

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年9月20日 (20.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/105744 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61P 25/14 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 25/32 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/055017

(22) 国際出願日:

2007年3月7日 (07.03.2007)

(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2006-062192 2006年3月8日 (08.03.2006) JP
特願2006-198398 2006年7月20日 (20.07.2006) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人金沢大学 (NATIONAL UNIVERSITY COR-
PORATION KANAZAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
9201164 石川県金沢市角間町又7番地 Ishikawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 平井宏和 (HIRAI,
Hirokazu) [JP/JP]; 〒9201164 石川県金沢市角間町又
7番地国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP). 寅嶋崇
(TORASHIMA, Takashi) [JP/JP]; 〒9201164 石川県金
沢市角間町又7番地国立大学法人金沢大学内 Ishikawa
(JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MT
ビル19階 Tokyo (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, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, 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), ヨーラシア (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,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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:
— 國際調査報告書

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
のガイド」を参照。

A1

(54) Title: PURKINJE CELL-TROPIC VIRAL VECTOR

(54) 発明の名称: プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター

(57) Abstract: Disclosed is a Purkinje cell-tropic viral vector having a mutated L7 promoter and a therapeutic gene both operably linked to a virus-derived plasmid vector.

(57) 要約: 本発明は、ウイルス由来プラスミドベクターに改変型L7プロモーターと治療用遺伝子を機能しうる態
様で連結してなるプルキンエ細胞指向性ウイルスベクターに関する。



WO 2007/105744 A1

明 紹 書

プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター

5 技 術 分 野

本発明は、改変型 L7 プロモーターを利用したプルキンエ細胞指向性ウイルスベクターに関する。

背 景 技 術

小脳は複数の筋肉が関与する歩行などの協調運動に重要な役割を果たしている。小脳に損傷があると、協調運動の調節がうまく行かず、なめらかな動きができなくなる。大脳皮質からの運動の指令は脳幹を通って、脊髄、筋肉に伝達されるが、同時に脳幹(橋)から苔状線維を介して小脳皮質にも伝達される。苔状線維を介して伝達された信号は、小脳皮質の神経細胞である顆粒細胞に入力される。そして、顆粒細胞はその軸索である平行線維を介してプルキンエ細胞に信号を伝える。

一つのプルキンエ細胞は平行線維との間に 10 万個以上のシナプスを形成し、そこからの入力情報を統合し、小脳の深部にある小脳核へ情報を出力する。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力神経細胞であり、小脳において非常に重要な役割を果たしているが、脆弱であり、小脳出血、外傷、小脳腫瘍や遺伝性神経変性疾患により障害を受けやすい。

近年のゲノム科学の発展によりヒトやマウスの全ゲノム配列が決定され、生命科学研究は同定された遺伝子の役割解明へと向かっている。神経細胞に野生型や変異遺伝子を導入し、その影響を調べる手法は、神経科学分野の研究面において非常に効果的であるが、遺伝子治療としての臨床応用面からも、神経細胞への遺伝子導入は注目を集めている。

しかしながら、神経細胞は非分裂細胞であり遺伝子導入が難しい。なかでも、プルキンエ細胞への遺伝子導入は極めて困難であり、2000 年以前まで効率的な遺伝子導入の成功例も報告されていなかった。最近ウイルスベクターの開発が進み、プルキンエ細胞への効率的な遺伝子導入が可能になってきたが、それでもわずか 4 編の論文が報告されているにすぎない(非特許文献 1 ~ 4)。

5 プルキンエ細胞に効率的に遺伝子導入するには、レンチウイルスやアデノ随伴ウイルスなどの神経に対して高親和性を持つウイルスベクターを使う必要がある。ちなみに、これまでの報告では、プルキンエ細胞への遺伝子導入には、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス由来レンチウイルスが用いられている。

ところで、野生型のレンチウイルスは CD4 受容体を持つリンパ球にしか感染しない。そのため、現在使われているレンチウイルスベクターは神経細胞にも感染するように、そのエンベロープが *Vesicular somatitis virus glycoprotein (VSV-G)* に置換されている。この VSV-G は細胞膜の構成成分であるリン脂質(フ10 オスファチジルセリン)に結合能を持つため、神経以外のグリア細胞、血管内皮細胞などにも非特異的に感染する。また小脳においては、レンチウイルスはプルキンエ細胞以外にも、星状細胞(Stellate cell)、籠細胞(Basket cell)、ゴルジ細胞(Golgi cell)、バーグマングリア(Bergmann glia)にも感染する。

15 上述のとおり、アデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクターは神經細胞に外来遺伝子を導入し発現させる能力を持つが、パッケージング能力の問題から発現可能な遺伝子サイズに制限がある。発現可能遺伝子サイズはアデノ随伴ウイルスベクターとレンチウイルスベクターにおいて、プロモーター領域と合わせてそれぞれ 4kb と 8kb といわれている。しかしこれは理論的な値であり、レンチウイルスベクタープラスミドでは安全性を増すためさまざまな改良がなされていることから、使用するベクタープラスミドによって異なるが、発現は 5kb 前後が限界であることが多い。

一方、L7 プロモーターはプルキンエ細胞特異的に活性を持ち、プルキンエ細胞だけに外来遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作出に利用されている。しかしながら、L7 プロモーターは全長約 3kb と大きく、アデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクターに組み込んで用いる場合、発現可能な外来遺伝子のサイズは大きな制限を受ける。また、そのプロモーター活性は CMV や MSCV プロモーター等の非特異的プロモーターに比べて著しく低い。

30 小脳プルキンエ細胞への効率的かつ特異的な遺伝子導入は、トランスジェニックマウスを作出するしか方法がなかった。しかしウイルスベクターを用いて、プルキンエ細胞に特異的に高効率で遺伝子導入することができれば、これまで

できなかったさまざまな研究が可能となり、小脳を対象とする研究の進展に大きく寄与すると考えられる。また、プルキンエ細胞が障害される脊髄小脳変性症などの遺伝子治療への応用も期待される。

また、最近、ウイルスベクターを遺伝子治療としてヒトに用いる場合、牛海綿状脳症をはじめとする感染が近年、大きな問題となっている。これは、現在のプロトコールではウイルス産生時の培地にウシの血清を加えることが必要であるためである。このようなことから、特に血清を用いることなく、プルキンエ細胞に高効率で遺伝子導入できるウイルスベクターを産生できれば、その臨床応用はより広がることが期待される。

10

[非特許文献 1] Agudo M., Trejo J. L., Lim F., Avila J., Torres-Aleman I., Diaz-Nido J. & Wandosell F. (2002) Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells *in vivo* using a herpes simplex virus I amplicon. *Hum. Gene Ther.*, 13, 665-674.

15

[非特許文献 2] Alisky J. M., Hughes S. M., Sauter S. L., Jolly D., Dubensky T. W. Jr., Staber P. D., Chiorini J. A. & Davidson B. L. (2000) Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport*, 11, 2669-2673.

20

[非特許文献 3] Kaemmerer W. F., Reddy R. G., Warlick C. A., Hartung S. D., McIvor R. S. & Low W. C. (2000) In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther.*, 2, 446-457.

[非特許文献 4] Xia H., Mao Q., Eliason S. L., Harper S. Q., Martins I. H., Orr H. T., Paulson H. L., Yang L., Kotin R. M. & Davidson B. L. (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.*, 10, 816-820.

発明の開示

本発明は、小脳プルキンエ細胞に高い親和性を持ち、プルキンエ細胞選択的に感染して遺伝子発現するウイルスベクターを提供することにある。

30

発明者らは、これまで小脳への遺伝子導入について報告がなかつたヒト免疫

不全ウイルス由来レンチウイルスベクターを用いて小脳への遺伝子導入実験を行い、ウイルスのプルキンエ細胞選択性は、ウイルス產生時の培養液 pH がわずかに酸性側にシフトするだけで急激に低下すること、培養液に添加する血清の L o t によりウイルスのプルキンエ細胞への選択性が異なり、それゆえ血清 5 中の何らかの成分がプルキンエ細胞選択性維持に関与していることを発見した。

さらに、上記の知見に基づき、発明者らは以下のような仮説を立て、その実証を試みた。

(1) 培養液の pH に依存して変化することから、pH 感受性酵素、おそらく宿主細胞から放出されたプロテアーゼがウイルスの蛋白質（特に、ウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質）を分解することで、ウイルスのプルキンエ細胞 10 への選択性が低下する。

(2) 血清にはプロテアーゼの活性を阻害する物質が含まれており、そのためにウイルスエンベロープの糖蛋白質の分解が抑えられ、プルキンエ細胞への選択性が保たれる。

15 実際、センダイウイルスやインフルエンザウイルスではプロテアーゼによりエンベロープの糖蛋白質が分解され、細胞への感染性が変化することが知られている。そして、発明者らの実験結果は上記の仮説を支持するものであった。ウイルス產生時の培養液にプロテアーゼ阻害剤を加えることで、プルキンエ細胞に親和性の高いベクターを得ることができた。しかしながら、プルキンエ細胞以外の細胞にも全体の 1~2 割程度は感染し、遺伝子発現を誘導する。そこで、完全にプルキンエ細胞だけで遺伝子発現が誘導されるように、ウイルスベクターに組み込まれているプロモーターを非選択的な CMV あるいは MSCV プロモーターから L7 プロモーターへの変更を検討した。その際、従来の L7 プロモーターは 3kb の長さがあるため、これより短い種々の長さのものを調整し、ウイルス 20 プラスミドに組み込んだ。これらのウイルスプラスミドを用いて、ウイルスベクターを得、生体マウス小脳に接種して検討した。その結果、配列番号 3 又は 4 で示される塩基配列を有する改変型 L7 プロモーターを組み込んだウイルスベクターでは、プルキンエ細胞だけに遺伝子発現が見られ、かつその発現程度も従来の L7 プロモーターよりはるかに高いことがわかった。

25 すなわち、本発明は、ウイルス由来ベクタープラスミドに配列番号 3 又は 4

で示される塩基配列を有する改変型 L7 プロモーターを、外来遺伝子に機能しうる態様で連結して成る小脳プルキンエ細胞指向性ベクターに関する。

用いられるウイルス由来ベクタープラスミドとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルス、
5 及びレンチウイルス由来のベクタープラスミドが挙げられ、プロテアーゼ阻害剤の効果に関してはエンベロープの糖蛋白質が VSV-G であることが望ましい。

前記ベクターによって產生されるウイルスの蛋白質、特にウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質は、実質的に分解修飾を受けていない状態にあることが望ましい。

10 前記ウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質が実質的に分解修飾を受けている状態にあるベクターは、プロテアーゼ阻害剤を含む培養液中で宿主細胞にウイルスを產生させることにより得ることができる。前記プロテアーゼ阻害剤としては、カテプシンK阻害活性を有するもの（カテプシンK阻害剤やカテプシン阻害剤）が好ましい。

15 ウィルス產生時の培養液の pH は、7.2～8.0 に維持されることが望ましい。

また、感染防止等の安全性の点から、前記培養液は血清を含まないことが望ましい。

本発明はまた、レンチウイルスベクタープラスミドに外来遺伝子を機能しうる態様で連結して成る小脳プルキンエ細胞指向性ベクターであって、前記ベクターによって產生されるウイルスの蛋白質、特にウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質が、実質的に分解修飾を受けていない状態にあることを特徴とするベクターも提供する。ウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質が実質的に分解修飾を受けていない状態にあるベクターは、上記した方法によって得
25 ることができる。

ウイルスベクターに導入される外来遺伝子としては、プルキンエ細胞障害性疾患の治療用遺伝子や当該疾患遺伝子が挙げられる。このような遺伝子を導入することで、本発明のベクターはプルキンエ細胞障害性疾患の遺伝子治療やモデル動物の作製に用いることができる。

30 前記治療用遺伝子の具体例としては、たとえば、GTPase CRAG、ubiquitin chain

assembly factor E4B (UFD2a)、ATPase VCP/p97、HDJ-2、HSDJ 及び BiP を含む分子シャペロン、YAPdeltaC を含む細胞死抑制分子、ER degradation enhancing alpha-mannosidase-like protein (EDEM) を含む小胞体蛋白質分解促進分子、CREB/ATF family member OASIS、IRE1、PERK 及び ATF6 を含む ER センサー分子 (Endoplasmic reticulum stress transducer)、スフィンゴミエリナーゼ、AT-mutated(atm)、Reelin、Bcl-2、ネプリライシン、BDNF、ならびに NGF をコードする遺伝子、あるいは ataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、 α 1a 電位依存型カルシウムチャネル、PKC γ をコードする遺伝子の siRNA を挙げることができる。

また、前記疾患遺伝子の具体例としては、たとえば、異常伸長した CAG リピートを持つ ataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、huntingtin、もしくは α 1a 電位依存型カルシウムチャネルをコードする遺伝子、又は変異を持つ PKC γ をコードする遺伝子を挙げることができる。

本発明は、上記した小脳プルキンエ細胞指向性ベクターを含む、小脳プルキンエ細胞障害性疾患の治療用医薬組成物も提供する。

前記小脳プルキンエ細胞障害性疾患としては、たとえば、脊髄小脳変性症やハンチントン病を含むポリグルタミン病、ニーマンピック病、毛細血管拡張性運動失調症、自閉症、アルツハイマー病、胎児アルコール症候群(FAS)、アルコール中毒、加齢性小脳失調を挙げることができる。

本発明はまた、本発明のベクターを導入された非ヒト哺乳動物を提供する。特に、プルキンエ細胞を障害する遺伝子（異常伸長した CAG リピートを持つ ataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、huntingtin、もしくは α 1a 電位依存型カルシウムチャネルをコードする遺伝子、又は変異を持つ PKC γ をコードする遺伝子）を導入され、当該遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現する非ヒト哺乳動物は、前記した小脳プルキンエ細胞障害性疾患のモデル動物として用いることができる。

本発明はまた、レンチウイルスプラスミドベクターに外来遺伝子を機能しうる態様で連結して宿主細胞に導入し、前記細胞をプロテアーゼ阻害剤を含む培養液中で培養してウイルスを産生させることを特徴とする、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクターの作製方法を提供する。あるいは、ウイルス由来ベクタープラスミドに配列番号 3 又は 4 で示される塩基配列を有する改変型 L7 プロ

モーターを、外来遺伝子に機能しうる態様で連結し、前記細胞をプロテアーゼ阻害剤を含む培養液中で培養してウイルスを産生させることを特徴とする、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクターの作製方法を提供する。

さらに本発明は、カテプシンK阻害活性を有する物質を含んで成る、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用培養液や、そのような培養液（カテプシンK阻害活性を有する物質と細胞培養液、またはカテプシンK阻害活性を有する物質を含む細胞培養液）を構成要素として含む、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用キットも提供する。

本発明で用いられる改変型L7プロモーターは、従来のL7プロモーターのおよそ3分の1のサイズであるため、ベクターに組込みうる外来遺伝子のサイズは大幅に拡大する。しかも、同じコピー数が染色体に組み込まれた場合、従来のL7プロモーターよりもはるかに高いプロモーター活性を持ち、強力に下流に配置された外来遺伝子の発現を誘導する。

よって、本発明によれば、小脳で最も重要なプルキンエ細胞に選択的に、かつ高効率で遺伝子発現が可能となる。これにより、基礎研究においては、小脳が司る運動学習、協調運動のメカニズムを分子レベルで解明するための研究が大きく進展することが期待される。また、遺伝子治療をはじめとする臨床応用においては、プルキンエ細胞選択的な遺伝子導入が可能となり、他の神経細胞やグリア細胞への遺伝子導入および発現に伴う副作用の軽減が期待される。さらに、本発明では、ウシ血清を使用することなくベクターを調製しうるため、牛海綿状脳症などの感染の問題もなく、血清のLotに依存することなく、安定してプルキンエ細胞指向性ベクターを得ることができる。

図面の簡単な説明

図1は、pCL20c MSCV-GFPの構造を示す。

図2は、(A) 実施例1の実験手順、(B) トランスフェクション後40時間でウイルスを回収する直前のHEK293FT細胞におけるGFPの発現、及び(C) トランスフェクション後64時間でウイルスを回収する直前のHEK293FT細胞におけるGFPの発現を示す蛍光顕微鏡画像である。

図3は、(左) トランスフェクション後40時間で回収したウイルス、(中) ト

ランスフェクション後 64 時間で回収したウイルス、(右) トランスフェクション後 40 時間のウイルスを含む培養液に希塩酸を加えて pH を 7.0 に調節した後に回収したウイルス、を接種して 1 週間後的小脳皮質の全 GFP 発現細胞における各細胞の割合 (%) を示したグラフである。図中、(A) プルキンエ細胞 (Purkinje cells)、(B) バーグマングリア (Bergman glias)、(C) 星状細胞/籠細胞 (Stellate & Basket cells)、(D) 判別不能 (Unknown cells) を示す。

図 4 は、トランスフェクション後 40 時間のウイルスを含む培養液に希塩酸を加え、pH を 7.0 に調節した後に回収したウイルスを接種後一週間の、小脳皮質分子層における GFP の発現を示す共焦点レーザー顕微鏡画像である。図中(A) バーグマングリア (矢印) に選択的な GFP の発現を認める。プルキンエ細胞は GFP の発現がなく、黒く抜けて見える (矢頭)。(B) (A) の拡大像。(C) グリア細胞マーカーである GFAP に対する抗体を用いた 2 重染色像。GFP の発現は GFAP の分布 (赤) と重なる。(A) のスケールバー 100 μm、(B) のスケールバー 50 μm

図 5 は、Lot の異なる 8 種のウシ血清を用いて產生、回収したウイルスを小脳に接種し、一週間後の脳の蛍光実体顕微鏡写真、及びその矢状断における GFP の発現の様子を示す共焦点レーザー顕微鏡画像である。

