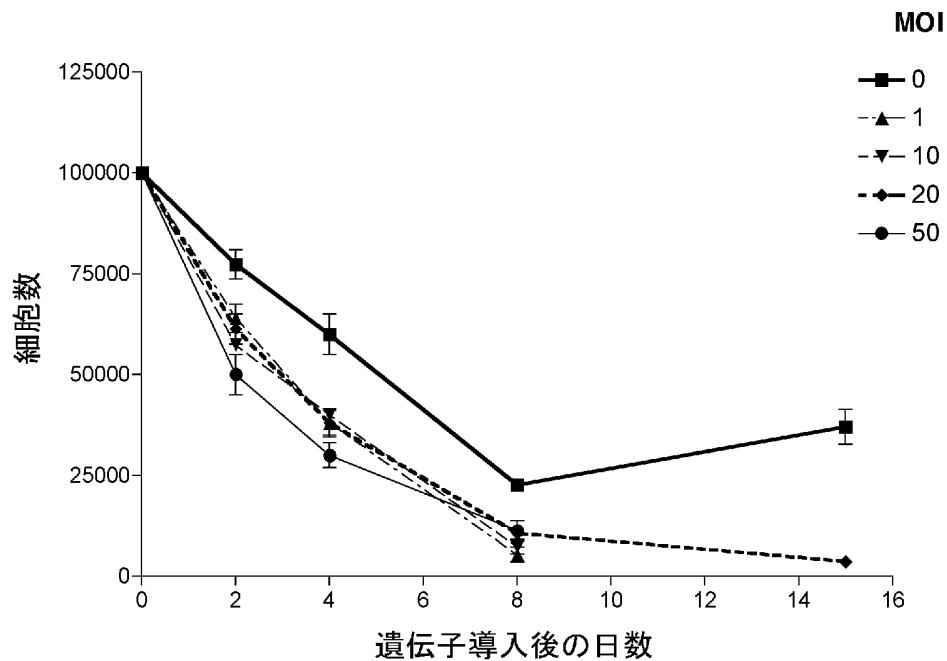
[図4]



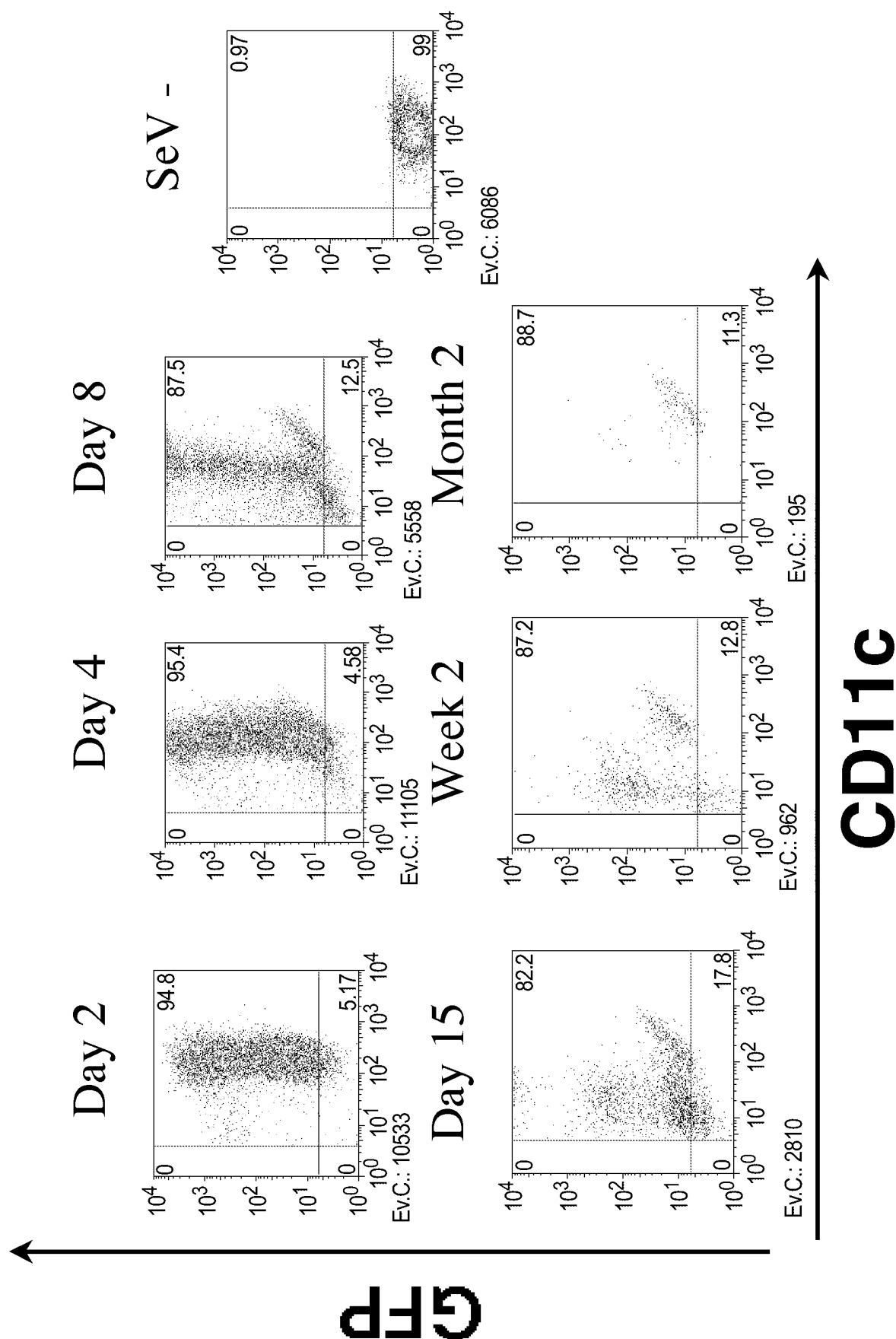
[図5]



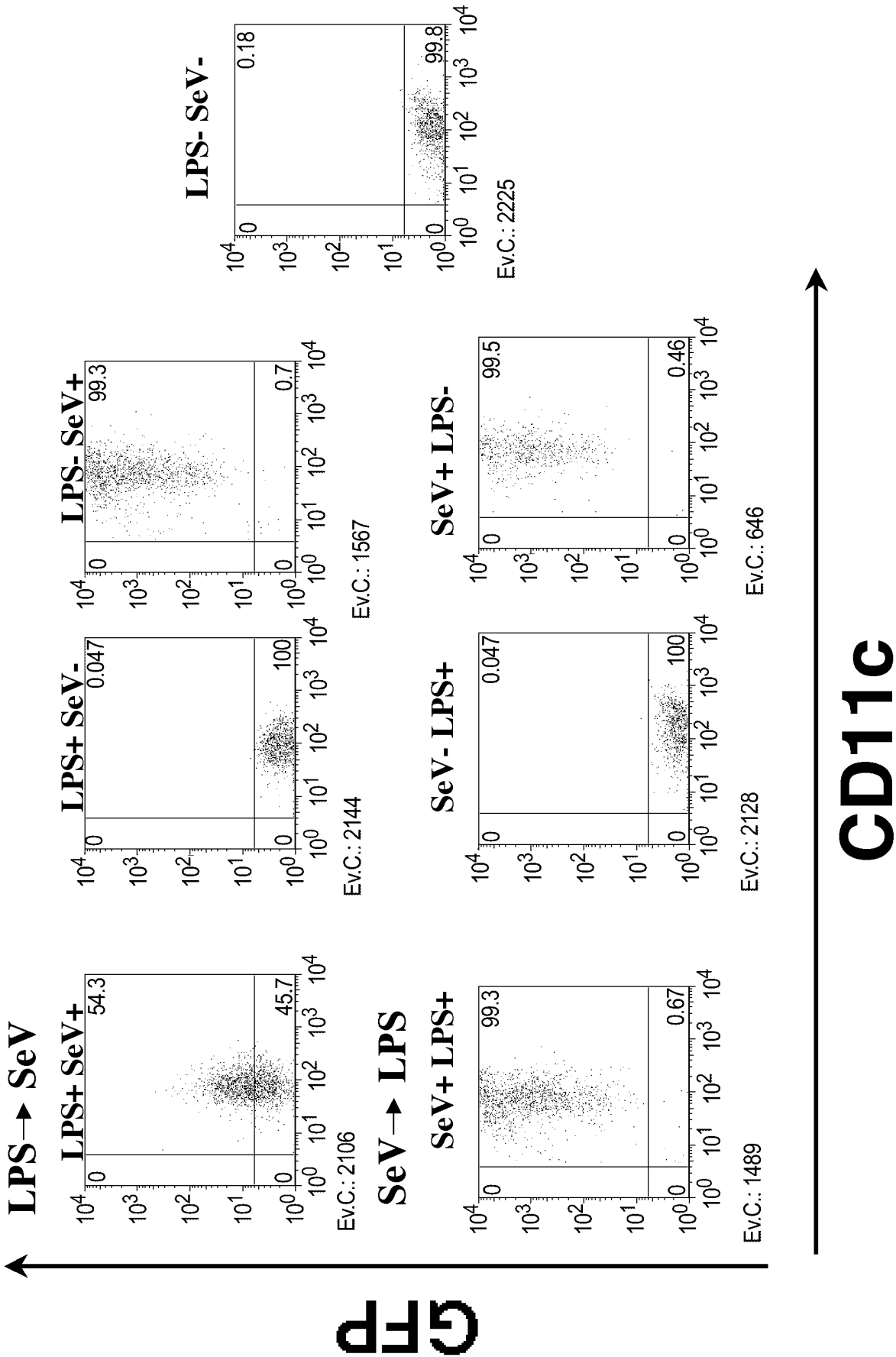
[図6]