図 6 は、20 倍の対物レンズを用いた観察視野における、GFP を発現している全細胞中のプルキンエ細胞の割合 (%) を示すグラフである。

図 7 は、20 倍の対物レンズを用いた観察視野における、全プルキンエ細胞中の GFP 発現プルキンエ細胞の割合 (%) を示すグラフである。

図 8 は、GFP と融合した脊髄小脳変性症 3 型遺伝子 ataxin-3 [Q69] を発現するウイルスのプロウイルス部分の構造を示した模式図 (A)、このウイルスを小脳に接種後、2 ヶ月して施行したロータロッドテストの結果 (B)、このマウスのプルキンエ細胞内の GFP 融合 ataxin-3 [Q69] 凝集塊 (C)、を示す。

図 9 は、プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター制御下で、脊髄小脳変性症 3 型遺伝子 ataxin-3 [Q69] を発現するマウス作出に用いたコンストラクトの模式図 (A)、作出了 3 ライン (a, b, c line) の脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスにおける、生後 3 週から 14 週にかけてのロータロッドテストの成績 (B)、生後 80 日の野生型マウスの脳矢状断 (C)、同週齢の脊髄小脳変性症 3 型モデルマウス b line の脳矢状断 (D)、を示す。

図10は、Flagタグを付加したCRAG、あるいはVCP(C522T)（VCP/p97の522番目のシステインをスレオニンに置換したもの）を発現するウイルスベクターのプロウイルス部分の構造を示した模式図(A)、このウイルスベクターの脊髄小脳変性症3型モデルマウスの小脳への接種を示す模式図(B)、c lineのモデルマウスの小脳にCRAG発現ウイルスを接種した後8週間までのロータロッドの成績(C)、b lineのモデルマウスの小脳にGFP、CRAG、あるいはVCP(C522T)発現ウイルスを接種後4週間と8週間で行ったロータロッドの成績(D)（C、Dともロッドは止まった状態からスタートし、180秒後に40回転／分の速度となる）、b lineのモデルマウスの小脳にGFP、CRAG、あるいはVCP(C522T)発現ウイルスを接種後8週間で行った定速（5回転／分）ロータロッドの成績(E)、を示す。

図11は、何も接種していない(A,B)、CRAG(C,D)、あるいはVCP(C522T)(E,F)発現ウイルスを接種後、8週間で灌流固定して作製した小脳切片を、抗HAタグ抗体を用いて免疫組織染色したもの(A,C,E)、それらを抗カルビンディン抗体による二重免疫組織染色の像と重ね合わせたもの(B,D,E)、それぞれの切片の小脳皮質における封入体の数(G)、それぞれの切片における分子層の厚さ(H)、を示す。

図12は、L7プロモーター-L(7-1)及びその各種改変型(L7-2～L7-7)の構造を示す模式図を示す。

図13は、L7-4プロモーターをレンチウイルスベクタープラスミド(pCL20c)に挿入し、その下流に緑色蛍光タンパク質GFPを配置したプラスミドpCL20c L7-4-GFPの模式図を示す。

図14は、種々のプロモーターを用いたときのプルキンエ細胞へのGFPの発現割合を示す。(a)全GFP発現細胞中のプルキンエ細胞の割合：GFP発現プルキンエ細胞数/GFP発現細胞数 (b)全プルキンエ細胞中のGFP発現プルキンエ細胞の割合：GFP発現プルキンエ細胞数/全プルキンエ細胞数

図15は、(a)種々のプロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用いて培養小脳プルキンエ細胞にGFPを発現させたときの蛍光強度の比較、(b)CMVプロモーター制御下でGFPを発現するレンチウイルスベクターをさまざまなMOIでHEK293T細胞に感染させたときのGFP蛍光強度を示す。

図16は、種々のプロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用い

て、培養小脳プルキンエ細胞に GFP 遺伝子を発現させたときの蛍光免疫染色写真を示す。

図 17 は、生体小脳への遺伝子導入の結果を示す。(a-d)は、レンチウイルスベクターを用いて、従来の L7 プロモーター(L7-1)制御下で GFP を発現させたときの GFP の蛍光写真、(c), (d)は抗 GFP 抗体を用いて免疫染色した写真（これにより蛍光は増強する）、(e-h)は L7-4 プロモーターを用いた場合の小脳プルキンエ細胞の GFP 蛍光写真を示す。

なお、上記図面のグラフ中、* p<0.05、** p<0.01、***p<0.001 (ANOVA with least significance test)

10

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2006-062192 号及び特願 2006-198398 号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

15 1. プルキンエ細胞指向性ベクター

本発明にかかる「プルキンエ細胞指向性ベクター」（以下、「本発明のベクター」という）とは、小脳プルキンエ細胞に高い親和性を有し、プルキンエ細胞特異的に遺伝子導入を行うことができるベクターであって、小脳に存在するバーグマングリア、星状細胞、籠細胞等の他の神経細胞やグリア細胞よりも、プルキンエ細胞に対して高い選択性を有するベクターである。

本発明のベクターは、ウイルス由来プラスミドベクターに改変型 L7 プロモーターと外来遺伝子を機能しうる態様で連結して成る。あるいは、レンチウイルスプラスミドベクターに適当なプロモーターと外来遺伝子を機能しうる態様で連結して成る。

25 ここで、ウイルス由来プラスミドベクターとは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルス、及びレンチウイルス由来のプラスミドベクターを含み、特にプルキンエ細胞に対する選択性が高いアデノ随伴ウイルスとレンチウイルス由来のプラスミドベクターが好ましく、レンチウイルスベクターが最も好ましい。

30 「レンチウイルス」とは、逆転写酵素を有する RNA ウィルスの 1 つであつ

て、非分裂細胞にもサイトカイン刺激なしに高効率で感染し、宿主染色体にウイルスゲノムを組み込むことができる。そのため、レンチウイルス由来のベクターは、哺乳動物への遺伝子導入用ベクターとして汎用されている。レンチウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、
5 サル免疫不全ウイルス (SIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ヒツジ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、マエディウイルス等が知られているが、ベクターとしては、一般にヒト免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルスに由来するものが使用されている。

レンチウイルスのウイルス粒子は、2本のプラス鎖RNAとこれを囲むコア蛋白質 (gag蛋白質)、コアを囲むマトリックス、さらにその外側を囲む脂質二重膜で構成される。コアの中には、逆転写酵素、RNase H、インテグライゼ、プロテアーゼが含まれ、脂質二重膜には糖蛋白質であるエンベロープ蛋白質がスパイクしている。

ウイルスの感染、宿主中での増殖には、上記した蛋白質が複雑に関与する。
15 特に、ウイルスエンベロープ上の糖蛋白質はウイルスの感染性に非常に重要であり、インフルエンザウイルスでは、この糖蛋白質が酵素により切断されることで感染性が変化することが知られている。HIVはCD4陽性細胞にしか感染できないが、HIV由来レンチウイルスベクターではさまざまな種類の細胞への感染を可能にするため、Vesicular somatitis virus glycoprotein (VSV-G)
20 VSV-Gに置換されている。したがって、HIV由来レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞選択性についても、このVSV-Gが深く関与していることが予測される。

レンチウイルスプラスミドベクターは、通常2～4つのコンポーネント [パッケージング (パッケージングプラスミド、REVプラスミド)、エンベロープ、ベクター]から構成される。このうちパッケージングプラスミドは、エンベロープ以外のウイルス粒子形成に必要な蛋白質を供給するが、宿主内で複製できないよう、複製に必要なtat-rev領域を破壊したり、tatあるいはrevの一方を削除して他方を別なプラスミドに移している。エンベローププラスミドはエンベロープ形成に必要な蛋白質を供給するが、上述のごとくHIVのエンベロープではCD4陽性細胞にしか感染できないため、その蛋白質をVSV-Gに置換されて

いる。ベクタープラスミドは、LTR、パッケージングシグナル、逆転写に必要なプライマー結合部位を含む。汎用されているベクタープラスミドでは、安全性を高めるために、LTRのエンハンサー/プロモーター部分を削除し、代わりにCMVプロモーター等の外来のプロモーターを組み込んでいる。

5 特に好ましい態様として、本発明ではプルキンエ細胞での外来遺伝子の適切かつ効率的な発現のために、前記外来プロモーターとして、改変型L7プロモーター使用する。この改変型L7プロモーターについては次項で詳述する。

本発明のベクターでは、レトロウイルスプラスミドベクターにプロモーター、特に改変型L7プロモーターと外来遺伝子が機能しうる態様で連結されている。

10 ここで「機能しうる態様」とは、前記外来遺伝子が感染宿主に導入され、そこで適切に発現されることを意味する。

前記「外来遺伝子」は、レトロウイルスが本来有していない遺伝子であって、研究のためのレポーター遺伝子（GFP遺伝子など）のほか、遺伝子治療のための治療用遺伝子や疾患モデルマウス作出のための疾患遺伝子が用いられる。これら「治療用遺伝子」及び「疾患遺伝子」については、後で詳述する。

本発明のベクターによって產生されるウイルスは、その蛋白質が実質的に分解修飾されていない状態にあることが望ましい。特に、ウイルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質VSV-Gが実質的に分解修飾されていない状態にあることが望ましい。これは、上述したように、ウイルスの蛋白質は感染や宿主での増殖において重要なはたらきをしているからであり、実際、発明者らはウイルス產生のための培養液にプロテアーゼを添加しておくことで、そのプルキンエ細胞選択性が大きく向上することを実証した。したがって、「実質的に」分解修飾されていない状態とは、ウイルスの產生から使用時まで、ウイルス蛋白質が100%分解修飾されないことを厳密に要求したものではなく、その目的（プルキンエ細胞指向性）が達成される範囲において、影響を与えない程度の微細な不可避的に生じる分解修飾を許容する意味である。

2. 改変型L7プロモーター

本発明で用いられる改変型L7プロモーターは、従来の3kbの長さを持つ小脳
30 プルキンエ細胞特異的L7プロモーター（配列番号1）を基に、約3分の1の長

さ(1kb)で細胞特異性を保持したまま、より強い活性を持つプロモーター領域として同定されたものである。

具体的には、本発明の改変型L7プロモーターは、配列番号3(L7-3)又は配列番号4(L7-4)に示される塩基配列を有する。しかしながら、これらの配列に限定されず、配列番号3又は4で示される塩基配列と相補的な配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズしうるDNAもまた、それが前記改変型L7プロモーターと同等の塩基長(900bp～1500bp程度)を有し、かつ同等のプルキンエ細胞特異的プロモーター活性を有する限り、本発明の改変型L7プロモーターに包含される。少なくとも配列番号4に示されるL7-4プロモーター配列を含む限り、L7プロモーター配列(配列番号1)上の連続した1006bp～1500bpの任意の断片、とくに配列番号4に示されるL7-4プロモーター配列を含むL7-3プロモーター配列(配列番号3)上の連続した1006～1319bpの任意の断片は、本発明の改変型L7プロモーターとして利用可能なことは理解できるであろう。

なお、本明細書において、前記「ストリンジエントな条件」とは、6xSSC(1xSSCの組成:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)と0.5% SDSと5xデンハルトと100μg/ml 変性断片化サケ精子DNAと50%ホルムアミドを含む溶液中、配列番号1に示される塩基配列からなる核酸とともに55°Cで一晩保温し、低イオン強度、例えば、2xSSC、よりストリンジエントには、0.1xSSC等の条件及び／又はより高温、37°C以上、ストリンジエントには、42°C以上、よりストリンジエントには、50°C以上、より一層ストリンジエントには、60°C以上等の条件下での洗浄を行なう条件により達成されうる。

3. プルキンエ細胞指向性ベクターの調製

本発明のベクターは、たとえば、ウイルスベクタープラスミドに治療用遺伝子を機能しうる態様で連結させ、適当な宿主細胞にトランスフェクションし、これをプロテアーゼ阻害剤を含む培養液中で培養して、ウイルスを産生させることにより作製される。

前記「宿主細胞」としては、通常HEK293FT細胞、HEK293T細胞等が用いられる。ベクタープラスミドのトランスフェクションは、カルシウムイオンを用い

る方法[Cohen, S. N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69 : 2110-2114 (1972)]や、エレクトロポレーション法等、公知の方法を用いて、前項に記載したベクターシステムを構成するすべてのプラスミド（パッケージング、エンベロープ、ベクター）を宿主細胞に導入することにより達成される。

5 ウィルスを培養するための培養液はとしては、MEM、 α -MEM、D-MEM、BME、
RPMI-1640、D-MEM/F-12、Ham' s F-10、Ham' s F-12 等、公知の培養液を培養
する細胞に合わせて適宜選択して用いることができる。

前記培養液に加えるプロテアーゼ阻害剤は特に限定されないが、カテプシン
K阻害活性を有するものを好適に用いることができる。そのような物質として
10 は、市販のカテプシンK阻害剤：たとえば、Cathepsin K inhibitor I、Cathepsin
K inhibitor II、Cathepsin K inhibitor III（いずれも、メルク カルビオケ
ム社製等）のほか、カテプシン阻害剤：たとえば、Cathepsin inhibitor I、
Cathepsin inhibitor II、Cathepsin inhibitor III（いずれも、メルク カル
ビオケム社製等）を使用することができる。

15 前記培養液は、ウィルス産生時において pH 7.2～pH 8.0が維持され
ていることが好ましい。これ以下の pHではベクターのプルキンエ細胞指向性
(選択性) が低下し、これ以上の pHでは細胞の増殖が悪くなるからである。
細胞の増殖について、培養液の pHは酸性にシフトするため、培養液中にはプロ
20 テアーゼ阻害剤のほか、HEPES 等の pH低下を防ぐ効果のある試薬を適宜加
えてよい。

宿主細胞の培養は、一般には 3～10% CO₂、30～40°C、特に 5% CO₂、37°C、の条件下で行われるが、これに限定されるものではない。トラン
25 スフェクション後の培養期間は、特に限定されないが、少なくとも 24 時間、
長い場合は 216 時間、好ましくは 36 から 72 時間、より好ましくは 40 から 48
時間程度である。

なお、インビトロシェン社製のレンチウイルスベクター（商品名:pLenti6/V5-DEST）を用いる場合は、そのまま使用するとあまり高い力価は得られないが、該ベクターから SV40 プロモーターと Blasticidine 耐性遺伝子を除去することで、高力価 (10^7 TU/ml) を得ることができる（特願 2005-231514 参照）。

4. プルキンエ細胞指向性ベクターによる遺伝子治療

本発明のベクターは、プルキンエ細胞に対する親和性、選択性が極めて高いため、プルキンエ細胞への送達ベクターとして、遺伝子治療に有用である。すなわち、本発明のベクターは、プルキンエ細胞における障害を病因とする「プルキンエ細胞障害性疾患」の治療用医薬組成物として有用である。前記医薬組成物は、本発明のベクターを薬理学的に許容しうる担体とともに適当なバッファーに溶解・懸濁することによって調製され、小脳皮質及び／あるいは小脳表面のクモ膜下腔に注入される。

前記「プルキンエ細胞障害性疾患」としては、脊髄小脳変性症やハンチントン病を含むポリグルタミン病、ニーマンピック病、毛細血管拡張性運動失調症、自閉症、アルツハイマー病、胎児アルコール症候群(FAS)、アルコール中毒、ならびに加齢性小脳失調を挙げることができる。

本発明のベクターに連結される「治療用遺伝子」とは、プルキンエ細胞で発現された場合、前記したプルキンエ細胞障害性疾患の治療に有用な遺伝子であって、その治療対象とする疾患に合わせて、以下のように選択することができる。

ポリグルタミン病の治療を目的とした場合は、GTPase CRAG (Qin et al. J. cell Biol. 2006 Feb 13;172(4):497-504.)、ubiquitin chain assembly factor E4B (UFD2a) (Matsumoto et al. EMBO J. 2004 Feb 11;23(3):659-69.)、ATPase VCP/p97 (Hirabayashi et al. Cell Death Differ. 2001 Oct;8(10):977-84.)、分子シャペロン HDJ-2 HSDJ (Cummings et al. Nat Genet. 1998 Jun;19(2):148-54.) や分子シャペロン BiP (Kozutsumi et al. Nature. 1988 Mar 31;332(6163):462-4.)、小胞体蛋白質分解を促進する分子：ER degradation enhancing alpha-mannosidase-like protein (EDEM) (Oda et al. Science. 2003 Feb 28;299(5611):1394-7.)、ER のセンサー分子 (Endoplasmic reticulum (ER) stress transducer) : CREB/ATF family member OASIS (Kondo et al. Nat Cell Biol. 2005 Feb;7(2):186-94.)、IRE1 (Welihinda and Kaufman. J Biol Chem. 1996 Jul 26;271(30):18181-7.)、PERK, ATF6 (Yoshida et al. J Biol Chem. 1998 Dec 11;273(50):33741-9.) をコードする遺伝子を用いることができる。

また、脊髄小脳変性症 1 型、2 型、6 型の治療を目的とした場合は、ataxin-1、ataxin-2、 α 1a 電位依存型カルシウムチャネル、PKC γ 遺伝子をコードする遺伝子に対する siRNA、ハンチントン病の治療を目的とした場合は、Huntingtin に対する siRNA を用いて、これら遺伝子の発現を抑制してもよい。

5 ニーマンピック病の治療を目的とした場合は、スフィンゴミエリナーゼをコードする遺伝子を治療用遺伝子として用いることができる。毛細血管拡張性運動失調症の治療を目的とした場合は、AT-mutated(atm)、自閉症の治療を目的とした場合は、Reelin や Bcl-2 をコードする遺伝子を治療用遺伝子として用いることができる。アルツハイマー病の治療を目的とした場合は、ネプリライシン 10 をコードする遺伝子を治療用遺伝子として用いることができる。さらに、胎児アルコール症候群(FAS)、アルコール中毒、及び加齢性小脳失調の治療を目的とした場合は、Bcl-2、DNF、NGF をコードする遺伝子を治療用遺伝子として用いることができる。