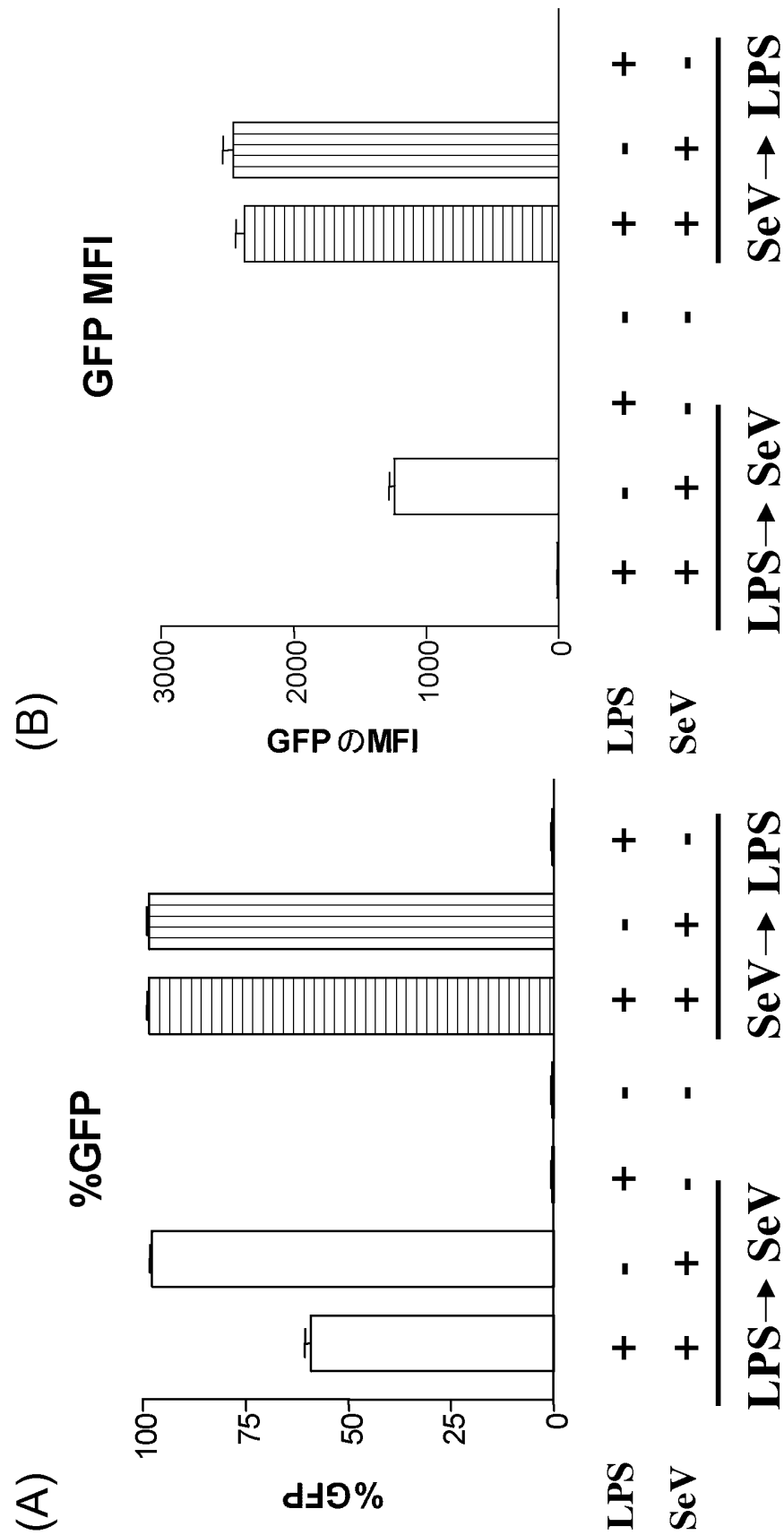
[図7]



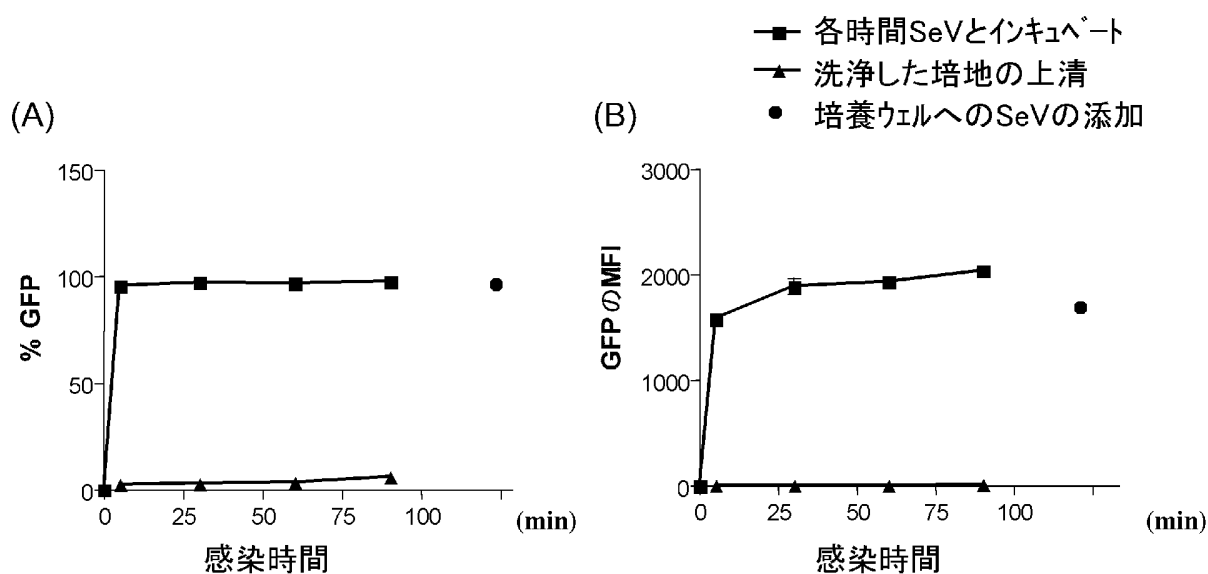
[図8]