こうした遺伝子治療の薬理評価は、治療対象となる疾患の種類により異なる 15 が、脊髄小脳変性症の場合、ベクターを、小脳皮質及び／あるいは小脳表面のクモ膜下腔に投与した後、細胞学的にはプルキンエ細胞、星状細胞や籠細胞を含む小脳の神経細胞の変性脱落の防止によって、さらに臨床的(動物の場合は行動学的)には小脳失調の改善程度により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、好ましくは、小脳表面のクモ膜下腔に注入すること 20 により、投与される。注入されたベクターは、注入部位周辺のプルキンエ細胞のみに限局することなく、プルキンエ細胞全体に高い親和性で、かつ広範囲に治療用遺伝子を送達することができる。また、小脳表面のクモ膜下腔への本発明のベクターの注入は、ヘルペスウイルスやアデノ随伴ウイルスで報告された脳深部に位置する下オリーブ核や小脳核への注入に比べて簡便で、脳実質の損傷を抑制できるため、臨床応用に優れる。

投与にあたっては、注入の際、脳圧を安定して維持させる観点から、好ましくは、一定した速度で注入可能な手段、例えばマウスでは、ハミルトンシリジとそれを取りつけることができるマイクロマニピュレーター及び注入のためのマイクルインジェクションポンプ等を用いることが望ましい。注入速度及び 30 投与量は、脳圧を安定して維持できる範囲であれば特に限定されるものではない

く、個体の年齢、体重、疾患状態等に応じて、適宜設定され得る。例えばマウスの場合、10nl/分～800nl/分、好ましくは、50nl/分～400nl/分、より好ましくは、100nl/分～200nl/分、計2～8μlであることが望ましい。

本発明の医薬組成物の投与量は、治療効果を発揮させるに適した量であれば特に限定されるものではなく、個体の年齢、体重、疾患状態等に応じて、適宜設定され得る。また、本発明の治療剤の投与回数は、治療効果を発揮させるに十分な回数であればよい。アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスおよびレンチウイルスを用いた場合、長期の遺伝子発現が確認されているため1回の投与でもよいが、組み込まれる遺伝子のコピー数を増加させ、より広範囲の細胞に導入させるためには、治療効果を見ながら、小脳表面の場所を変更して3回程度投与してもよい。

5. 小脳プルキンエ細胞障害性疾患のモデル動物

本発明のベクターを非ヒト哺乳動物のクモ膜下腔に注入することにより、対象動物のプルキンエ細胞特異的に特定遺伝子の発現を抑制したり、過剰発現させることができる。

使用可能な非ヒト哺乳動物は、特に限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、サルを挙げることができる。特にマウス、ラット以外の動物ではトランスジェニックマウスを作出するのが極めて困難であるため、本発明のベクターの使用は非常に有効である。

たとえば、本発明のベクターに外来遺伝子として、前記した小脳疾患遺伝子（異常伸長したCAGリピートを持つataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、α1a電位依存型カルシウムチャネル、Huntingtinをコードする遺伝子や変異を持つPKCγをコードする遺伝子（Klebe S. et al. New mutations in protein kinase Cgamma associated with spinocerebellar ataxia type 14. Ann Neurol. 2005 Nov;58(5):720-9）などを非ヒト哺乳動物に導入して発現させれば、当該遺伝子が関与する小脳プルキンエ細胞障害性疾患を発症させることができる。このようなトランスジェニック動物は、小脳プルキンエ細胞障害性疾患のモデル動物や小脳機能研究用モデル動物として有用である。

6. プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用培養液及びキット

本発明はまた、カテプシンK阻害活性を有する物質を含んで成る、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用培養液や、そのような培養液（カテプシンK阻害活性を有する物質と細胞培養液、またはカテプシンK阻害活性を有する物質を含む細胞培養液）を構成要素として含む、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用キットも提供する。

本発明の培養液は、MEM、 α -MEM、D-MEM、BME、RPMI-1640、D-MEM/F-12、Ham's F-10、Ham's F-12 等、公知の培養液にカテプシンK阻害活性を有する物質を添加して調製される。カテプシンK阻害活性を有する物質としては、カテプシンK阻害剤:たとえば、Cathepsin K inhibitor I、Cathepsin K inhibitor II、Cathepsin K inhibitor III (いずれも、メルク カルビオケム社製等) のほか、カテプシン阻害剤:たとえば、Cathepsin inhibitor I、Cathepsin inhibitor II、Cathepsin inhibitor III (いずれも、メルク カルビオケム社製等) などを適宜用いることができるが、これらに限定されるものではない。

前記培養液は、ウイルス産生時において pH 7.2 ~ pH 8.0 が維持されているように、HEPES 等の pH 低下を防ぐ効果のある試薬を適宜含んでいてよい。

本発明のキットは、前記した必須の構成要素（カテプシンK阻害活性を有する物質と細胞培養液、またはカテプシンK阻害活性を有する物質を含む細胞培養液）のほか、ウイルスプラスミドトランスフェクション用の塩化カルシウム溶液や Hank's 平衡塩溶液 (Hank's Balanced Salt Solution : HBSS)、リン酸バッファー、ろ過滅菌用フィルター (径 0.22 μm のものなど) 等を含んでいてよい。塩化カルシウムは、たとえば、36.76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ に精製水 100 ml を加え、ろ過滅菌することにより調製される。また、Hank's 平衡塩溶液 (2xHBSS) は、たとえば、NaCl 8.2g (final 0.28M)、HEPES 5.95g (final 0.05M)、 Na_2PO_4 0.108g (final 1.5 mM)、 H_2O 400ml を混合し、5 N NaOH で pH 7.05 に調製し、精製水を加えて 500 ml にすることにより調製される。

実施例

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施

例に限定されるものではない。

実施例 1：トランスフェクション後の培養時間がウイルスのプルキンエ細胞選択性に与える影響

5 <方法>

(1) ウィルスの產生

以下の操作を、P2 実験室で行なった。ウィルス產生には、HEK293FT 細胞を用いた。培養液は通常用いられている、10%ウシ血清を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) を使用した。対数増殖期の HEK293FT 細胞をリン酸緩衝化生理食塩水 (Mg^{2+} と Ca^{2+} を含有しない) [PBS(–)] に分散させ、ついで、10cm ディッシュ(ファルコン社製)あたり 5×10^5 細胞となるように播種した。播種後の 10cm ディッシュに、10 重量%ウシ胎仔血清含有 D-MEM10ml を添加し、その後、細胞を、5 体積%CO₂、37°Cで培養した。24 時間後、前記ディッシュ中の培養液を、新しい培養液(10 重量%ウシ胎仔血清含有 D-MEM) 10ml と交換した。その後、細胞を、5 体積%CO₂、37°Cで 0.5 時間培養した。

一方、pCAGkGP1R(St. Jude Children's Research Hospital) 6 μg, pCAG4RTR2(St. Jude Children's Research Hospital) 2 μg, pCAG-VSV-G(St. Jude Children's Research Hospital) 2 μg, pCL20c MSCV-GFP(St. Jude Children's Research Hospital/George Washington University) 10 μg それぞれを 450 μl 減菌水に溶解させ、プラスミド溶液を得た。

・pCAGkGP1R: gag(ウイルスの構造蛋白質をコード)と pol(逆転写酵素をコード)を含むパッケージングプラスミド。

・pCAG4RTR2: tat(転写調節遺伝子)を含むプラスミド。rev を削除してあるため、ウイルス粒子は宿主内で複製することができない。

・pCAG-VSV-G: VSV-G は Vesicular stomatitis virus glycoprotein の略。レンチウイルスの本来の Envelope では CD4 陽性細胞にしか感染できない。これをリン脂質をターゲットとする VSV(Vesicular stomatitis virus)の Envelope に置換し、神経を含むさまざまな細胞に感染可能としたエンベローププラスミド。

・pCL20c MSCV-GFP: レンチウイルスのメインベクター pCL20c において、2つの 30 LTR 内に MSCV プロモーターを配置し、これに GFP 遺伝子を連結させたプラスミ

ド(図1)。

このようにウイルス産生に不可欠な遺伝子を4つのプラスミドに分割し、複製に必要な領域等を削除することにより、産生されたウイルスは感染能を持つ一方、感染後は自己増殖能が欠如するため安全性が増す。

5 得られたプラスミド溶液に2.5M CaCl₂, 50 μlを添加して攪拌し、2xHBSS〔組成:50mM HEPES、0mM NaCl, 1.5mM Na₂HP0₄, pH7.05〕500 μlを添加し、すばやく攪拌した。

前記ディッシュにプラスミド溶液を均等に滴下し、穏やかにディッシュ内の培地と混合した。その後、細胞を、5体積%CO₂, 35°Cで培養した。以下、バイオハザード対策用安全キャビネットの中で操作を行なった。

10 16時間後、前記ディッシュ中の培地を、新しい培地(10重量%ウシ胎仔血清含有D-MEM)10mlと交換した。さらに細胞を、5体積%CO₂, 37°Cで培養しトランスフェクション後から40時間でウイルスを含む培養液を回収した(40h virus)。その後、新しい培養液を加えてさらに24時間培養し、トランスフェクション後15 64時間(64h virus)でウイルスを含む培養液を回収した(図2参照)。

(2)濃縮

前記(1)で回収した培地は、それぞれ50ml遠心管に移し、1000rpm(120×g)、4分間遠心分離して、上清を得た。得られた上清を、フィルター(ミリポア社製、0.22 μm径)に通した。得られた濾液を、ベックマン社製ローターSW28.1を用いた超遠心分離(25,000rpm, 2時間、4°C)に供してウイルス粒子を沈殿させ、上清を除去した。

得られたウイルス粒子沈殿物をPBS(-)に懸濁し、最終量を200 μlとし、感染用ウイルス液を得た。なお、すぐに使用しないウイルス液を、20 μlずつ分注し、-80°Cで保存した。

25 (3)ウイルス力価の測定

(i) GFPの蛍光を指標とする方法

対数増殖期のHELA細胞をPBS(-)に分散させ、ついで、12ウェルディッシュ(イワキ硝子社製)に1ウェルあたり5 × 10⁴細胞となるように播種した。播種後の12ウェルディッシュに、10重量%ウシ胎仔血清含有D-MEMを、1ml/ウェルとなるように添加し、その後、細胞を、5体積%CO₂, 37°Cで24時間培養した。

ウイルス液を 10^3 ~ 10^5 倍となるように前記ウェル内の培地に添加した。また、同時に、Hexadimethrine Bromide (SIGMA 社製、商品名：ポリブレン) を $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように各ウェルに添加した。その後、細胞を 5 体積% CO_2 , 37°Cで 88 時間培養した。

5 ウェルの中の緑色蛍光蛋白質(GFP)発現細胞を蛍光顕微鏡(オリンパス社製商品名:CKX41)下でセルカウンター(アズワン社製、商品名:数取器)を用いて計測し、ウイルスの力価を算出した。 10^x 希釀ウイルス液を添加した中、Y 個の細胞の GFP 発現細胞が見出された場合、ウイルス力価は、 $Y \times 10^x \text{TU}/\text{ml}$ (TU:transductionunit) として算出される。

10 (ii) 培養細胞(HeLa 細胞)のゲノムに組み込まれるプロウイルスのコピー数による評価 (Izopet et al. J Med Virol. 1998 Jan;54(1):54-9.)

HeLa 細胞を 10cm ディッシュで培養し、播種 24 時間後にウイルス液を感染させる。感染 3 日後に 5.0×10^6 個の細胞を得た。これと平行して同数の LAV-8E5 細胞(ATCC 社, Manassas, VA, USA)を得た。LAV-8E5 細胞は 1 細胞に HIV1 型のプロウイルスを 1 コピー持つておらず、これをスタンダードとした。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、最終的に $100 \mu\text{l}$ の TE バッファーに溶解した。このうち $1 \mu\text{l}$ を用い、HIV プロウイルスの RRE (rev responsive element) に含まれる 290 ベースペアの領域を、以下のプライマーを用いて増幅した：

15 5' -ATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA-3' (配列番号 9)、5' -CAGACTGTGAGTTGCAA
20 CAGATGCTGT-3' (配列番号 10)。

ゲノムに組み込まれるプロウイルスのコピー数はゲノム DNA を段階希釀して求めた。すなわち、バンドが現れなくなる直前の希釀倍率を決定し、LAV-8E5 細胞を用いたスタンダードと比較することで、 5.0×10^6 個の HeLa 細胞あたり何個のプロウイルスが組み込まれているか (ゲノムコピー数／ウイルス液 1ml) を計算した。

(4) マウス小脳クモ膜下腔へのベクターの接種

マウス (SLC 供給、4~10 週齢) に、ペントバルビタール(商品名:ネンブタール)を、腹腔内投与 (40mg/kg body weight) にて麻酔し、以下の操作を、バイオハザード対策用安全キャビネットの中で行なった。

25 麻酔後、マウスを、小動物固定装置 [ナリシゲ社製、商品名:SG-4] を用いて

固定した。また、体温コントローラー [FST 社製、商品名:体温コントロールシステム(マウス用)FST-HPSM] にて、マウス体温を 37°C となるように維持した。マウスの頭部の毛を刈った後、Bregma より数ミリ吻側から小脳直上にかけて皮膚を切開した。ついで、実体顕微鏡(ニコン社製、商品名 1SMZ645)下で、Bregma 5 より 5~7mm 尾側の正中部の頭蓋骨に、マイクロドリル [浦和工業社製、商品名:パワーコントローラーUC100+HB1(ドリル)] を用いて、内径 2~3mm の穴を開けた。また、注射針を用いて、骨の下の硬膜及びクモ膜に穴を開けた。

得られたレンチウイルスベクターを、商品名:レックスフィルマイクロシリジ(WPI 社製、10 μl 容量)に充填し、フレックスフィルマイクロシリジをマイクロマニピュレーターに取りつけたウルトラマイクロポンプ 2(WPI 社製)にセットした。

マイクロシリジの針先を小脳直上に開けた硬膜の穴より約 0.5mm 刺入し、クモ膜下腔に留置後、前記レンチウイルスベクターを、ウルトラマイクロポンプ 2 専用デジタルコントローラーMicro4(商品名、WPI 社製)を用いて、100nl/15 分の速度で 40 分間、計 4 μl 注入した。

注入後、切開したマウスの皮膚を、縫合糸付き眼科用微小針(夏目製作所社製、商品名:眼科用弱弩針 C67-0)で縫合した。その後、固定装置からマウスをはずし、ヒーティングパッド(昭和精機工業社製、商品名:ゴムマットヒーターSG-15)上に置いたケージ(安全キャビネット内)で観察した。マウスが、麻酔から覚醒した後、マウスケージを HEPA フィルター付の感染動物用ラック(トキワ科学器械株式会社製、商品名:バイオクリーンガップセルユニット T-BCC-M4)内で飼育した。

接種後 7 日目のマウスについて、4%ホルムアルデヒドーリン酸緩衝液で灌流固定後、脳を摘出した。蛍光実体顕微鏡を用いて脳全体の写真と GFP の蛍光写真を撮影後、厚さ 50 μm、あるいは 100 μ m の小脳矢状断切片をマイクロスライサー(堂阪イーエム社製 商品名:DTK-1000)を用いて作製した。作製された脳切片を、一次抗体[Mouse monoclonal anti-parvalbumin(星状細胞、籠細胞のマーカー):SIGMA 社製、あるいは Mouse monoclonal anti-GFAP(グリア細胞のマーカー):ケミコン社製、あるいは Mouse monoclonal anti-neuron-specific nuclear protein (NeuN、顆粒細胞のマーカー):ケミコン社製、あるいは mouse

monoclonal anti-mGluR2 (ゴルジ細胞のマーカー)：生理学研究所重本隆一教授より譲り受け)と共に 24 時間室温でインキュベーションし、ついで、二次抗体 (Alexa fluor 568-conjugated anti-mouse IgG : Invitrogen 社製) で 2 時間、室温でインキュベーションし、顕微鏡用標本を得た。その後、蛍光顕微鏡 (Leica 5
社製 商品名 : DMI 6000B) 及び共焦点顕微鏡 (CarlZeiss 社製 商品名 : LSM5 Pascal) で標本の観察を行なうことにより発現 GFP 蛋白質の局在と発現細胞の種類を調べた。

＜結果＞

10 トランスフェクション後 40 時間で培養液中に放出されたウイルスの接種では、全 GFP 発現細胞のうち約半分 (51%) がプルキンエ細胞であった。バーグマングリア (22%)、星状細胞/籠細胞 (16%) がこれに続いた (図 2 及び図 3)。一方、トランスフェクション後、40 時間から 64 時間で培養液中に放出されたウイルス (64 h virus) の接種では、GFP 発現プルキンエ細胞の割合は 15%、星状細胞/籠細胞 (4%) に減少し、バーグマングリアは 77% にまで増加した (図 2 及び図 3)。
15 表 1 に示すように、トランスフェクション後 40 時間の培養液の pH は 7.2 であるが、トランスフェクション後 64 時間後の培養液の pH は 7.0 に低下する。したがって、プルキンエ細胞への親和性の低下は培養液の pH の変化によるものではないかと考えた。

[表 1]

pHs of virus-containing medium samples and titers of virus stocks

Host cell	Culture period ^a	pH ^b	Biological titer (TU/ml)	n ^d
HEK 293FT	40 h	7.2	5.1 ± 2.6 x 10 ⁸	4
	64 h	7.0	4.4 ± 2.1 x 10 ⁸	4
	40 h	7.0 ^c	2.5 ± 2.1 x 10 ⁸	3

^aTime (h) after transfection. ^bpH of conditioned medium at harvest.

^cpH of conditioned medium was adjusted to 7.0 by HCl. ^dNumber of cultures that were independently conducted.