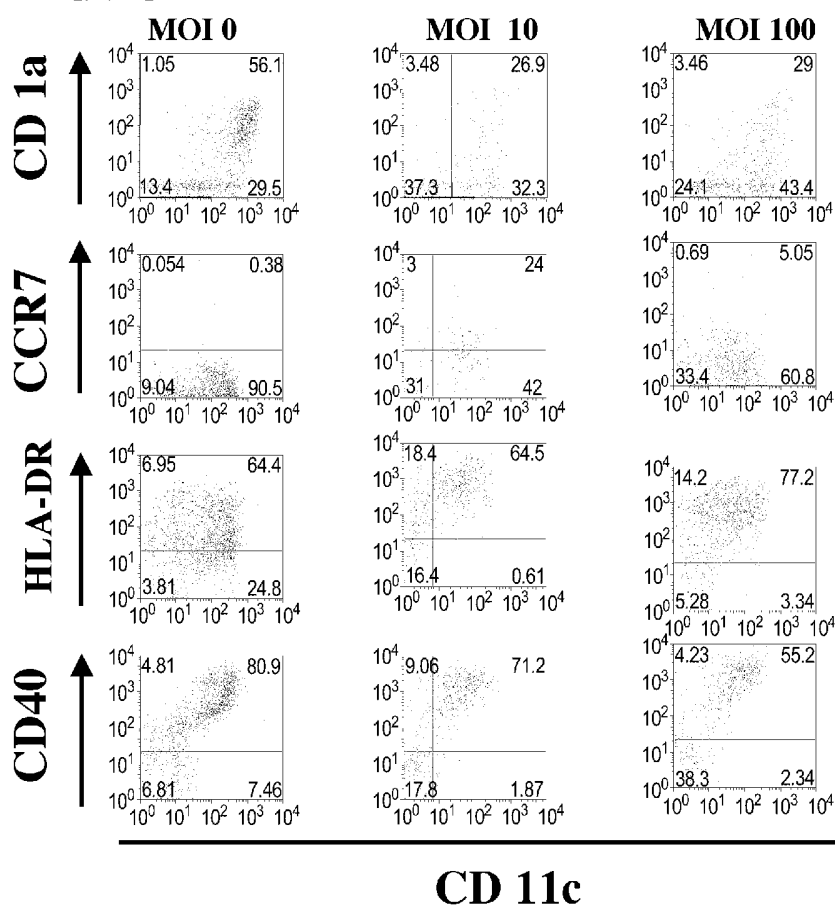
[図9]



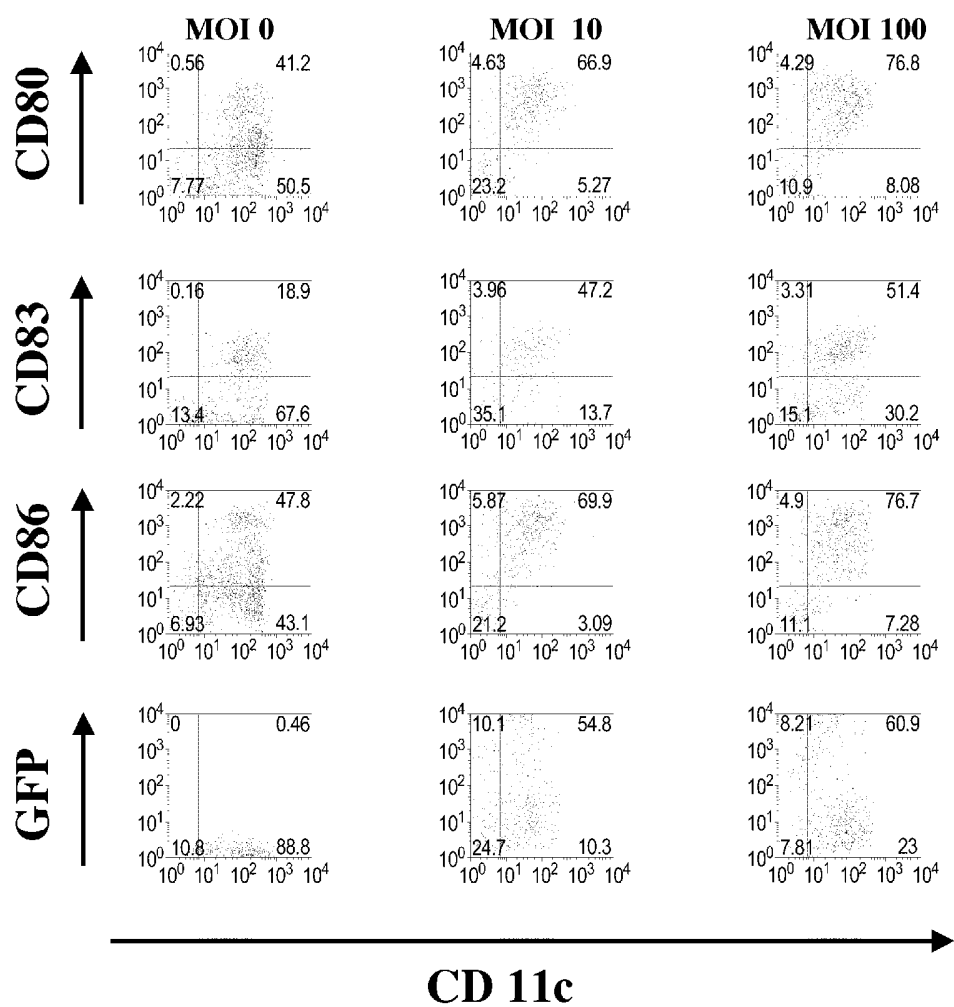
[図10]



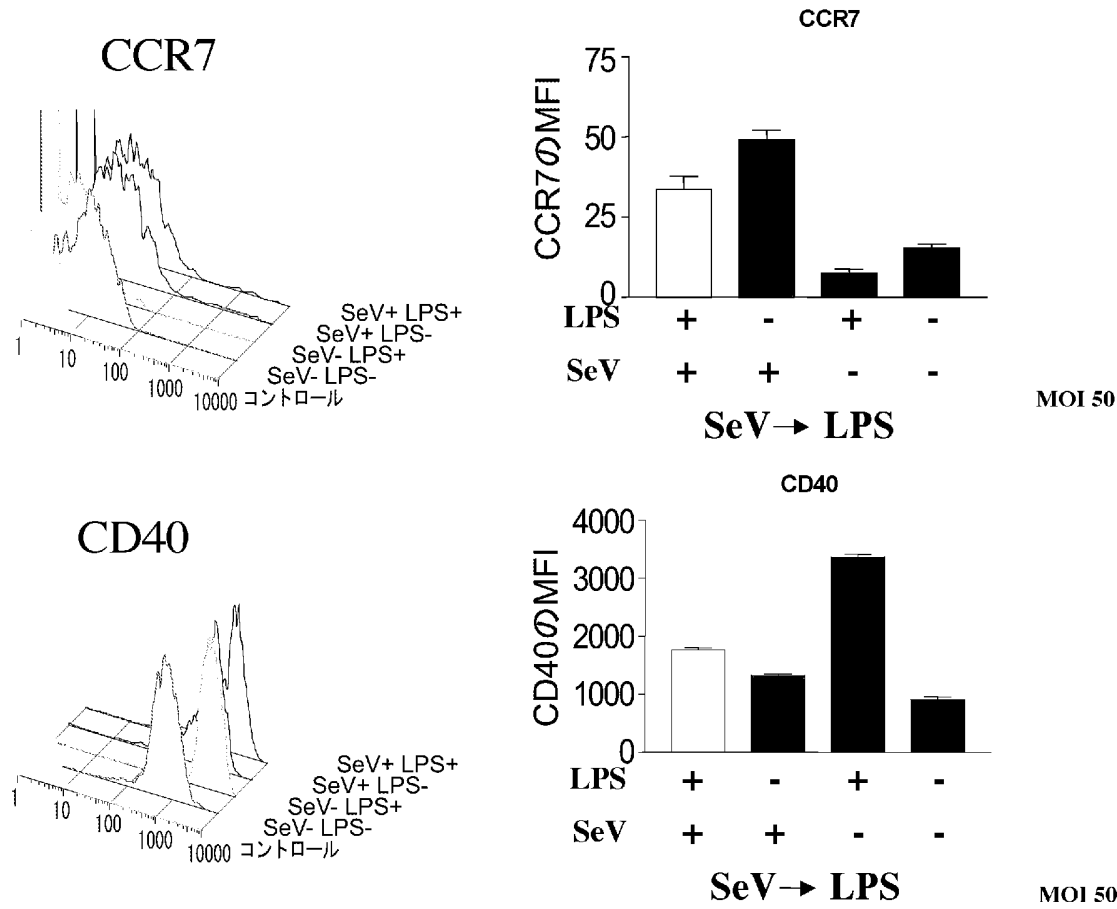
[図11]



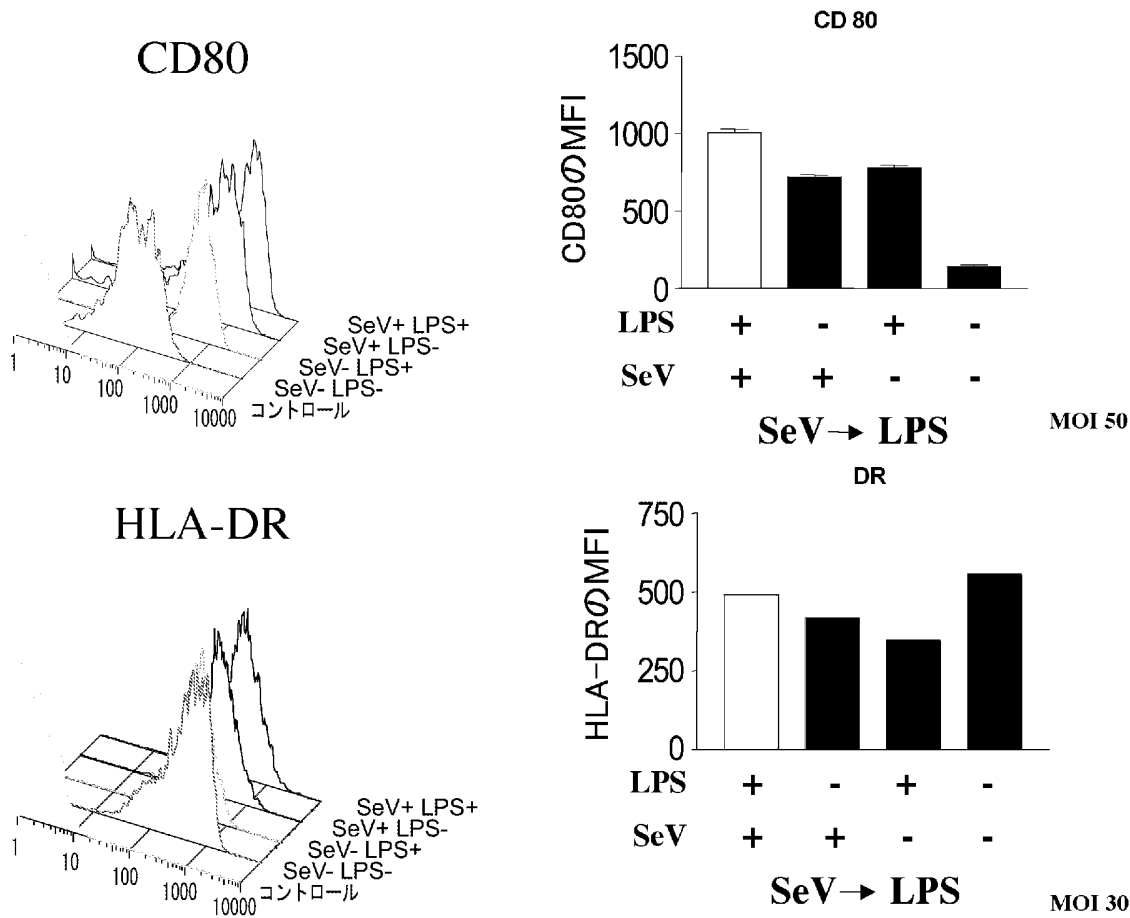
[図12]



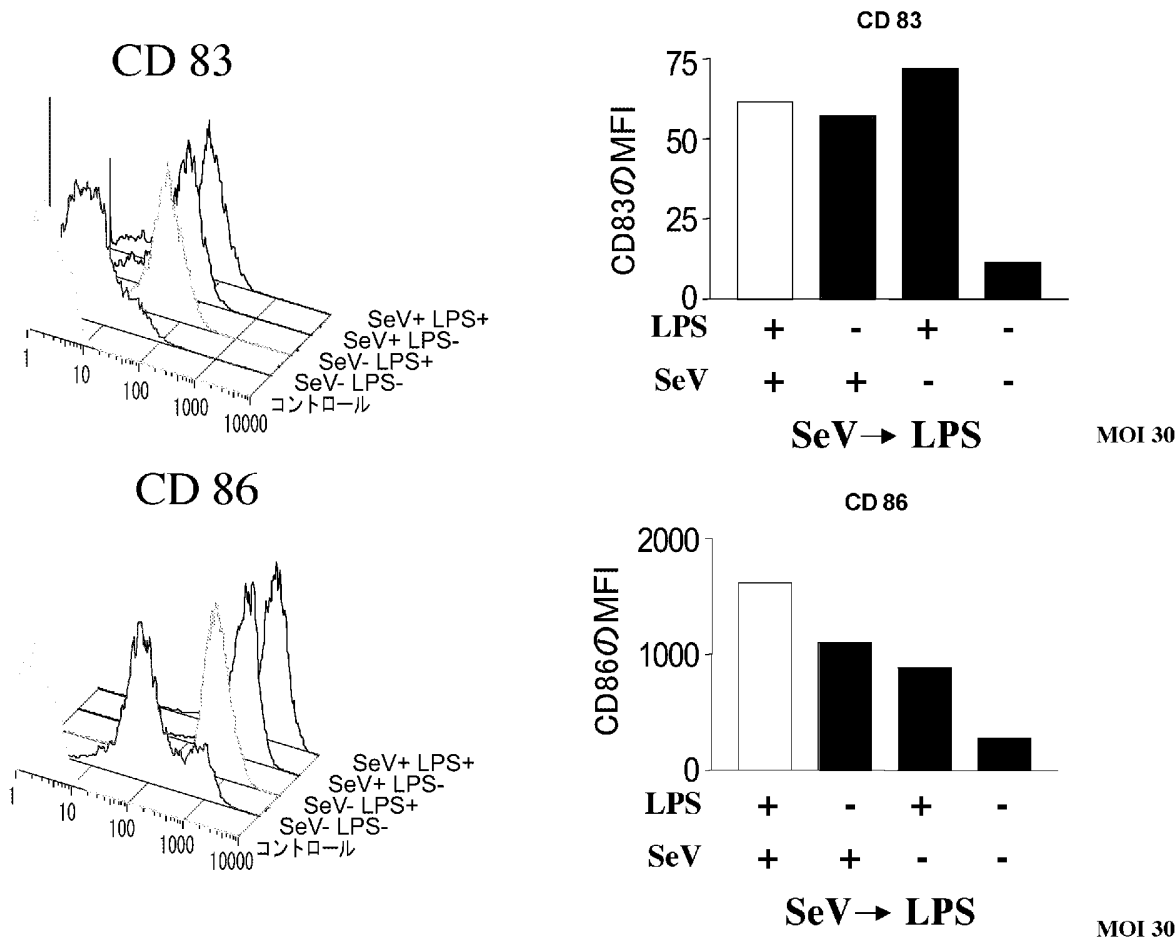
[図13]