20

実施例 2 : プルキンエ細胞選択性に対するウイルス產生時の培養液の pH の影響
実施例 1 の結果に基づき、培養液の pH とプルキンエ細胞選択性の関係について

て検討した。

<方法>

実施例 1 に従い、トランスフェクション後 40 時間のウイルスを含む培養液に希塩酸を加えて pH を 7.0 に調節した後、ウイルスを精製し、同様にマウス小脳に接種し、7 日後の脳切片を観察した。さらに HEK293FT 細胞より増殖が遅く、したがって培養液の増殖に伴う酸性化も遅い HEK293T 細胞を用いて同様の実験を行った。

<結果>

トランスフェクション後 40 時間の培養液の pH(7.2)を 0.2 だけ酸性側にシフト(pH7.0)させ、同じようにウイルスをマウス小脳に接種すると、予想通りトランスフェクション後 64 時間で回収したときとほぼ同様の結果を得た。すなわち、GFP 発現プルキンエ細胞 14%、バーグマングリア 72%、星状細胞/籠細胞 1.7% であった (図 2 の 40h virus(pH↓)、及び図 4)。さらに HEK293FT 細胞より育ちの遅い HEK293T 細胞を用いると培養液の酸性化が遅くなり、同じようにウイルスを産生させても、プルキンエ細胞への親和性が高いウイルスが得られることがわかった。このことは細胞膜の構成成分であるリン脂質 (フォスファチジルセリン) と結合能を持つ VSV-G エンベロープを用いても、プルキンエ細胞への選択性は、ウイルス産生時の培養液の pH に大きく影響されることを示している。

20

実施例 3 : プルキンエ細胞選択性に対する血清の影響

<方法>

表 1 に示す Lot の異なる 9 種のウシ血清を用いて、実施例 1 と同様の手順でウイルスを産生させ、それぞれのプルキンエ細胞への選択性を検討した。

[表2]

Serum No.	Suppliers	Origin	LOT No.
S1	GIBCO	USA	1175763
S2	GIBCO	Mexico	1214677
S3	EQUITECH-BIO, INC.	USA	SFB30-1540
S4	EQUITECH-BIO, INC.	USA	SFB30-1548
S5	Valley Biomedical	USA	J31041
S6	Biowest	Denmark	S04303S1750
S7	Biological Industries	Israel	716543
S8	HyClone Laboratories	USA	APA20504
S9	HyClone Laboratories	USA	ANK19840
S7-SF*	Biological Industries	Israel	716543

SF; Serum free: HEK293T cells were transfected in the culture medium containing the serum S7. The serum was removed 24 h after the transfection.

<結果>

図5に示すとおり、プルキンエ細胞への選択性は血清のLotの違いにより大きく異なることが明らかになった。さらに血清を加えなかった場合でもウイルスは産生されるが、プルキンエ細胞への選択性が低く、さまざまな細胞に遺伝子発現することが確認された。

実施例4：プルキンエ細胞選択性に対するプロテアーゼ阻害剤の影響

10 <方法>

血清の代わりに、表3に示す様々な種類のプロテアーゼ阻害剤の存在下で、実施例1の手順にしたがいHEK293T細胞にウイルスを産生させ、精製したウイルスのマウス小脳における遺伝子発現のプルキンエ細胞選択性を検討した。

[表3]

	Con c.	n (Culture)	Titre x 10 ³	n (Mice)
Serum free	-	5	7.0 ± 1.5	7
Serum-free (+ Insulin, Transferrin, Selene)	-	4	3.6 ± 1.3	5
Biological Industries Israel (Lot No. 716543) 40 h pH7.2	10 %	4	2.6 ± 0.4	5
Biological Industries Israel (Lot No. 716543) 64 h pH7.0	10 %	4	2.4 ± 0.5	6
Serum (+)	10 %	3	3.4 ± 1.2	5
HyClone Laboratories, Inc. 0 USA (Lot No. AP420504)	10 %	3(2)	2.1 ± 1.4	5
HyClone Laboratories, Inc. 1 USA (Lot No. ANK19840)	10 %	2	ND	2
EQUITECH-BIO, Inc. USA (Lot No. SFB30-1540)	10 %	4	6.9 ± 2.2	6
GIBCO Mexico (Lot No. 1214677)	10 %	3	6.4 ± 0.6	5
CGS 27023A	4	3.4 ± 1.4	5	
Metallo proteinase inhibitor				
TIMP-1	1	6.3	1	
Serine & cysteine proteinase inhibitors	Proteinase inhibitor cocktail (EDTA free) (AEBSF, Aprotinin, E-64, Leupeptin)	6	2.3 ± 0.7	7
Cysteine proteinase inhibitor	Cathepsin inhibitor I	5	8.3 ± 2.6	6
Serine proteinase inhibitor	Cathepsin K inhibitor	6	4.8 ± 0.6	7
Aspartate proteinase inhibitor				

ウイルスはすべて 1×10^9 TU/ml の力価に合わせた後、マウス小脳に接種し、1週間後に厚さ $100 \mu\text{m}$ の小脳矢状断切片を作製した。共焦点レーザー顕微鏡(20倍の対物レンズ)を用いて切片を $2 \mu\text{m}$ の厚みで切片の下から上までスキャンし、GFP のシグナルを 3 次元的に再構成した。評価は以下の 2 つの方法により行った。

- (1) 観察視野 (0.95mm^2) における、GFP を発現している全細胞中のプルキンエ細胞の割合(%)を求めた。これはウイルス感染のプルキンエ細胞への選択性>Selectivity)を表す。
- (2) 観察視野における、全プルキンエ細胞中の GFP 発現プルキンエ細胞の割合 (%)を求めた。これはウイルスのプルキンエ細胞への感染効率(efficiency)を表す。

<結果>

(1) プルキンエ細胞への選択性 (図 6)

血清もプロテアーゼ阻害剤も添加せず、D-MEM のみの培地で產生したウイルスペクターでは、プルキンエ細胞への選択性は 48% であった (GFP を発現している細胞のうち約半分がプルキンエ細胞)。血清を加えた培地で產生させたウイルスでは、選択性が大きく上昇するもの (GIBCO、メキシコ産血清など) もあったが、ほとんど変わらないもの (HyClone 社製血清) もあった。これに対し、血清を加えずにプロテアーゼ阻害剤を用いたものでは、TIMP-1 を除く使用した薬剤いずれにおいてもプルキンエ細胞への選択性が大きく上昇した。特にカテプシン K 阻害剤を加えたもの顕著であった。

(2) プルキンエ細胞の遺伝子発現効率 (図 7)

血清もプロテアーゼ阻害剤も添加せず、D-MEM のみの培地で產生したウイルスペクターでは、プルキンエ細胞への遺伝子発現効率は 37% であった (観察視野の全プルキンエ細胞中 37% の細胞が GFP 遺伝子を発現していた)。選択性の結果とは異なり、プルキンエ細胞における遺伝子発現効率は、使用する血清の Lot を変化させても有意な上昇は見られなかった。同様にプロテアーゼ阻害剤の添加でも、5 種類中 3 種類で有意な上昇は見られなかった。しかし、カテプシン K を添加したものでは、プルキンエ細胞の遺伝子発現効率は 86% と、著しい上昇が見られた。

以上の結果から、血清を添加する通常のプロトコールでレンチウイルスベクターを産生する場合、ウイルスベクターのプルキンエ細胞への選択性と遺伝子発現効率は培地中のプロテアーゼの働きにより、影響を受けていると考えられた。この現象には、特にシステインプロテアーゼファミリーの一つ、カテプシンKが大きな役割を果たしていると考えられ、ウイルス産生時の培地にカテプシンKの阻害剤を加えることで、プルキンエ細胞に極めて選択性が高く、かつ親和性も高いウイルスを産生することが可能となることが明らかとなった。

実施例5：プルキンエ細胞選択性とウイルスVSV-Gに対するカテプシンK阻害剤の影響

1. 培養液のpHと培養液中のカテプシンK活性

<方法>

実施例1の手順でトランスフェクション後40時間の培養液(pH7.2)と64時間(pH7.0)の培養液を得る。これら2つの培養液中のカテプシンK活性を15 Cathepsin K Detection Kit(メルクカルビオケム社製)を用いて測定する。

2. カテプシンKによるVSV-Gの切断

<方法>

40時間ウイルスと64時間ウイルスを産生、回収する。またトランスフェクション後40時間の培養液をカテプシンKで処理、あるいはpHを希塩酸を用いて7.0に低下させた後、ウイルスを回収する。これら4種のウイルスのVSV-G蛋白質の切断の状態を、直接アミノ末端シーケンシングを行い、どこで切断されているのか確認する。

3. ウイルスをカテプシンKで処理することで、プルキンエ細胞選択性が低下すること

25 <方法>

実施例1の手順に従い、トランスフェクション後40時間でウイルス粒子を含む培養液を得る。この培養液をカテプシンKで2時間処理する。その後超遠心を行ないウイルスを回収、マウス小脳に接種する。1週間後にウイルスのプルキンエ細胞選択性が低下しているのを確認する。カテプシンKに関しては、すでにHEK293T細胞からmRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて遺伝子を得ている

(HEK293T 細胞から RT-PCR でカテプシン K 遺伝子が得られたことは、HEK293T 細胞がカテプシン K を発現していることを示している)。さらにカテプシン K 遺伝子を pcDNA3.1 ベクターにサブクローニングし、これを用いて HEK293T 細胞をトランスフェクションし、3 日後に培養液を回収したが、この培養液にカテ 5 プシン K が十分量含まれることも、rabbit polyclonal anti-cathepsin K 抗体 (BioVision 社製) を用いたウエスタンプロット法にて確認している。このよ うにして得られたカテプシン K を用いてウイルスを処理する。

実施例 6：プルキンエ細胞障害遺伝子を用いた疾患モデルマウスの作出

10 <方法>

脊髄小脳変性症 3 型(MJD 病)の原因遺伝子は ataxin-3 であり、患者ではこの遺伝子内に存在する CAG リピートが異常伸長している。そこで CAG リピートが異常伸長した ataxin-3 を、レンチウイルスベクターを用いてプルキンエ細胞に発現させることにより、MJD 病のモデルマウスを作出した。

15 <結果>

CAG リピートが異常伸長した ataxin-3 を MSCV プロモーターの制御下で発現するようにベクタープラスミドを作製した(図 8A)。次に実施例 1 の手順に従い、40 時間ウイルスを得た。なお、ウイルス産生の宿主細胞として HEK293T 細胞を用いた。得られたウイルスをマウス小脳に接種し、2 カ月後に小脳失調の程度 20 をロータロッド(室町機械社製、MK-660C)にて解析した。ロッド(棒)は停止状態から次第に加速し 180 秒後に 40 回転／分の速度になるように調節し、マウスがロッドに乗っている時間を測定した。実験は 8 回繰り返した。ウイルスで小脳に GFP を発現させたマウスは、ウイルスを接種していないコントロールマウスとロータロッドの成績に差がないことはあらかじめ確認している。これに 25 対して、ウイルスを接種したマウスは、ウイルスを接種していないコントロールのマウスに比べて、有意に短時間でロッドから落下し、運動失調が出現していることが示された(図 8B)。実験終了後、マウスを灌流固定し、小脳切片を作製して観察したところ、プルキンエ細胞内に ataxin-3 の凝集塊が認められた(図 8C 矢印)。

30 このように、ウイルスを用いて小脳疾患原因遺伝子をプルキンエ細胞に発現

することにより、小脳疾患モデルマウスの作出が可能であることが示された。

実施例 7：脊髄小脳変性症モデルマウスを用いた治療用遺伝子発現ウイルスの治療効果の検討

5 <方法>

10 プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーターの制御下で、CAG リピートが異常伸長した脊髄小脳変性症 3 型遺伝子 ataxin-3[Q69]を発現するように配置した DNA コンストラクト(図 9 A)を作製した。これをマウス受精卵に接種し、小脳プルキンエ細胞特異的に ataxin-3[Q69]を高発現するトランスジェニックマウス(脊髄小脳変性症モデルマウス)を 3 ライン得た。これらのマウスの小脳に治療用遺伝子候補である CRAG、あるいは VCP/p97 の 522 番目のシスティンをスレオニンに変換した VCP(C522T)を発現するウイルスベクター(図 10 A)を接種し、運動失調が回復するかを観察した(図 10 B-E)。

<結果>

15 得られた 3 つのラインの脊髄小脳変性症モデルマウスのうち、a line と b line は生後すぐの時点から運動失調が極めて強く(図 9 B)、小脳の萎縮も顕著であった(図 9 C, D)。これに対し、c line の運動失調の程度は野生型と a, b line と野生型の中間であった(図 9 B)。生後 30 日の c line のモデルマウスの小脳に CRAG を発現するウイルスを接種し、1 週間おきにロータロッドテスト(ロッドは静止状態から、180 秒で 40 回転／分まで加速)を施行した。接種 1 週間後では、接種していないモデルマウスとほとんど差は認められなかった。しかしその後、ウイルスを接種したマウスは徐々に成績が向上した(図 9 D)。すなわち、ウイルスを用いたプルキンエ細胞選択性的な CRAG の発現により、脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスの運動障害が顕著に回復した。より運動失調が強い b line マウス(生後 21 日)に CRAG または GFP を発現するレンチウイルスベクターを接種したところ、4 週後にロータロッドの成績の有意な回復が観察された(図 10 D)。8 週後にはさらに長い間加速するロータロッドに乗ることができた(何も接種していないマウスと GFP 発現レンチウイルスベクターを接種したマウスでは、20 秒弱しかのることことができなかつたのに対し、CRAG 発現ウイルスベクターを接種したものでは 40 秒以上ものことができた)。接種 2 ヶ月後に定速 5 回転でロータ

ロッド試験を 6 回行ったところ、何も接種していないマウスと GFP 発現レンチウイルスベクターを接種したマウスでは、何度行ってもロッドが回転するとすぐに落ちたのに対し、CRAG 発現レンチウイルスベクターを接種したマウスでは、回数を重ねるごとに乗っていられる時間が長くなつた(図 10 E)。このことは
5 CRAG や VCP(C522T) 発現により小脳が司る運動学習機能も回復したこと示している。

ウイルスベクター接種 2 ヶ月後に b line マウスを灌流固定し小脳切片を作製した。小脳切片は抗 HA タグ抗体(図 11 A, C, E)、と抗カルビンディン抗体を用いて二重免疫組織染色した(図 11 B, D, E)。何も発現していない切片ではプルキンエ細胞層は大きく乱れ、細胞内部に ataxin-3 を含む封入体を認めた(図 11 A, B)。これに対し、CRAG や VCP(C522T) 発現させた切片では大部分の封入体が消失し、プルキンエ細胞層も 1~2 層と野生型に近い状態であった(図 11 C-F)。小脳皮質における封入体の数(図 11 G)、小脳皮質分子層の厚さ(図 11 H)を測定したところ、CRAG や VCP(C522T) 発現させた切片で封入体の数の有意な減少と
15 分子層の厚さの有意な増大を認めた。

実施例 8 :

図 12 に示されるように、従来の L7 プロモーター(L7-1)を基に、種々の縮小型 L7 プロモーター(L7-2, L7-3, L7-4, L7-5, L7-6, L7-7)を作製し、レンチウイルスベクターを用いて、この縮小型プロモーター制御下で GFP を発現させ、
20 プルキンエ細胞選択性を CMV プロモーター、MSCV プロモーター、あるいは従来の L7 プロモーター(L7-1)の場合と比較した。なお、L7-1~L7-7 の配列をそれぞれ配列表の配列番号 1 ~ 7 に示す。

<方法>

25 (1) ウィルスの產生

以下の操作を、P2 実験室で行なつた。ウイルス产生には、HEK293FT 細胞を用いた。培養液は通常用いられている、10%ウシ血清を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) を使用した。対数増殖期の HEK293FT 細胞をリン酸緩衝化生理食塩水(Mg^{2+} と Ca^{2+} を含有しない)[PBS(-)]に分散させ、ついで、10cm
30 ディッシュ(ファルコン社製)あたり 5×10^5 細胞となるように播種した。播種後

の 10cm ディッシュに、10 重量% ウシ胎仔血清含有 D-MEM 10ml を添加し、その後、細胞を、5 体積% CO₂, 37°C で培養した。24 時間後、前記ディッシュ中の培養液を、新しい培養液(10 重量% ウシ胎仔血清含有 D-MEM) 10ml と交換した。その後、細胞を、5 体積% CO₂, 37°C で 0.5 時間培養した。

5 一方、pCAGkGP1R(St. Jude Children's Research Hospital) 6 μg, pCAG4RTR2
10 (St. Jude Children's Research Hospital) 2 μg, pCAG-VSV-G(St. Jude
Children's Research Hospital) 2 μg, pCL20c L7-X-GFP 又は pCL20c
MSCV-GFP(St. Jude Children's Research Hospital / George Washington
University) 10 μg それぞれを 450 μl 滅菌水に溶解させ、プラスミド溶液を得た。

・pCAGkGP1R: gag(ウイルスの構造蛋白質をコード)と pol(逆転写酵素をコード)を含むパッケージングプラスミド。

・pCAG4RTR2: tat(転写調節遺伝子)を含むプラスミド。rev を削除してあるため、ウイルス粒子は宿主内で複製することができない。

15 15 · pCAGS-VSVG: VSVG は Vesicular somatitis virus glycoprotein の略。レンチウイルスの本来の Envelope では CD4 陽性細胞にしか感染できない。これを細胞膜の構成成分であるリン脂質(フォスファチジルセリン)をターゲットとする VSV の Envelope に置換することで、神経を含むさまざまな細胞に感染することが可能となる。

20 20 · pCL20c MSCV-GFP: レンチウイルスのメインベクター pCL20c のプロモーターを
MSCV プロモーターに置換し、2 つのLTR 内に GFP を連結させたプラスミド(図
1)。