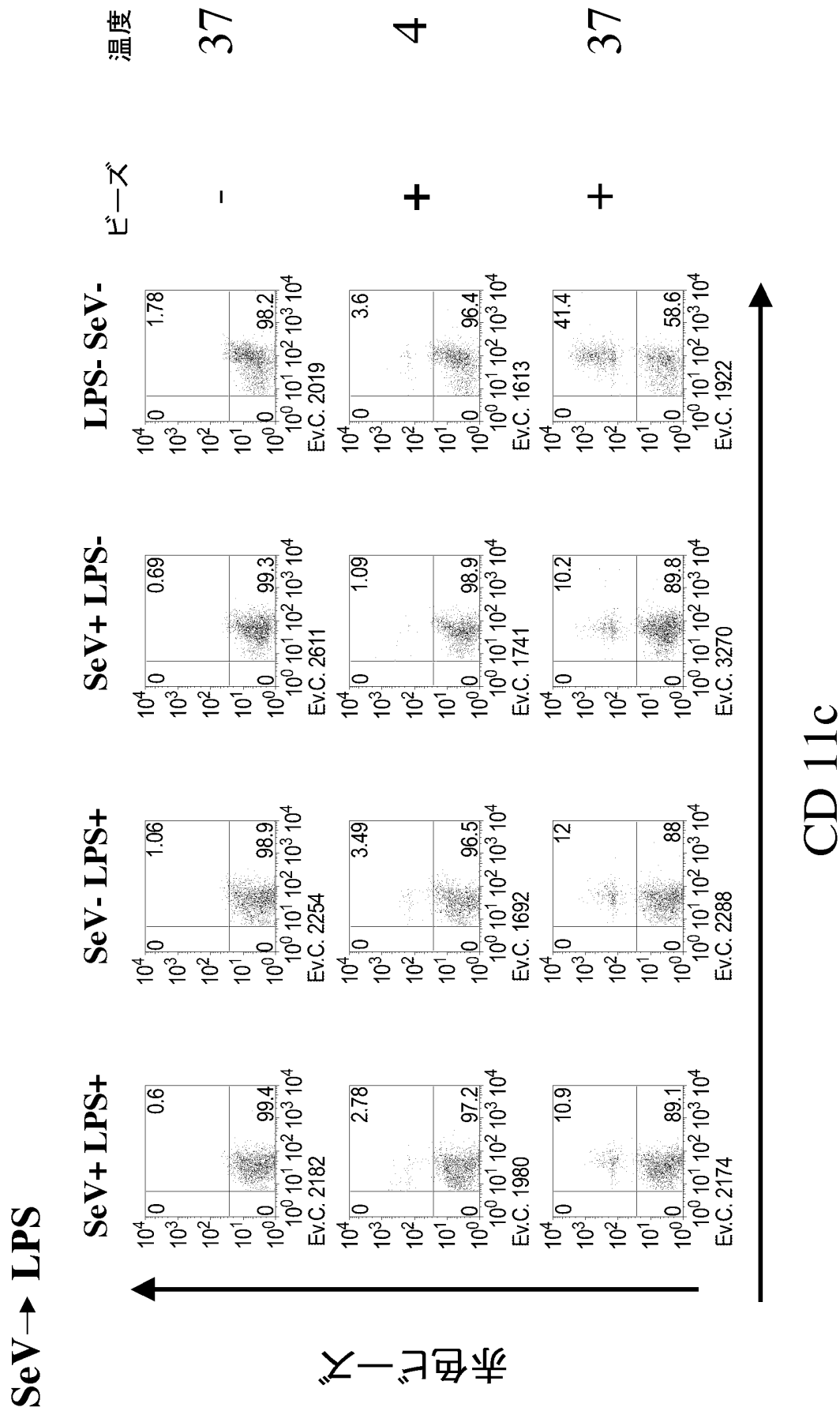
[図14]



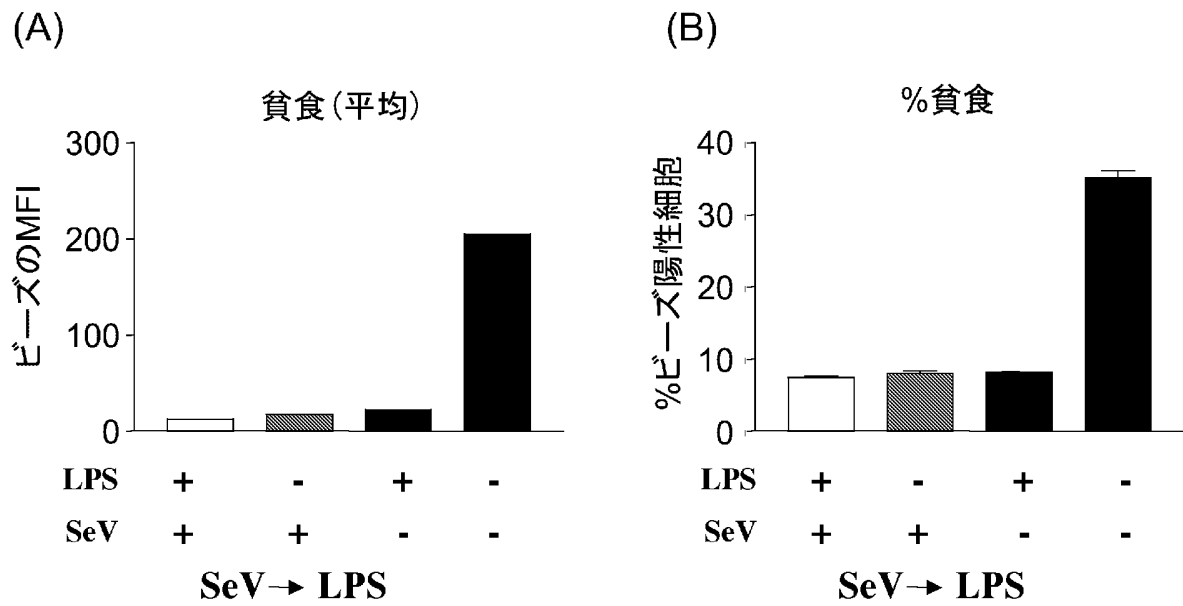
[図15]