25 25 · pCL20c L7-X-GFP: レンチウイルスのメインベクター pCL20c のプロモーター
を L7 プロモータ(L7-1) 又はその縮小型(L7-2~7)に置換し、2 つのLTR 内
に GFP を連結させたプラスミド(図 1 3 に pCL20c L7-4-GFP の構造を、またそ
の全配列を配列表の配列番号 8 に示す)。

得られたプラスミド溶液に 2.5M CaCl₂ 50 μl を添加して攪拌し、2xHBSS [組成: 50mM HEPES, 0mM NaCl, 1.5mM Na₂HP0₄, pH7.05] 500 μl を添加し、すばやく攪拌した。

30 30 前記ディッシュにプラスミド溶液を均等に滴下し、穏やかにディッシュ内の

培地と混合した。その後、細胞を、5 体積%CO₂, 35°Cで培養した。以下、バイオハザード対策用安全キャビネットの中で操作を行なった。

16 時間後、前記ディッシュ中の培地を、新しい培地(10 重量%ウシ胎仔血清含有 D-MEM) 10m1 と交換した。さらに細胞を、5 体積%CO₂, 37°Cで培養しトラン

5 スフェクション後から 40 時間でウイルスを含む培養液を回収した(40h virus)。

(2) 濃縮

前記(1)で回収した培地は、それぞれ 50m1 遠心管に移し、1000rpm(120×g)、4 分間遠心分離して、上清を得た。得られた上清を、フィルター(ミリポア社製、0.22 μm 径)に通した。得られた濾液を、ベックマン社製ローターSW28.1 を用いた超遠心分離(25,000rpm, 2 時間、4°C)に供してウイルス粒子を沈殿させ、上清を除去した。

得られたウイルス粒子沈殿物を PBS(-) に懸濁し、最終量を 200 μl とし、感染用ウイルス液を得た。なお、すぐに使用しないウイルス液を、20 μl ずつ分注し、-80°Cで保存した。

15 (3) ウィルス力値の測定

培養細胞(HeLa 細胞)のゲノムに組み込まれるプロウイルスのコピー数によって評価した (Izopet et al. J Med Virol. 1998 Jan;54(1):54-9.)。HeLa 細胞を 10cm ディッシュで培養し、播種 24 時間後にウイルス液を感染させる。感染 3 日後に 5.0 × 10⁶ 個の細胞を得た。これと平行して同数の LAV-8E5 細胞(ATCC 社, Manassas, VA, USA)を得た。LAV-8E5 細胞は 1 細胞に HIV1 型のプロウイルスを 1 コピー持つておらず、これをスタンダードとした。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、最終的に 100 μl の TE バッファーに溶解した。このうち 1 μl を用い、HIV プロウイルスの RRE(rev responsive element)に含まれる 290 ベースペアの領域を、以下のプライマーを用いて増幅した:

25 5' -ATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA-3' (配列番号 9)

5' -CAGACTGTGAGTTGCAACAGATGCTGT-3' (配列番号 10)。

ゲノムに組み込まれるコピー数はゲノム DNA を段階希釈して求めた。すなわち、バンドが現れなくなる直前の希釈倍率を決定し、LAV-8E5 細胞を用いたスタン

ダードと比較することで、5.0 × 10⁶ 個の HeLa 細胞あたり何個のプロウイルス

30 が組み込まれているか(ゲノムコピー数/ウイルス液 1ml)を決定した。

(4) 培養小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入実験

胎生 20 あるいは 21 日のウイスター ラットの小脳を用いて、12 ウエルディッシュに以下の手順で培養した。 1.0×10^7 個/ml の密度の小脳細胞懸濁液を 10%FBS 入りの DMEM/F12 で作製した。予め poly-L-ornithine でコーティングした直径 13mm のプラスチックカバースリップ（住友ベークライト社製、Sumilon MS-80060）の上に、懸濁液を 1 ウェルあたり 20ml 使用し（細胞 20 万個分）、直径約 6mm になるように薄く伸ばした。その後、5% CO₂、37°C に保たれた加湿培養機の中に 2 時間静置した。細胞がカバースリップに貼りついた後、上清を吸引除去し 37°C に温めた培養液（以下の成分）を 800ml ずつ加えた。培養液の成分：DMEM-nutrient mixture of Ham's F-12（シグマ社製）+ bovine insulin (10mg/ml)、bovine serum albumin (100mg/ml)、gentamicin (5mg/ml)、glutamine (200mg/ml)、human apotransferin (100mg/ml)、prostegeron (40nM)、putrescine (100nM)、sodium selenite (30nM)、triiodothyronine (0.5ng/ml)。次に $2-4 \times 10^5$ ゲノムコピー/ml の力価のウイルス液を 1ml 加えて感染させた。翌日（24 時間後）に最終濃度が 1% になるように FBS を加えた。

14 日後に培養細胞の GFP 蛍光写真を撮像し、40 個のプルキンエ細胞を無作為に選んで、その蛍光強度の平均を測定した。CMV プロモーターを使用した場合の平均 GFP 蛍光強度を 100% として評価した。

(5) マウス小脳クモ膜下腔へのベクターの接種

マウス (SLC 供給、4~10 週齢) に、ペントバルビタール（商品名：ネンブタール）を、腹腔内投与 (40mg/kg body weight) にて麻酔し、以下の操作を、バイオハザード対策用安全キャビネットの中で行なった。

麻酔後、マウスを、小動物固定装置 [ナリシゲ社製、商品名:SG-4] を用いて固定した。また、体温コントローラー [FST 社製、商品名:体温コントロールシステム (マウス用) FST-HPSM] にて、マウス体温を 37°C となるように維持した。マウスの頭部の毛を刈った後、Bregma より数ミリ吻側から小脳直上にかけて皮膚を切開した。ついで、実体顕微鏡 (ニコン社製、商品名 1SMZ645) 下で、Bregma より 5~7mm 尾側の正中部の頭蓋骨に、マイクロドリル [浦和工業社製、商品名:パワーコントローラー UC100+HB1 (ドリル)] を用いて、内径 2~3mm の穴を開けた。また、注射針を用いて、骨の下の硬膜及びクモ膜に穴を開けた。

得られたレンチウイルスベクターを、商品名：レックスファイルマイクロシリジ（WPI 社製、 $10\mu\text{l}$ 容量）に充填し、フレックスファイルマイクロシリジをマイクロマニピュレーターに取りつけたウルトラマイクロポンプ 2（WPI 社製）にセットした。

5 マイクロシリジの針先を小脳直上に開けた硬膜の穴より約 0.5mm 刺入し、
クモ膜下腔に留置後、得られたレンチウイルスベクターを、ウルトラマイクロ
ポンプ 2 専用デジタルコントローラー Micro4（商品名、WPI 社製）を用いて、
100nl/分の速度で 40 分間、計 $4\mu\text{l}$ 注入した。

注入後、切開したマウスの皮膚を、縫合糸付き眼科用微小針（夏目製作所社製、
10 商品名：眼科用弱鷲針 C67-0）で縫合した。その後、固定装置からマウスをはずし、ヒーティングパッド（昭和精機工業社製、商品名：ゴムマットヒーター SG-15）
上に置いたケージ（安全キャビネット内）で観察した。マウスが、麻酔から覚醒した後、マウスケージを HEPA フィルター付の感染動物用ラック（トキワ科学器械株式会社製、商品名：バイオクリーンガップセルユニット T-BCC-M4）内で飼育した。
15

接種後 7 日目のマウスについて、4% ホルムアルデヒドーリン酸緩衝液で灌流固定後、脳を摘出した。蛍光実体顕微鏡を用いて脳全体の写真と GFP の蛍光写真を撮影後、厚さ $50\mu\text{m}$ 、あるいは $100\mu\text{m}$ の小脳矢状断切片をマイクロスライサー（堂阪イーエム社製 商品名：DTK-1000）を用いて作製した。作製された脳切片を、一次抗体 [Mouse monoclonal anti-parvalbumin (星状細胞、籠細胞のマーカー) : SIGMA 社製、あるいは Mouse monoclonal anti-GFAP (グリア細胞のマーカー) : ケミコン社製、あるいは Mouse monoclonal anti-neuron-specific nuclear protein (NeuN、顆粒細胞のマーカー) : ケミコン社製、あるいは mouse monoclonal anti-mGluR2 (ゴルジ細胞のマーカー) : 生理学研究所重本隆一教授より譲り受け) と共に 24 時間室温でインキュベーションし、ついで、二次抗体 (Alexa fluor 568-conjugated anti-mouse IgG : Invitrogen 社製) で 2 時間、室温でインキュベーションし、顕微鏡用標本を得た。その後、蛍光顕微鏡 (Leica 社製 商品名：DMI 6000B) 及び共焦点顕微鏡 (CarlZeiss 社製 商品名：LSM5 Pascal) で標本の観察を行なうことにより発現 GFP 蛋白質の局在と発現細胞の種類を調べた。
20
25
30

<結果>

図14は、培養小脳神経細胞に、レンチウイルスベクターを用いて各種プロモーター制御下で GFP を発現させたときの導入率（発現割合）を示す。(a)は、全 GFP 発現細胞中のプルキンエ細胞の割合：GFP 発現プルキンエ細胞数／GFP 発現細胞数を示す。CMV プロモーターや MSCV プロモーターを用いた場合、GFP 発現細胞のほとんどがプルキンエ細胞以外であるのに対し、L7-1～L7-4 ではプルキンエ細胞にしか遺伝子発現が起こらなかった。L7-5、L7-6 では GFP 発現細胞が存在しなかった。L7-7 ではプルキンエ細胞に対する特異性が低下し、GFP 発現細胞の約半分はプルキンエ細胞以外であった。(b)は、全プルキンエ細胞中の GFP 発現プルキンエ細胞の割合：GFP 発現プルキンエ細胞数／全プルキンエ細胞数を示す。CMV プロモーターでは全プルキンエ細胞の約 5 分の 1、L7-1 では約 3 分の 1 のプルキンエ細胞にしか GFP 発現が見られない。これに対し、L7-4 ではほぼ 100%、すなわち存在するすべてのプルキンエ細胞に GFP が発現している。少なくとも 4 回の独立した小脳神経細胞培養標本を用いた結果の平均を示している。また使用したウイルスベクターはほぼ同じ力価 ($2\text{--}4 \times 10^5$ ゲノムコピー／ml) のものを用いている。

図15は、培養小脳プルキンエ細胞に、レンチウイルスベクターを用いて各種プロモーター制御下で GFP を発現させたときの蛍光強度(a)を示す。40 個のプルキンエ細胞を無作為に選び、冷却 CCD カメラで蛍光画像を取り込んだ後、20 その蛍光強度を IPLab イメージングソフトウェアー (Scanalytics 社製) を用いて測定した。(b)は、HEK293T 細胞に CMV プロモーター制御下で GFP を発現するレンチウイルスベクターを、さまざまな MOI で感染させたときの GFP 蛍光強度を示すグラフである。無作為に 40 個の HEK293T 細胞を選び、その蛍光強度を IPLab イメージングソフトウェアーを用いて測定した。MOI 10 から 1000 にかけて、蛍光強度は MOI の対数にほぼ比例した。

図16は、培養小脳プルキンエ細胞に、レンチウイルスベクターを用いて MSCV プロモーター、従来の L7 プロモーター(L7-1)あるいはその縮小型プロモーター(L7-2, L7-4, L7-5, L7-7)制御下で GFP を発現させた結果を示す。左のパネルは、プルキンエ細胞特異的な抗カルビンディン抗体を用いた蛍光免疫染色写真を示す。ただし MCV プロモーターを用いた場合(左上)のみ、抗カルビ

ンディン抗体に加えて顆粒細胞特異的な抗 NeuN 抗体も用いて染色した(プルキンエ細胞と顆粒細胞が赤く見える)。中央のパネルはそれぞれのウイルスベクターによって発現した GFP の蛍光写真を示す。右のパネルは左と中央のパネルを重ね合わせたもの(Overlay)である。MSCV プロモーターを用いた場合は、プルキンエ細胞、顆粒細胞に加えてグリア細胞(矢印)や顆粒細胞とプルキンエ細胞の中間サイズの細胞体を持つ細胞(矢頭)にも GFP の発現が見られた。これに対し、L7-1、L7-2、L7-4 ではプルキンエ細胞のみに GFP の発現が見られた。特に、L7-4 では存在するすべてのプルキンエ細胞に GFP が発現し、さらに GFP の発現も強く、プロモーター活性が従来の L7-1 より顕著に高いことが確認された。

図 15 は、各種プロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターによるマウス小脳への遺伝子発現実験の結果を示す。(a-d)は、レンチウイルスベクターを用いて、従来の L7 プロモーター(L7-1)制御下で GFP を発現させたときの GFP の蛍光写真である(力価 : 3.7×10^5 ゲノムコピー / ml)。(c), (d)は、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色した写真(これにより蛍光は増強する)である。(e-h)は、従来の L7-1 プロモーターの代わりに、L7-4 を持つレンチウイルスベクター(力価 : 2.4×10^5 ゲノムコピー / ml)を用いた場合の小脳プルキンエ細胞の GFP 蛍光写真である。ほぼ同じ力価(ほぼ同じ数のプロウイルスを染色体に導入する)を用いているにもかかわらず、L7-4 を用いた場合には、L7-1 を用いた場合に比較して、GFP を発現するプルキンエ細胞の数、GFP 発現量が顕著に高いことが確認された。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

25

産業上の利用の可能性

本発明によれば、小脳プルキンエ細胞に高い選択性を有するベクターを、血清を使用することなく作製することができる。本発明のベクターは、小脳が司る運動学習や協調運動の分子レベルでのメカニズム解明、及び脊髄小脳変性症等のプルキンエ細胞障害性疾患の遺伝子治療など、神経科学分野において基礎

研究から臨床応用まで幅広く利用可能である。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 —L7-1

5 配列番号 2 —L7-2

配列番号 3 —L7-3

配列番号 4 —L7-4

配列番号 5 —L7-5

配列番号 6 —L7-6

10 配列番号 7 —L7-7

配列番号 8 —pCL20c L7-4-GFP

配列番号 9 —人工配列の説明：プライマー

配列番号 10 —人工配列の説明：プライマー

請求の範囲

1. ウィルス由来プラスミドベクターに改変型 L7 プロモーターと外来遺伝子を機能しうる態様で連結して成る小脳プルキンエ細胞指向性ベクターであって、
5 前記改変型 L7 プロモーターが下記 a) 又は b) の DNA からなることを特徴とする前記ベクター：
 - a) 配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列を有する DNA
 - b) 配列番号 3 又は 4 に示される塩基配列と相補的な配列を有する DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、a) の DNA と同等のプルキンエ細胞
10 特異的プロモーター活性を有する DNA。
2. 前記ウィルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルス、及びレンチウイルスから選ばれるものである、請求項 1 に記載のベクター。
3. 前記ウィルスがレンチウイルスである、請求項 1 に記載のベクター。
- 15 4. 前記ベクターによって產生されるウィルスの蛋白質が実質的に分解修飾を受けていない状態にあることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。
5. レンチウイルスプラスミドベクターに外来遺伝子を機能しうる態様で連結して成る小脳プルキンエ細胞指向性ベクターであって、前記ベクターによつ
20 て產生されるウィルスの蛋白質が実質的に分解修飾を受けていない状態にあることを特徴とするベクター。
6. 前記外来遺伝子が、CMV プロモーター、MSCV プロモーター、CAG プロモーター、プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター、神経細胞特異的 NSE プロモーター、及び β -actin プロモーターから選ばれるいづれかのプロモーターの支配
25 下に連結されている、請求項 5 に記載のベクター。
7. 前記蛋白質が、ウィルスエンベロープ上に存在する糖蛋白質である、請求項 4 又は 6 に記載のベクター。
8. 前記ベクターが、プロテアーゼ阻害剤を含む培養液中で產生されたものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のベクター。
- 30 9. 前記プロテアーゼ阻害剤がカテプシン K 阻害活性を有するものである、

請求項 8 に記載のベクター。

10. 前記ベクターが、 pH 7. 2～pH 8. 0 の培養液中で產生されたものである、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のベクター。

11. 前記ベクターが、血清を含まない培養液中で產生されたものである、
5 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載のベクター。

12. 前記外来遺伝子がプルキンエ細胞障害性疾患の治療用遺伝子又は当該
疾患遺伝子である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のベクター。

13. 前記治療用遺伝子が、GTPase CRAG、ubiquitin chain assembly factor
E4B (UFD2a)、ATPase VCP/p97、HDJ-2、HSDJ 及び BiP を含む分子シャペロン、
10 YAPdeltaC を含む細胞死抑制分子、ER degradation enhancing
alpha-mannosidase-like protein (EDEM) を含む小胞体蛋白質分解促進分子、
CREB/ATF family member OASIS、IRE1、PERK 及び ATF6 を含む ER センサー分子、
スフィンゴミエリナーゼ、AT-mutated (atm)、Reelin、Bcl-2、ネプリライシン、
BDNF、ならびに NGF をコードする遺伝子から選ばれるいずれか 1 つ又は 2 つ以
15 上、あるいは ataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、α 1a 電位依存型カルシウムチャ
ネル、及び PKC γ をコードする遺伝子から選ばれるいずれか 1 つ又は 2 つ以上
の siRNA である、請求項 12 に記載のベクター。

14. 前記疾患遺伝子が、異常伸長した CAG リピートを持つ ataxin-1、
ataxin-2、ataxin-3、huntingtin、及び α 1a 電位依存型カルシウムチャネルコ
20 ードする遺伝子、ならびに変異を持つ PKC γ をコードする遺伝子から選ばれる
いずれか 1 つ又は 2 つ以上である、請求項 11 に記載のベクター。