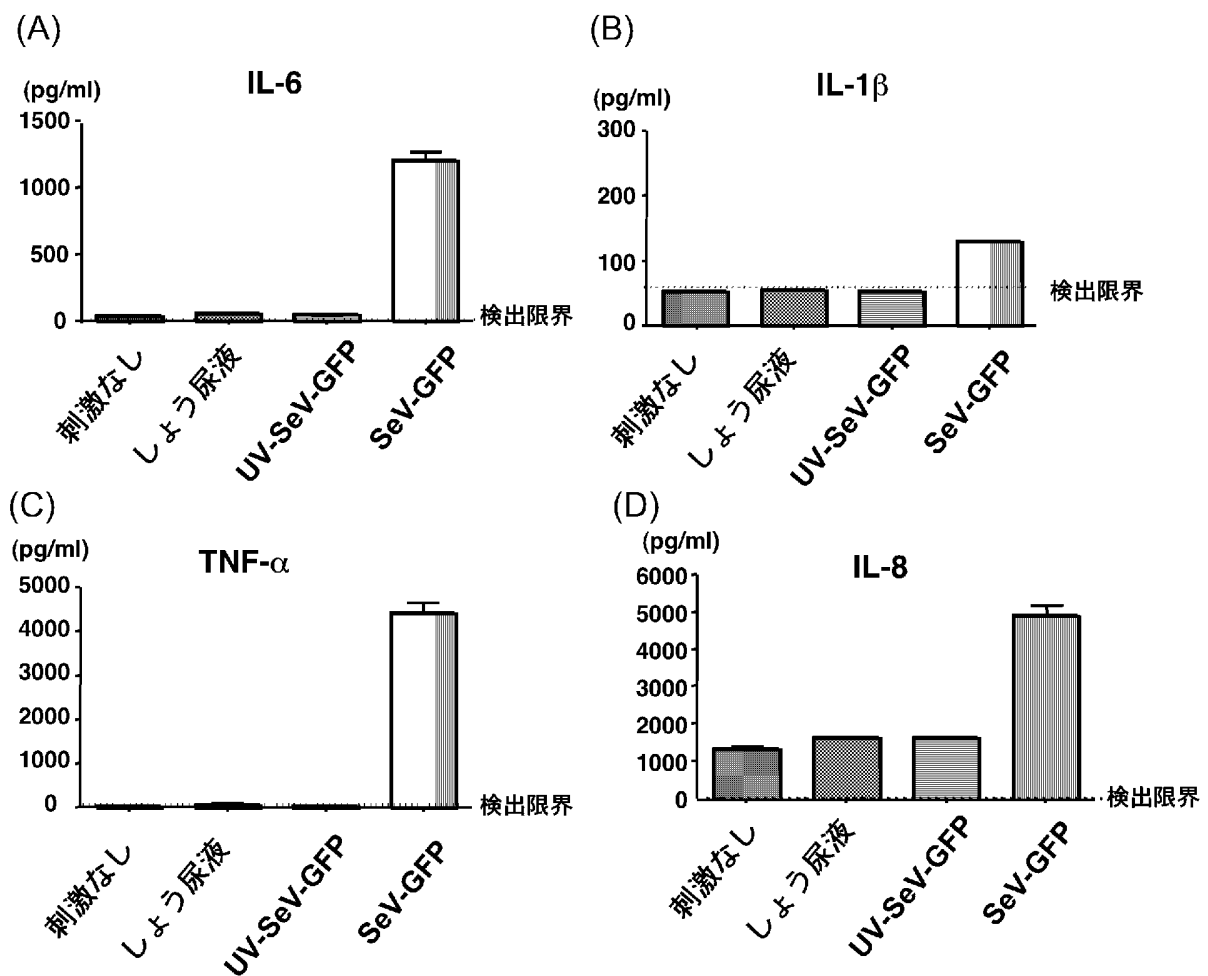
[図16]



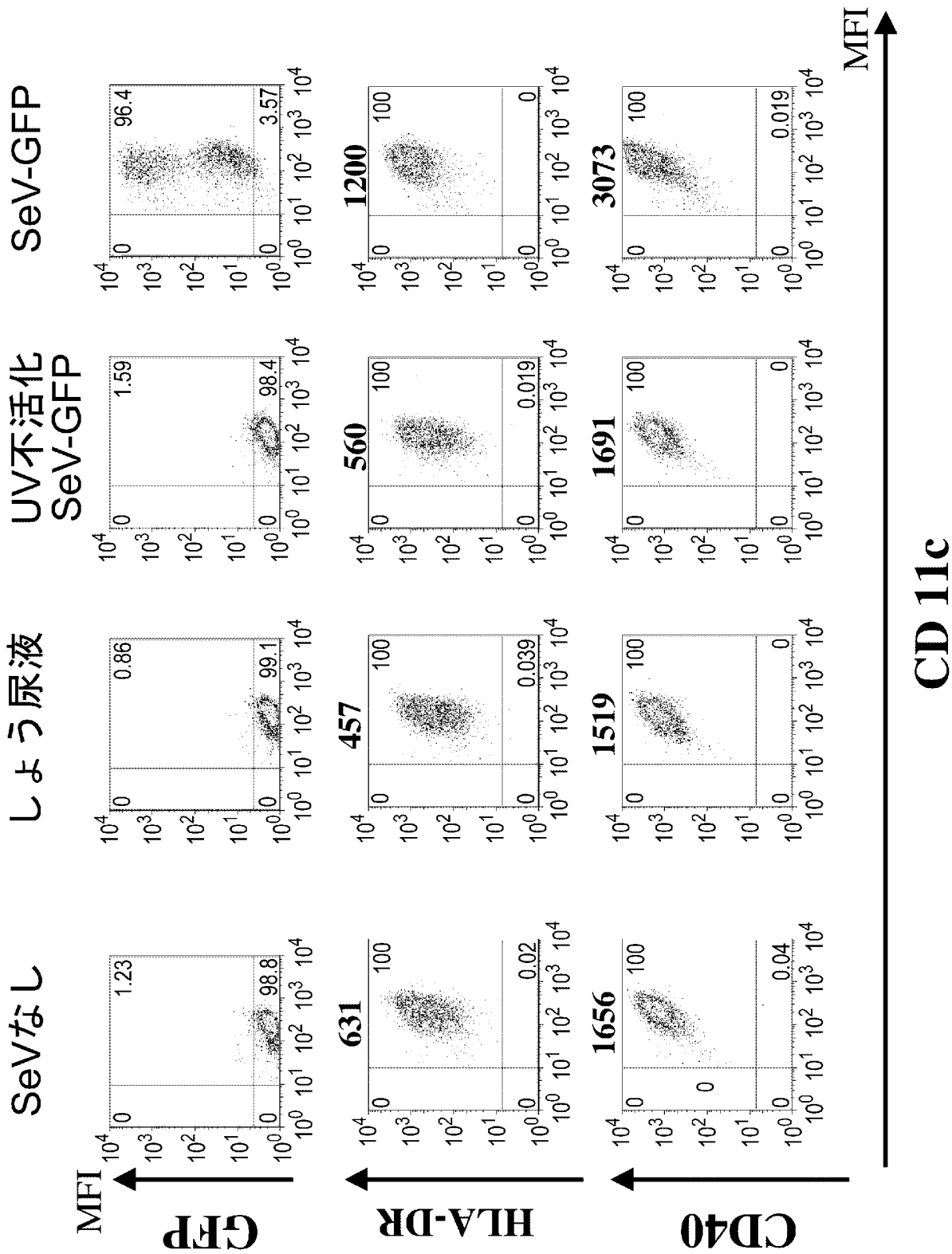
[図17]