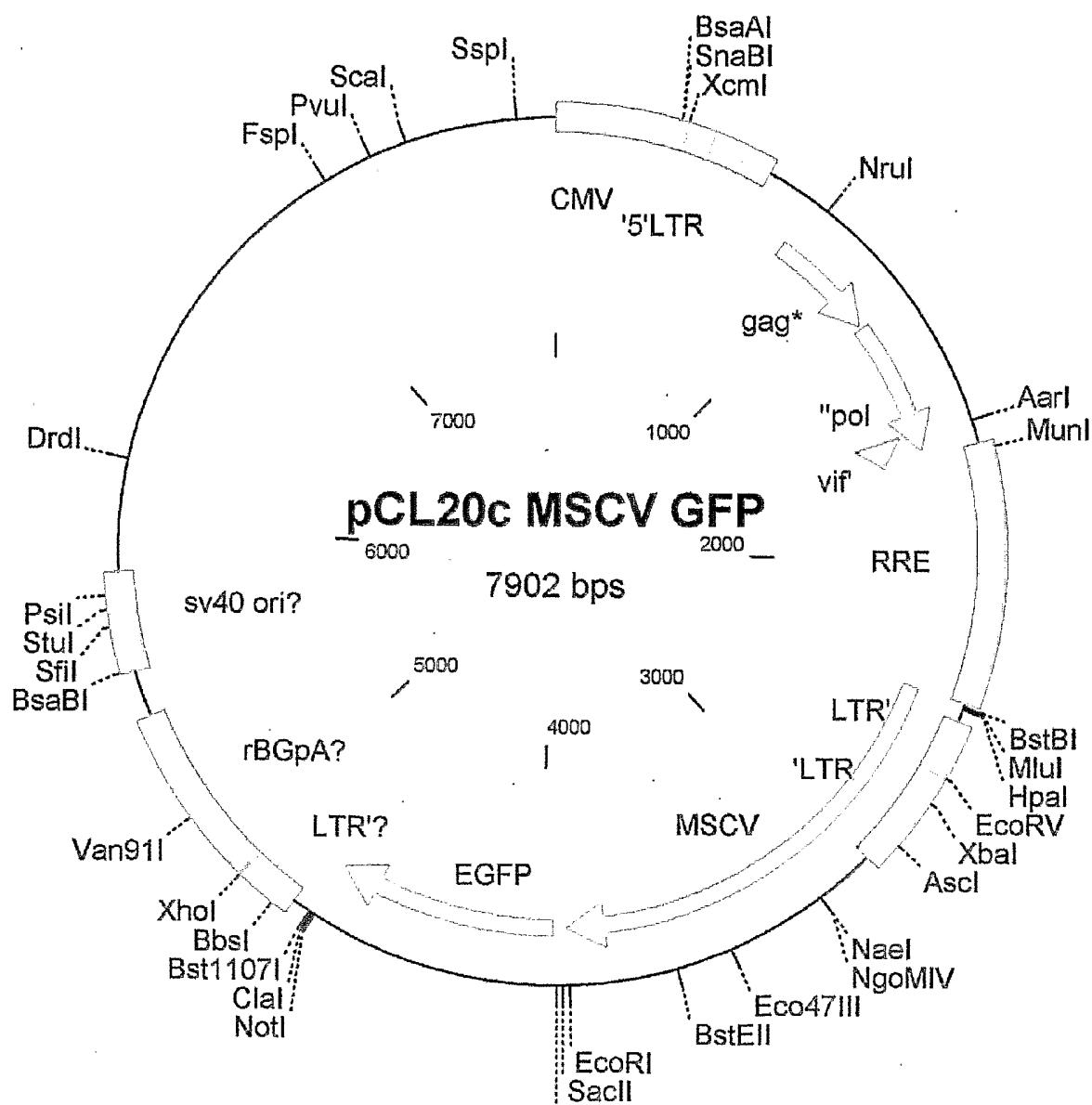
15. 請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、小脳プルキ
ンエ細胞障害性疾患の治療用医薬組成物。

16. 小脳プルキンエ細胞障害性疾患が、脊髄小脳変性症、及びハンチント
ン病を含むポリグルタミン病、ニーマンピック病、毛細血管拡張性運動失調症、
自閉症、アルツハイマー病、胎児アルコール症候群、アルコール中毒、ならび
に加齢性小脳失調から選ばれるいずれかである、請求項 15 に記載の医薬組成
物。

17. 請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載のベクターを導入された非ヒト
30 哺乳動物。

18. 異常伸長した CAG リピートを持つ ataxin-1、ataxin-2、ataxin-3、huntingtin、及び α 1a 電位依存型カルシウムチャネルコードする遺伝子、ならびに変異を持つ PKC γ をコードする遺伝子から選ばれるいずれか 1 つ又は 2 つ以上を導入され、小脳プルキンエ細胞障害性疾患のモデル動物である、請求項 5 17 に記載の非ヒト哺乳動物。
19. ウィルス由来ベクタープラスミドに配列番号 3 又は 4 で示される塩基配列を有する改変型 L7 プロモーターを、外来遺伝子に機能しうる態様で連結するか、あるいはレンチウィルスプラスミドベクターに外来遺伝子を機能しうる態様で連結して宿主細胞に導入し、前記細胞をプロテアーゼ阻害剤を含む培養 10 液中で培養して、ウィルスを産生させることを特徴とする、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクターの作製方法。
20. 前記プロテアーゼ阻害剤がカテプシン K 阻害活性を有するものである、請求項 19 に記載の方法。
21. 前記培養液が pH 7.2 ~ pH 8.0 である、請求項 19 又は 20 に記載の方法。
22. 前記培養液が血清を含まないものである、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。
23. カテプシン K 阻害活性を有する物質を含んで成る、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用培養液。
24. カテプシン K 阻害活性を有する物質と細胞培養液、またはカテプシン K 阻害活性を有する物質を含む細胞培養液を構成要素として含む、プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター作製用キット。

図 1



☒ 2

A

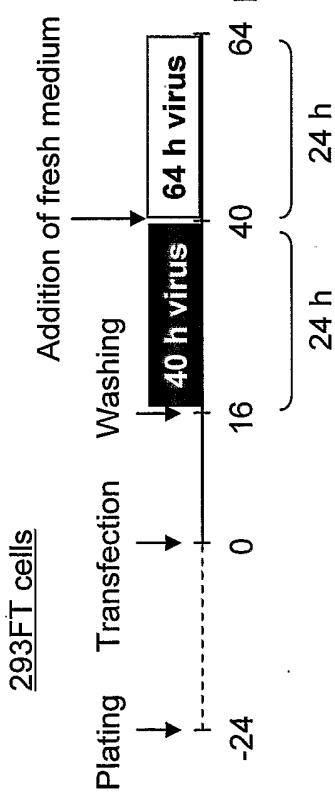
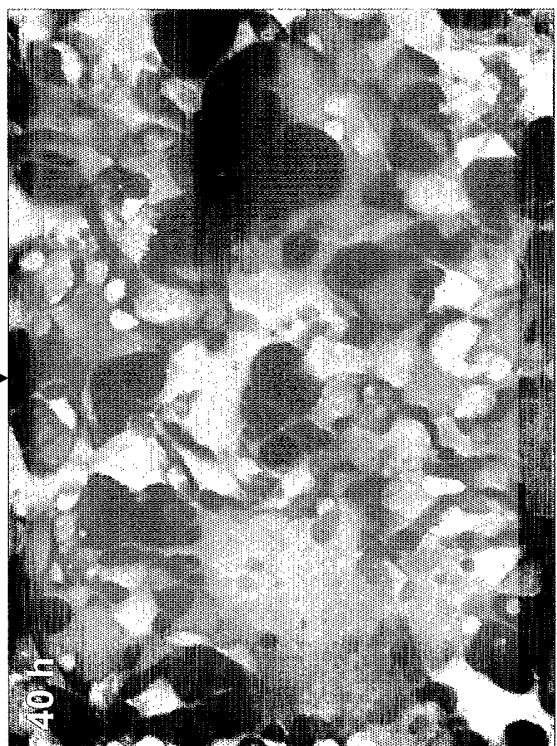
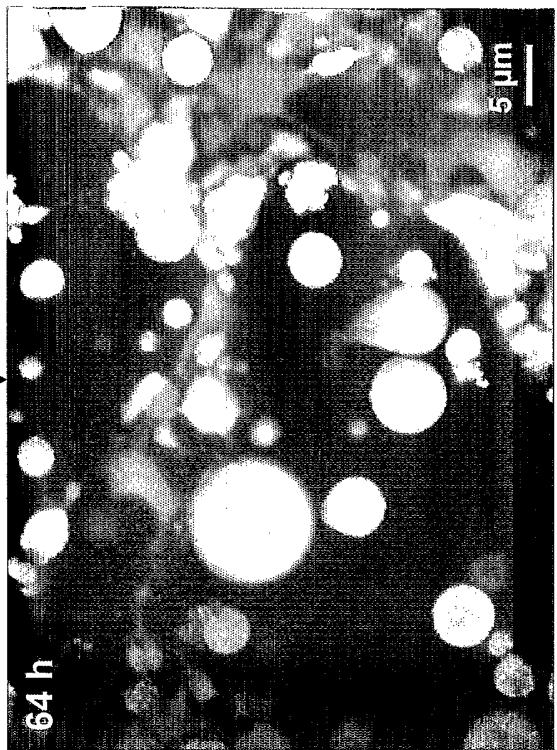
**B****C**

图 3

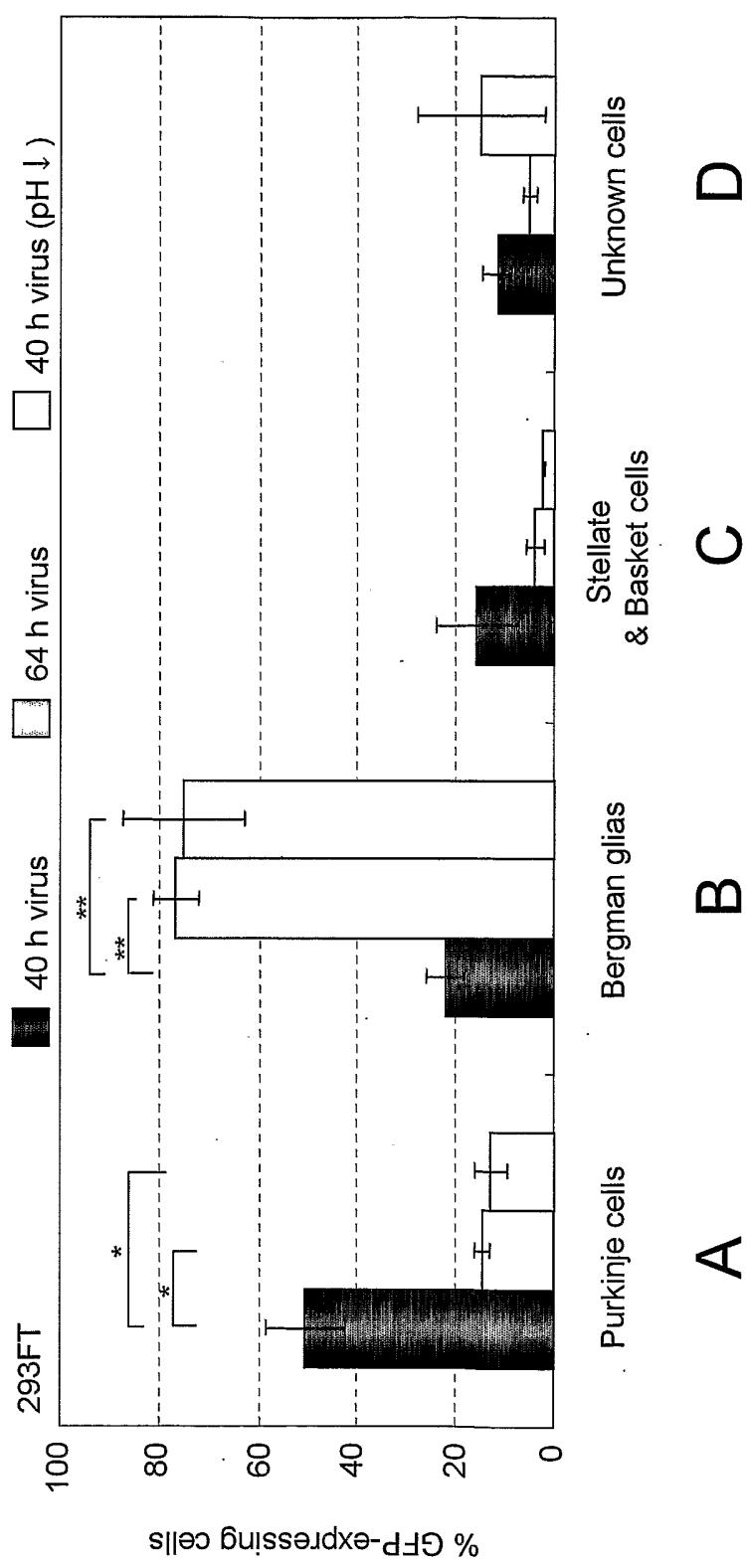
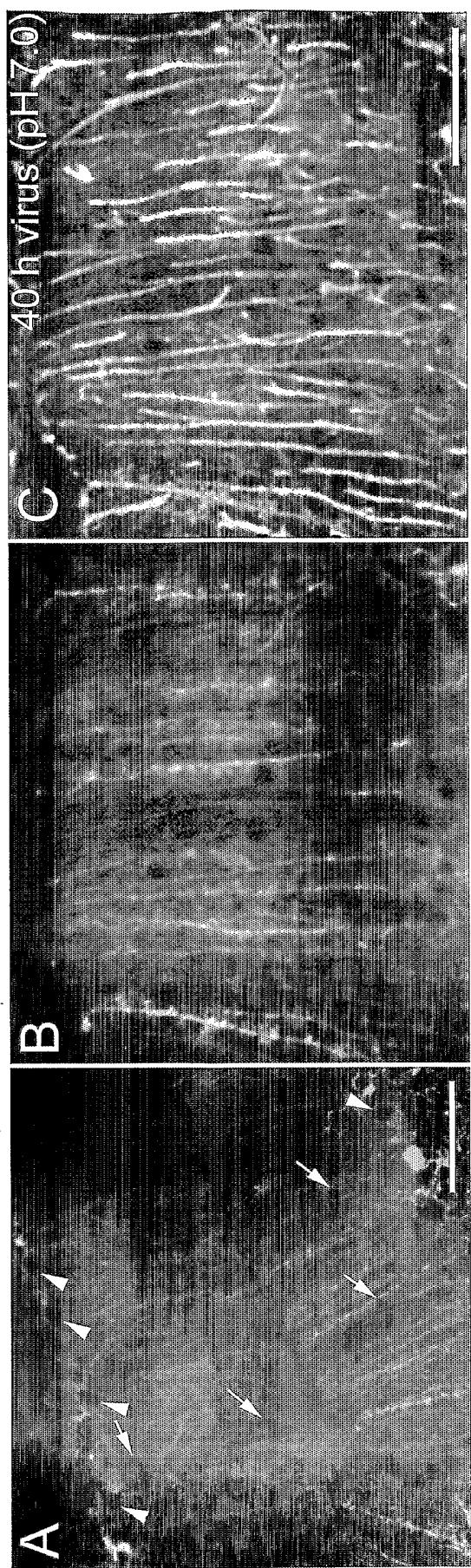
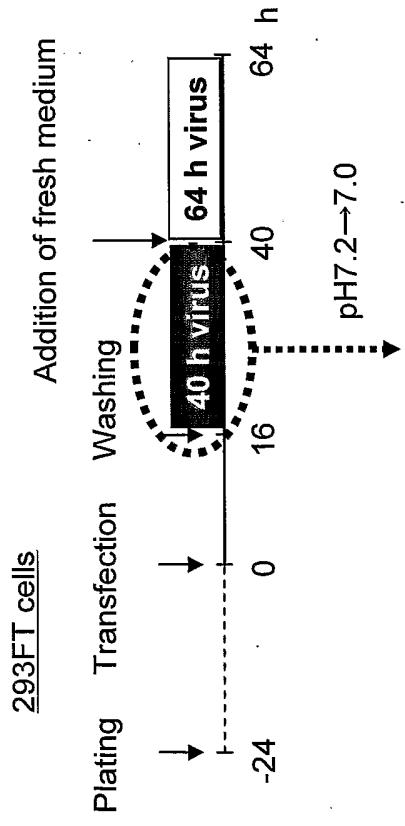
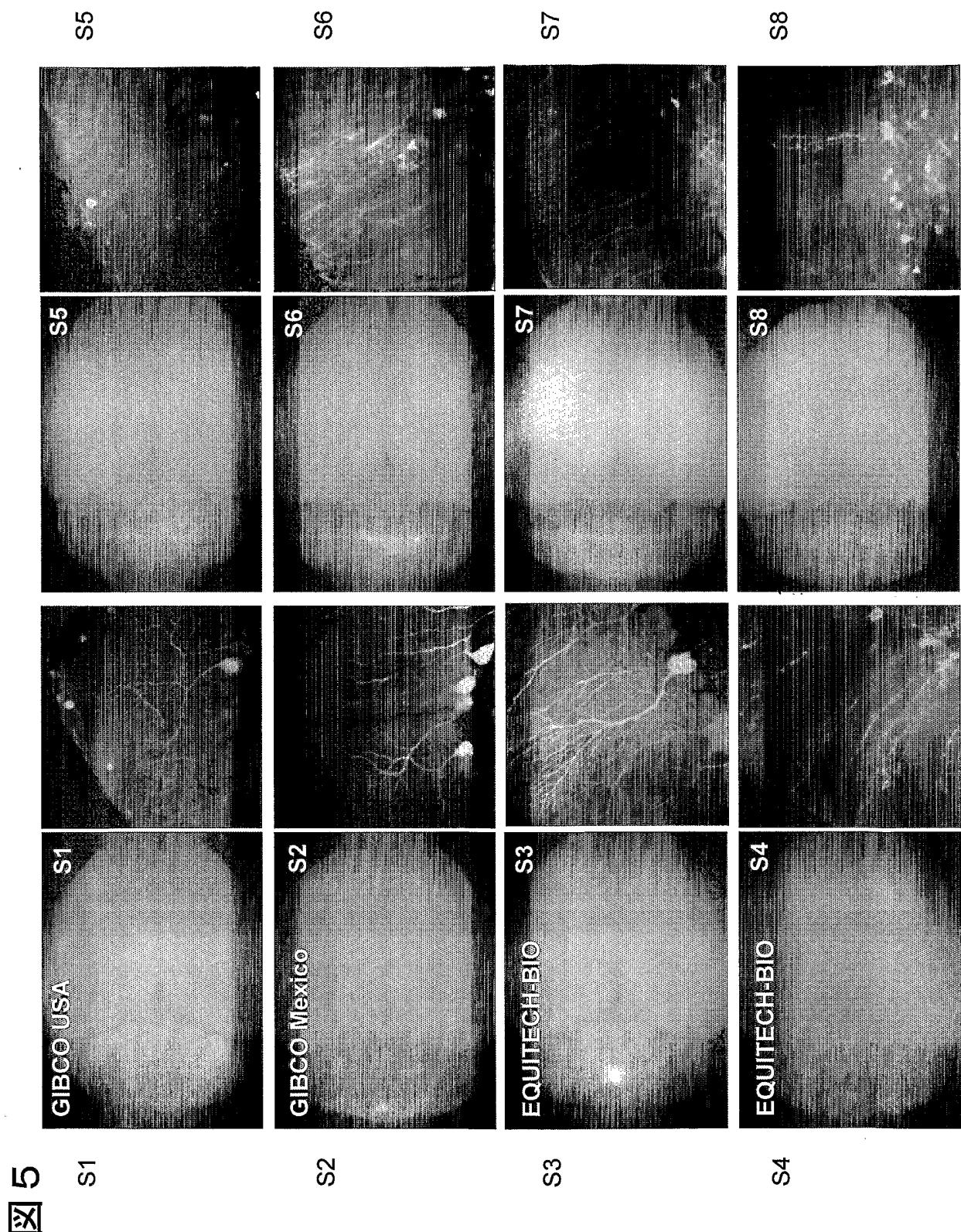