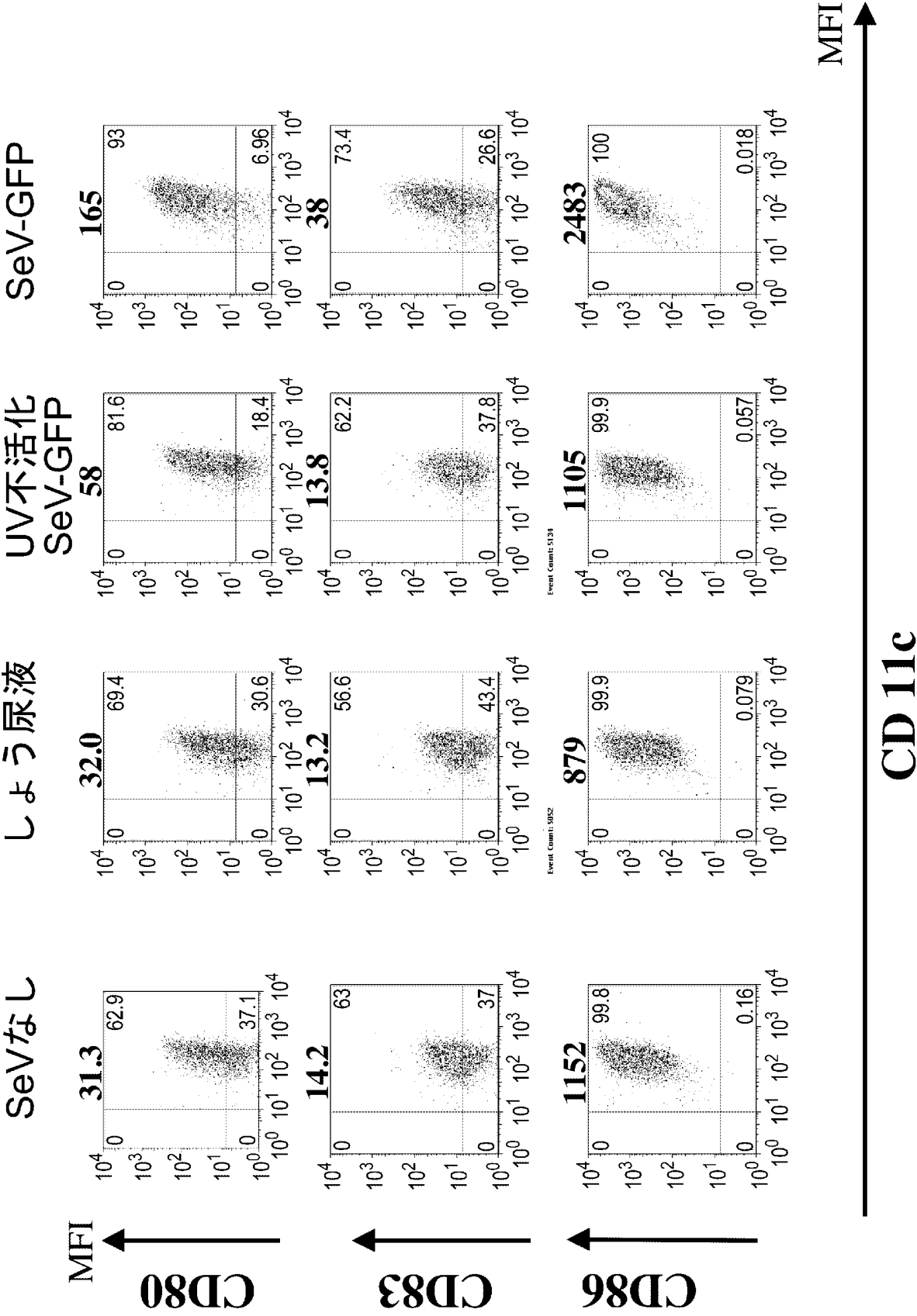
[図18]



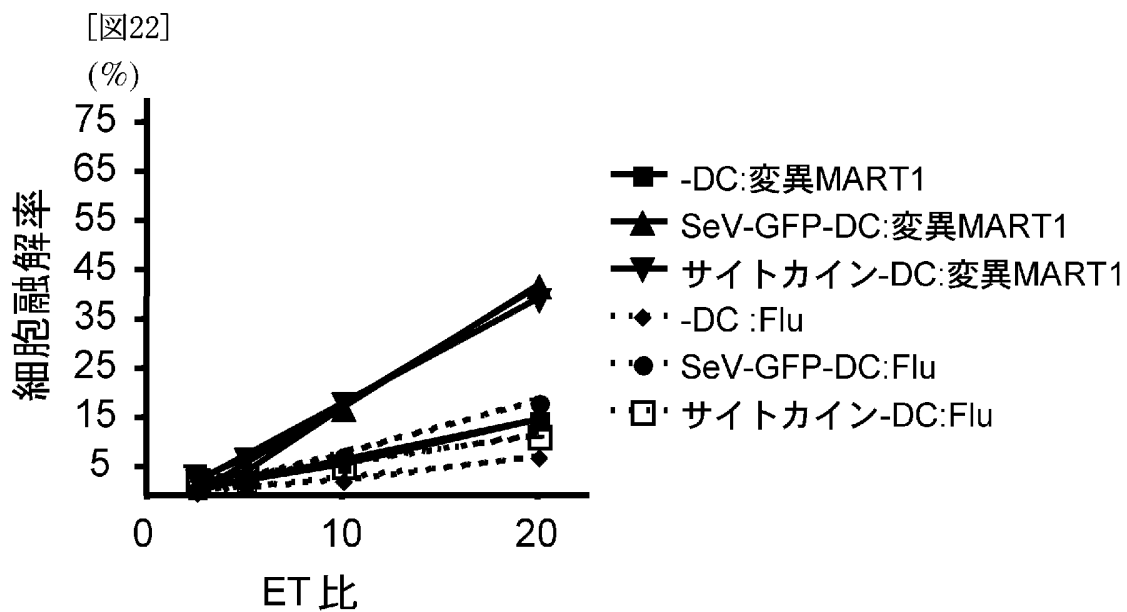
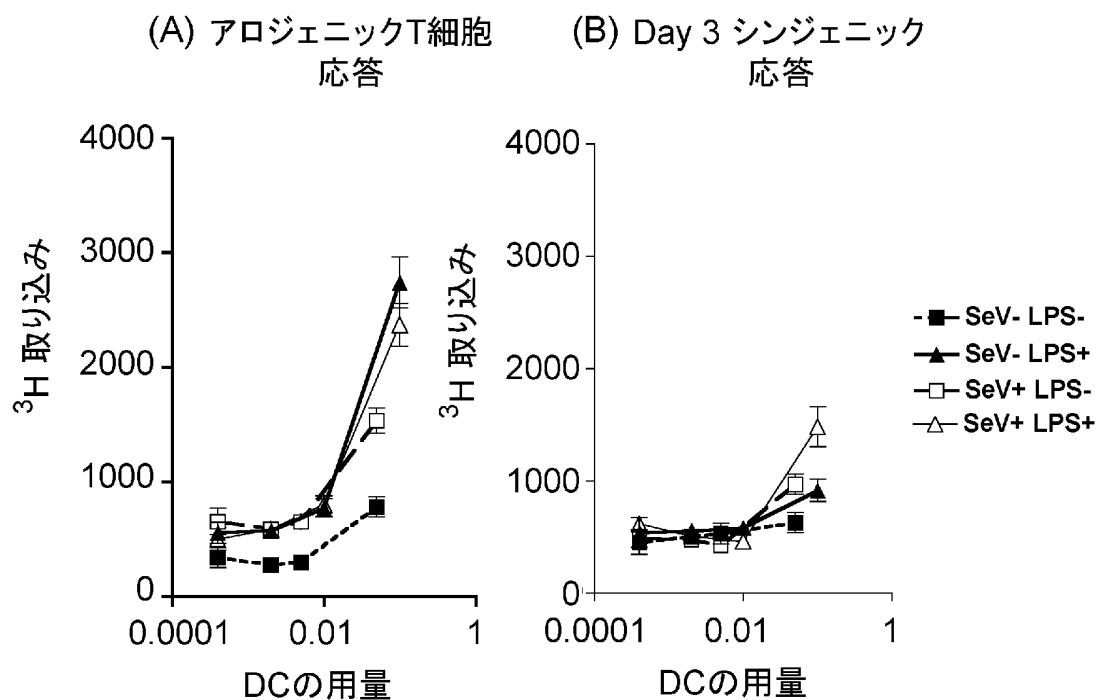
[図19]