FIG 4





☒ 6

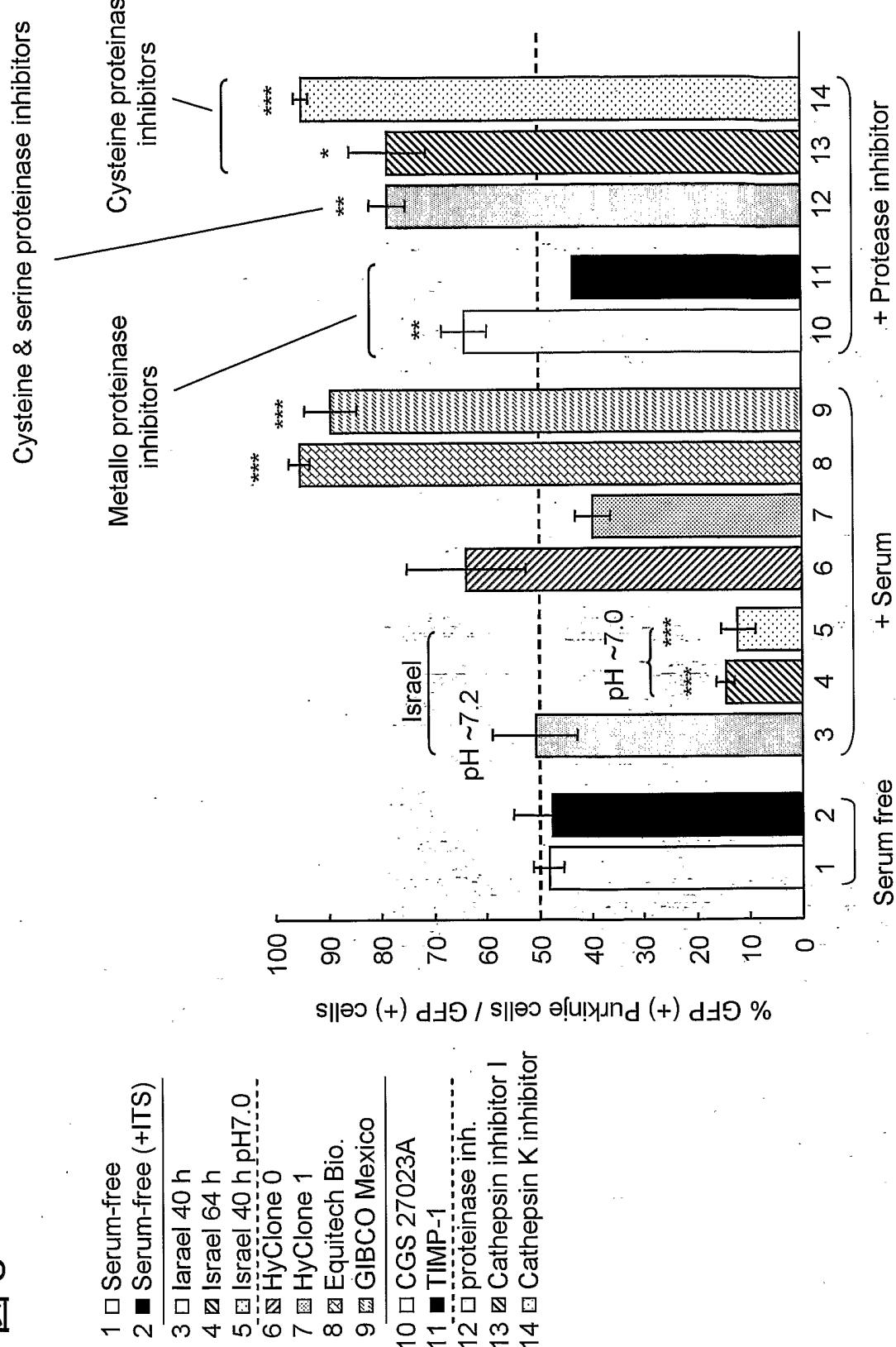


图 7

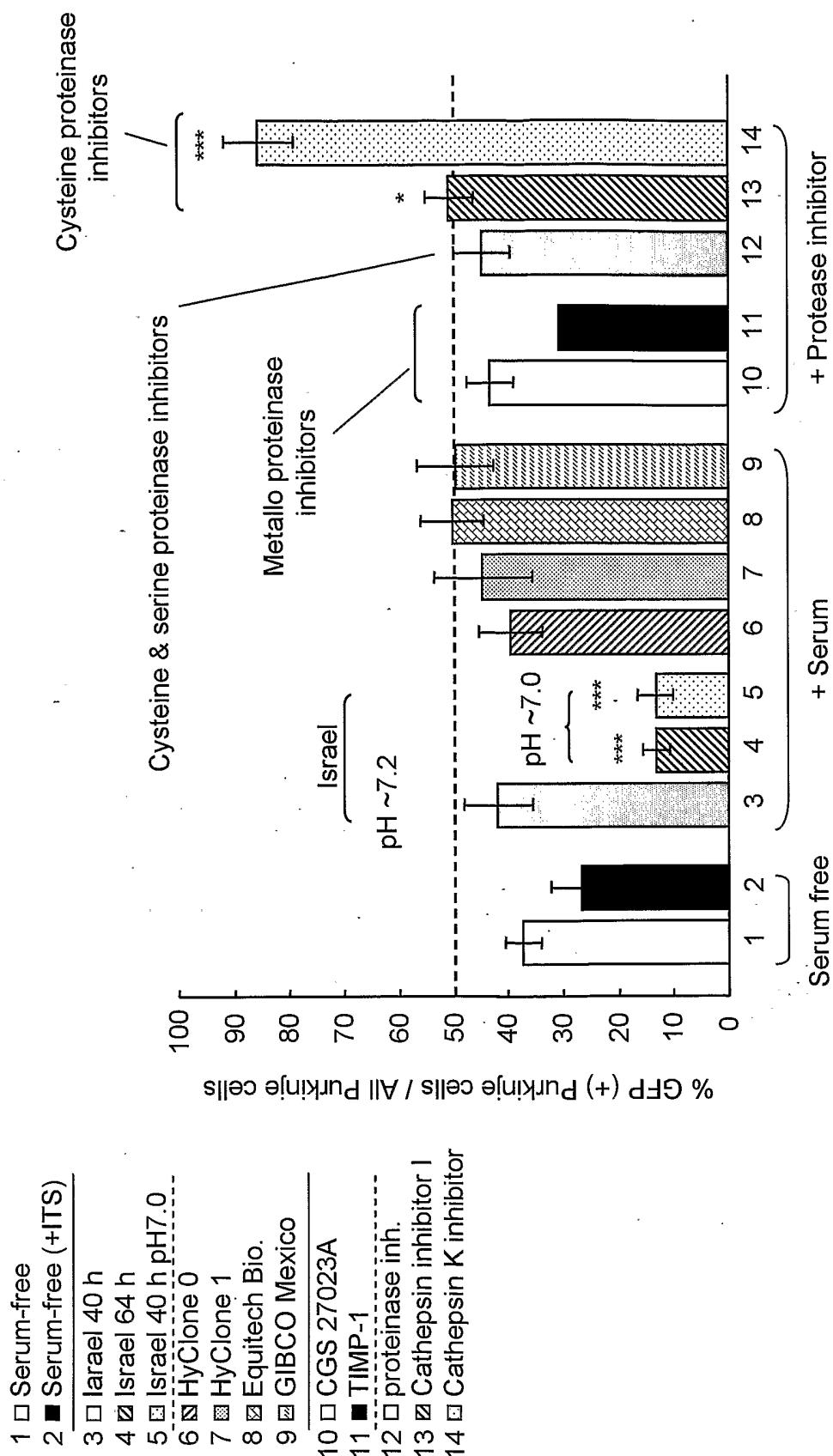
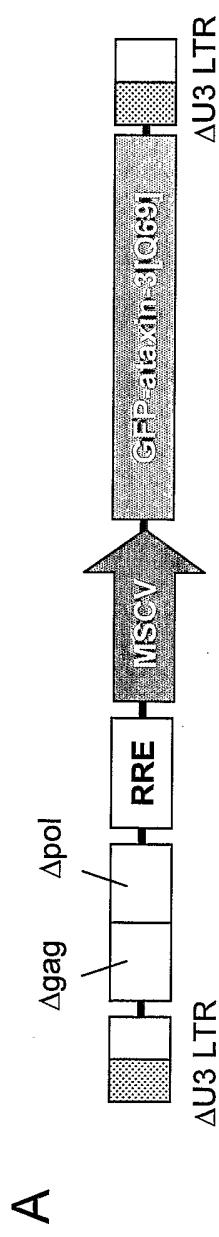
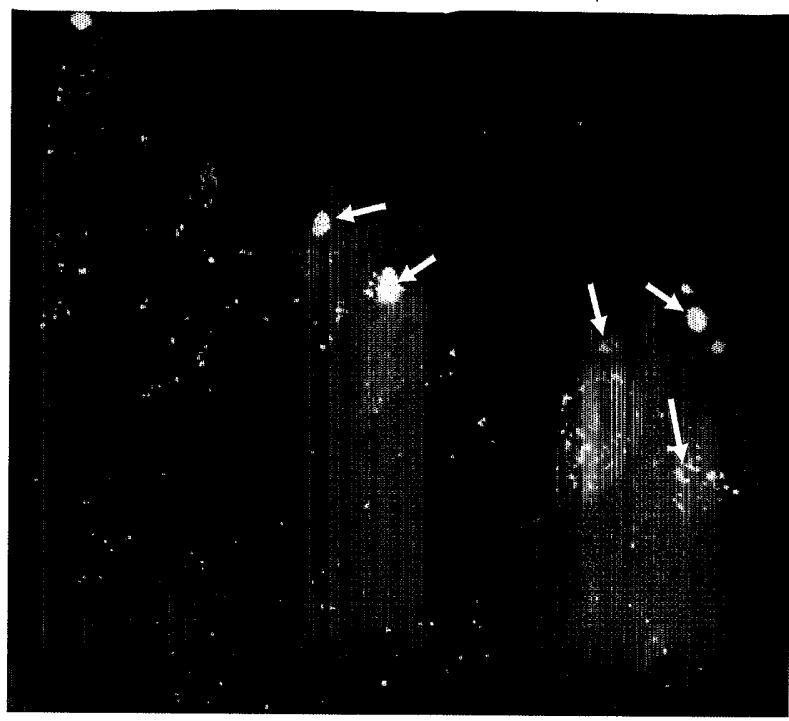
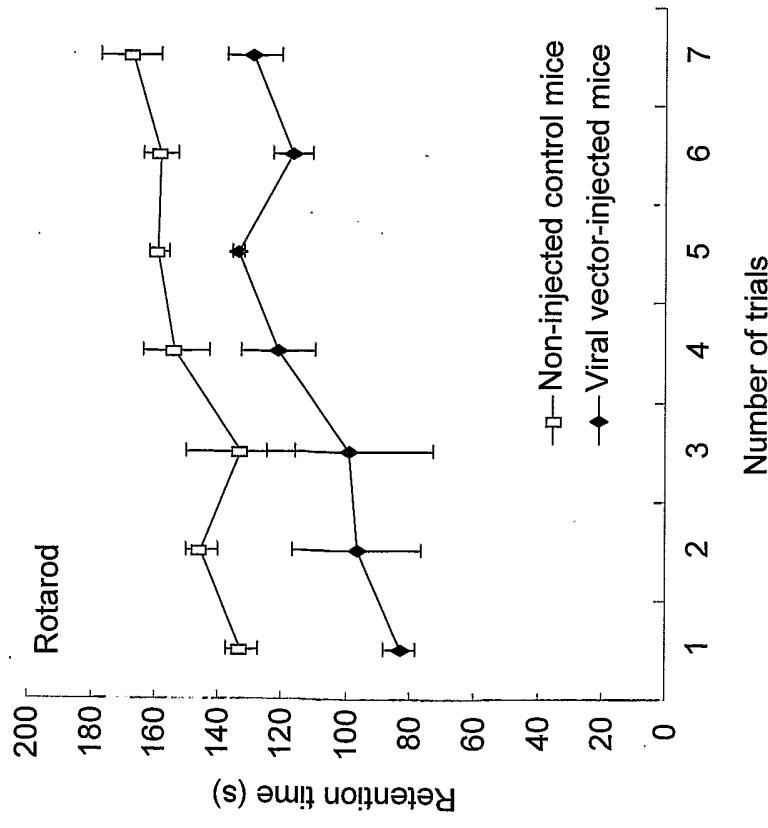


FIG 8

**B**

Aggregation of mutant ataxin-3 protein complex (arrows)

FIG 9

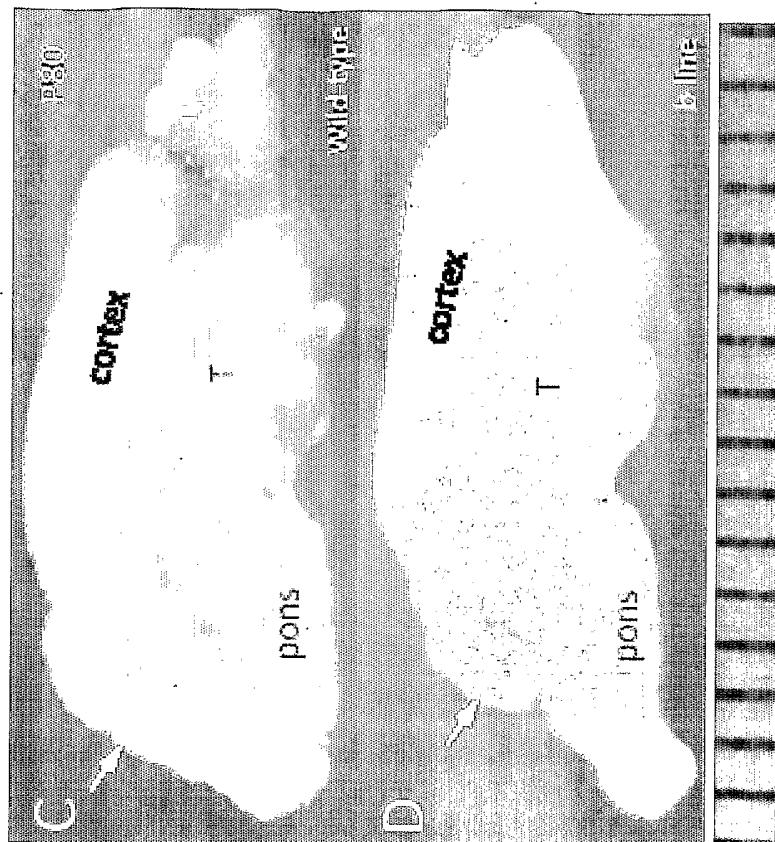
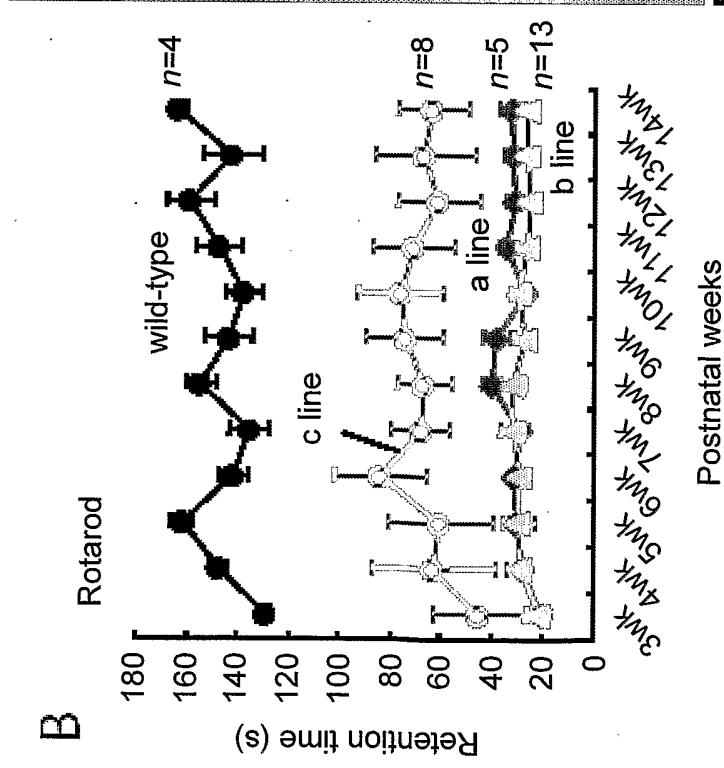
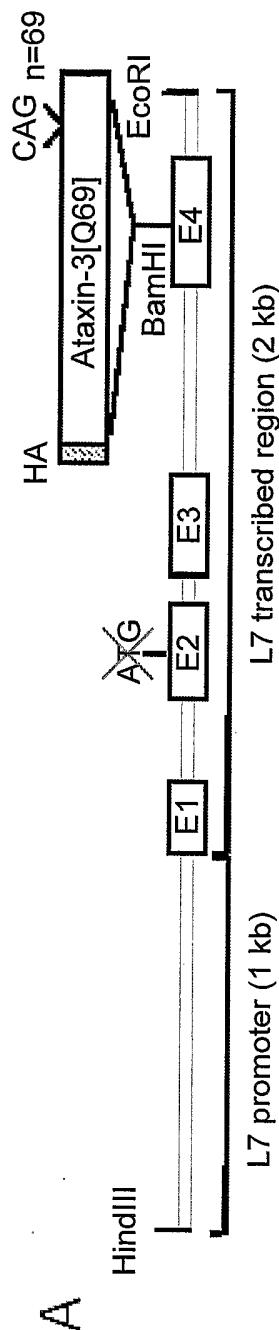