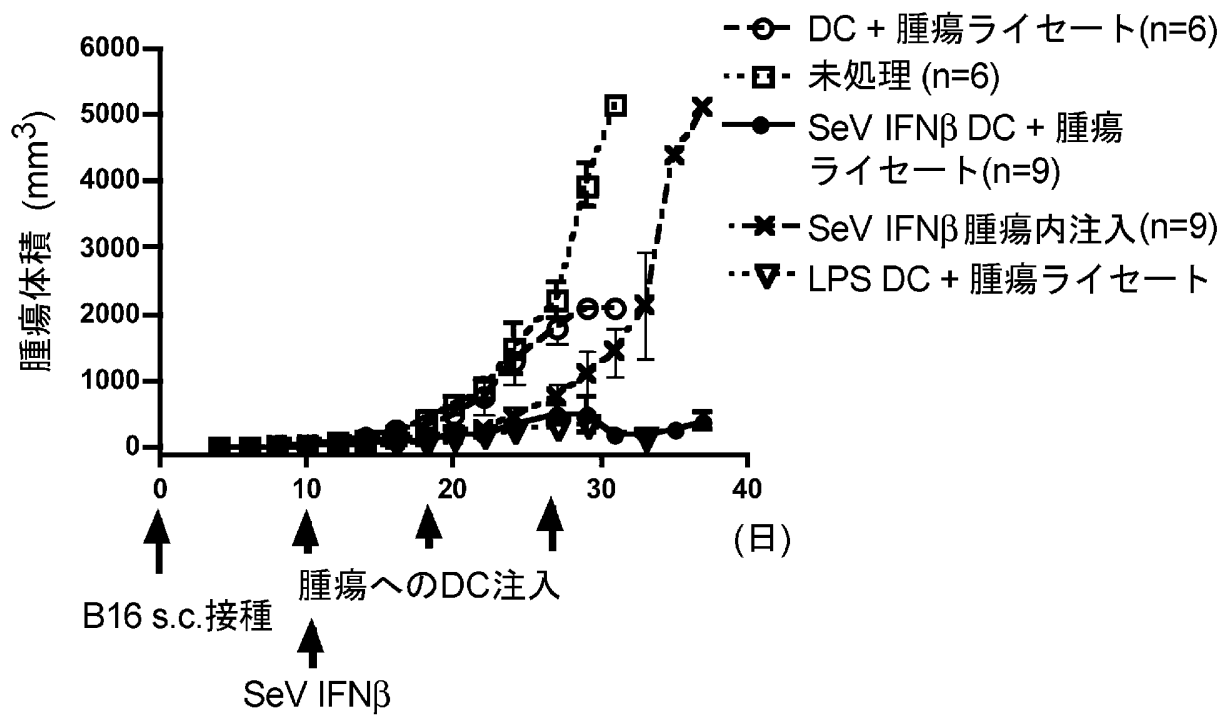
[図20]



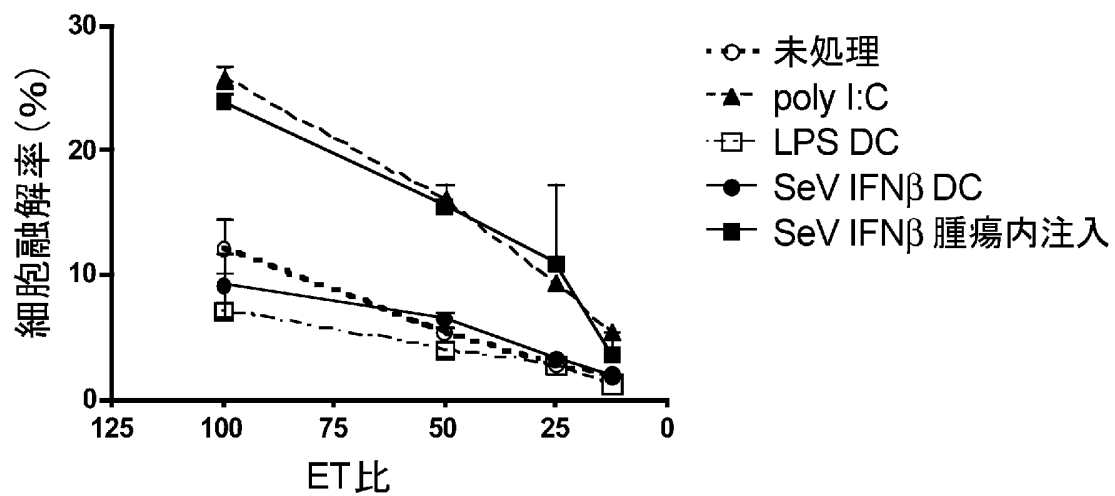
[図21]



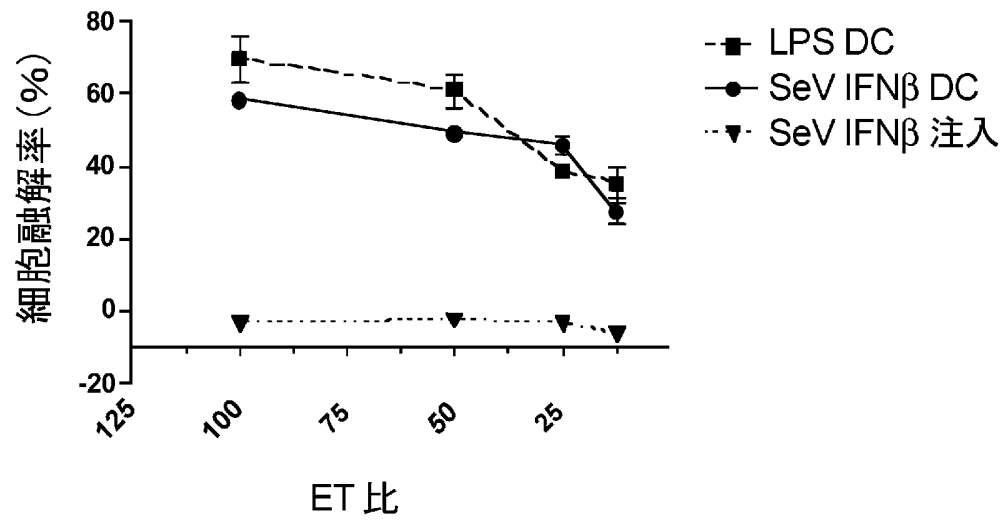
[図23]



[図24]



[図25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/16, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/16, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Jin CH., YONEMITSU Y., OKANO S., et al., Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood- derived hematopoietic stem cells., Gene Ther., (2003, February), Vol.10, No.3, pages 272 to 277	1-12
Y	Jonuleit H., et al., Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity., Gene Ther. (2000) Vol.7, No.3, pages 249 to 254	1-12
Y	SUMITOMO H., et al., Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells., J.Immunol.Methods., (2002), Vol.271, No.1-2, pages 153 to 165	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 January, 2005 (19.01.05)

Date of mailing of the international search report
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lundqvist A., et al., Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection., J.Immunother., (2002), Vol.25, No.6, pages 445 to 454	1-12
Y	OKANO S., et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated Tlymphocytes., Gene Ther., (2003 August), Vol.10, No.16, pages 1381 to 1391	1-12
A	SASAKI K., et al., Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved., Gene Ther., (online publication 14 October, 2004 (14.10.04)), [abstract]	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016089

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13, 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 13 and 14 are relevant to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/16, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/16, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Jin CH, Yonemitsu Y, Okano S, et. al., Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells., Gene Ther. (2003 Feb), Vol. 10, No. 3, p. 272-277	1-12
Y	Jonuleit H, et. al., Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity., Gene Ther. (2000), Vol. 7, No. 3, p. 249-254	1-12
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
19. 01. 2005	08.02.2005	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4N 9839
日本国特許庁 (ISA/J P)	高 美葉子	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3488
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sumimoto H, et. al., Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells., J Immunol Methods. (2002), Vol. 271, No. 1-2, p. 153-165	1 - 1 2
Y	Lundqvist A, et. al., Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection., J Immunother. (2002), Vol. 25, No. 6, p. 445-454	1 - 1 2
Y	Okano S, et. al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes., Gene Ther. (2003 Aug), Vol. 10, No. 16, p. 1381-1391	1 - 1 2
A	Sasaki K, et. al., Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved., Gene Ther. (online publication 14 October 2004) 【Abstract】	1 - 1 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13、14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲13、14に係る発明は、ヒトの身体の治療による処置方法に該当するものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。