FIG 1 O

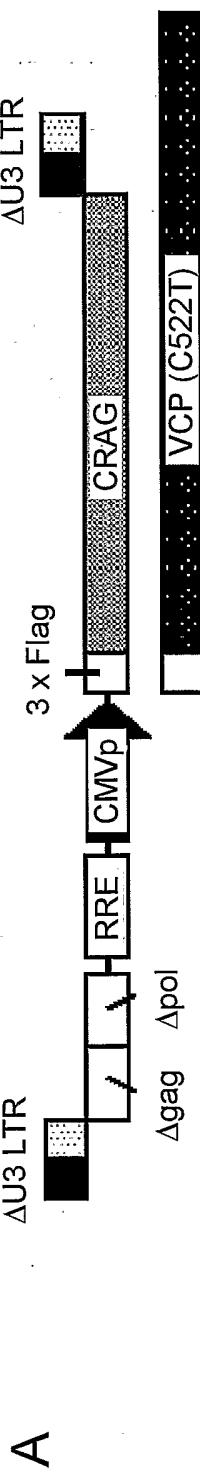
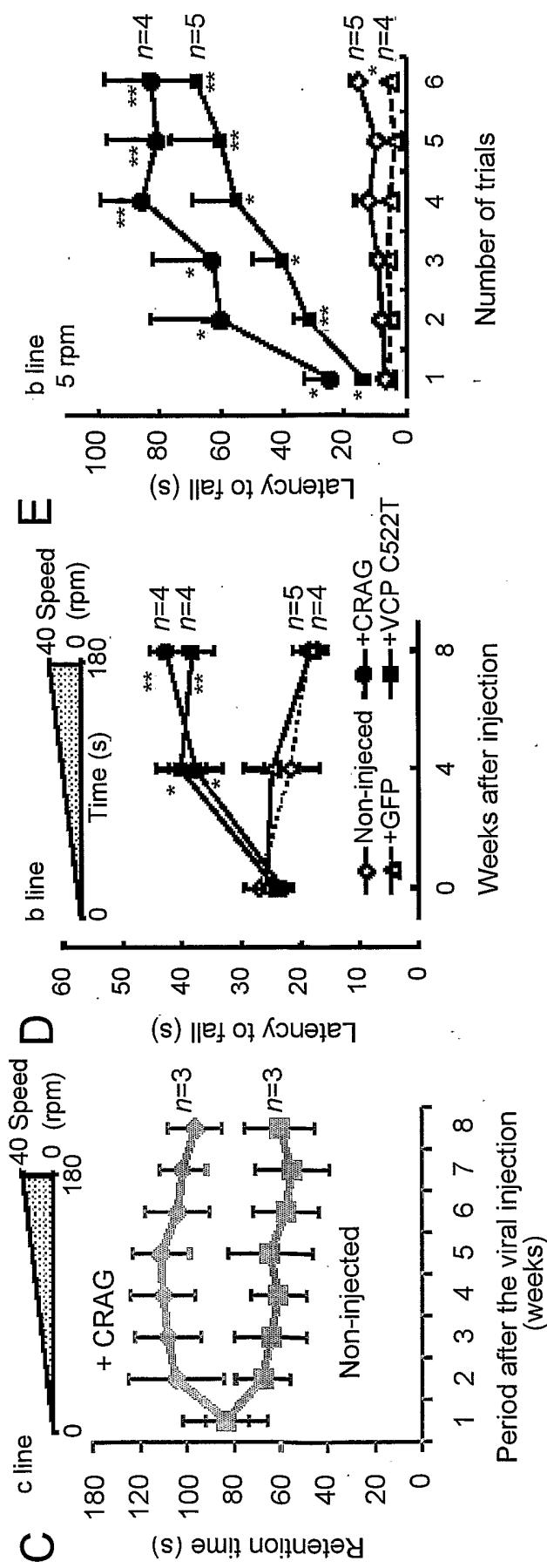
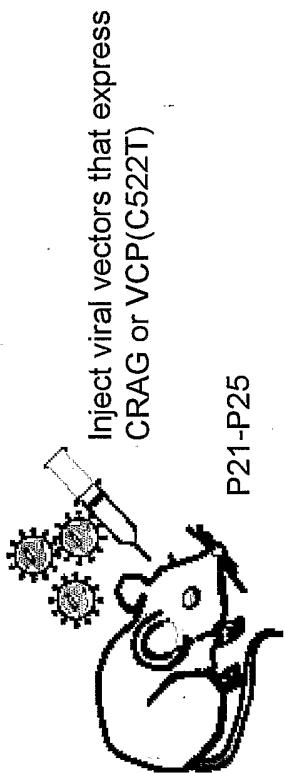
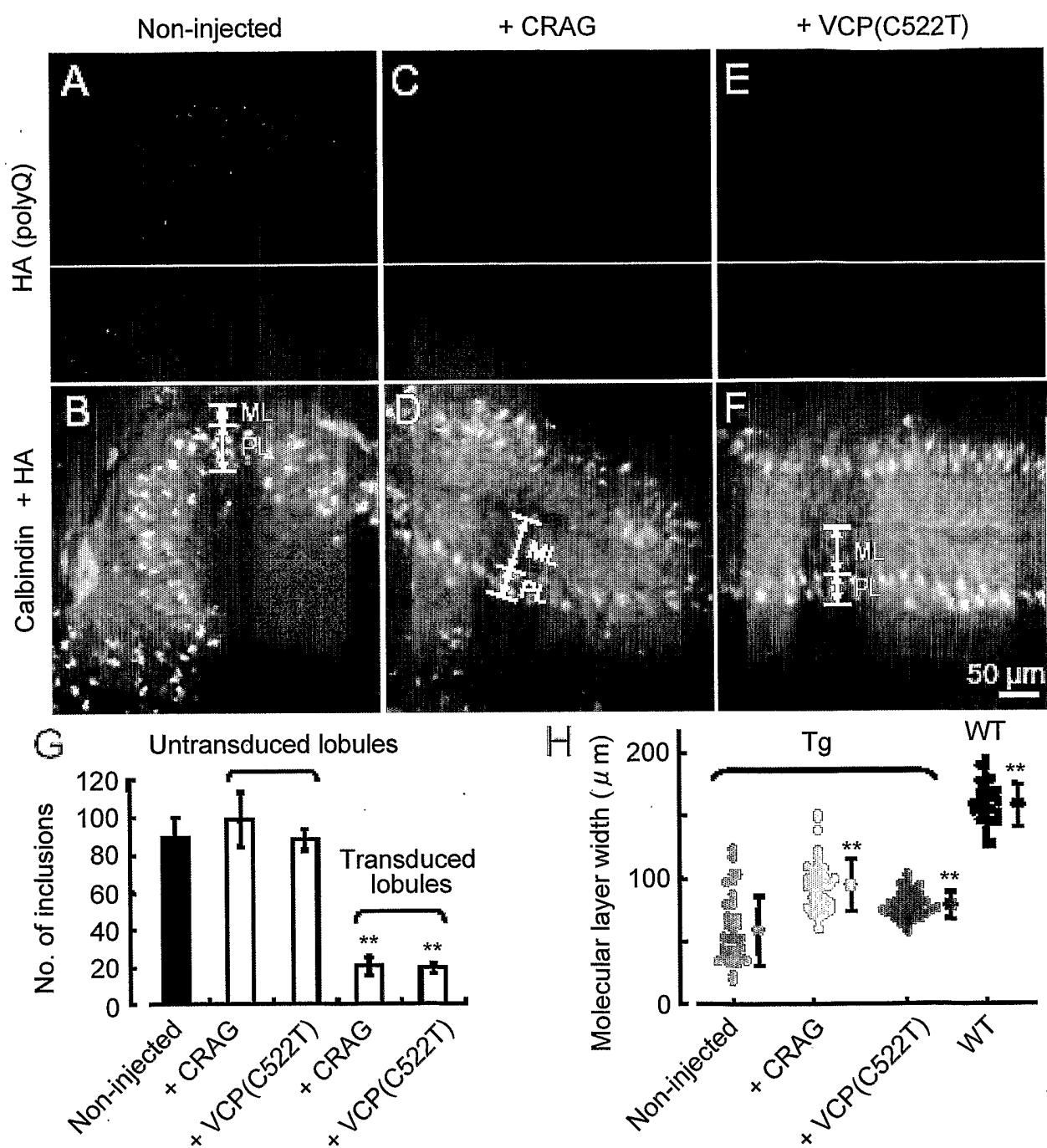
**B**

図 1 1



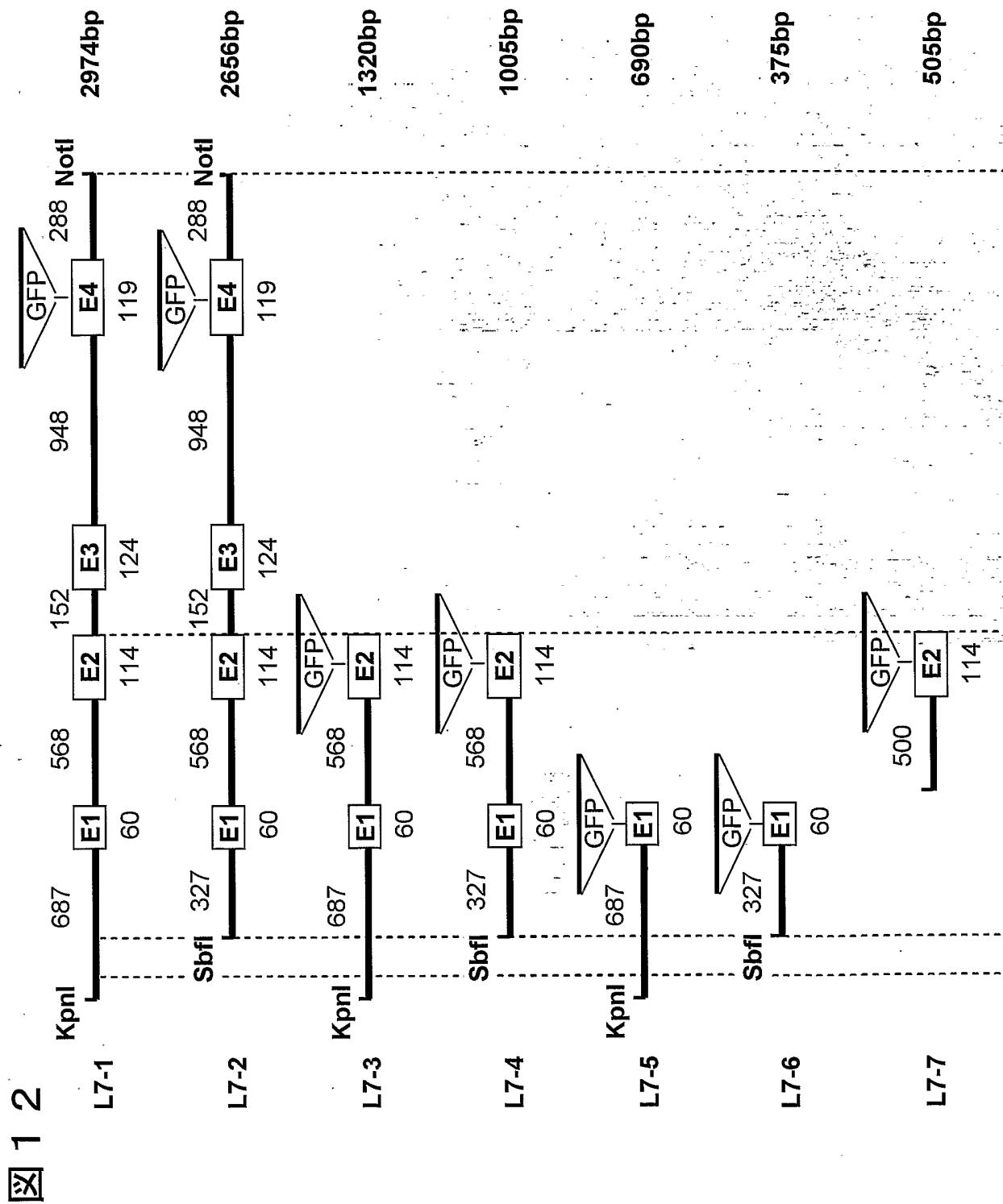


図 13

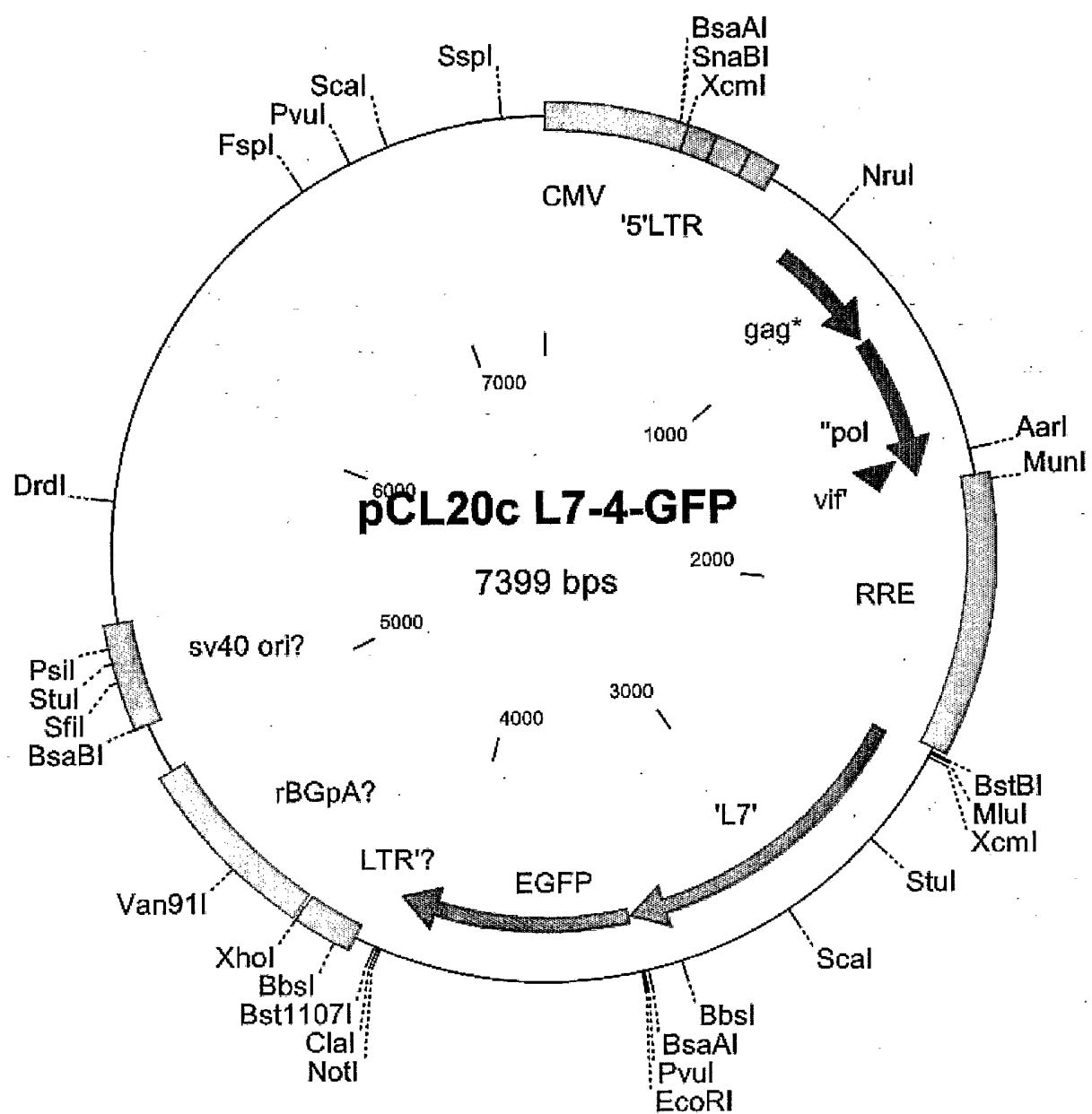


図 1 4

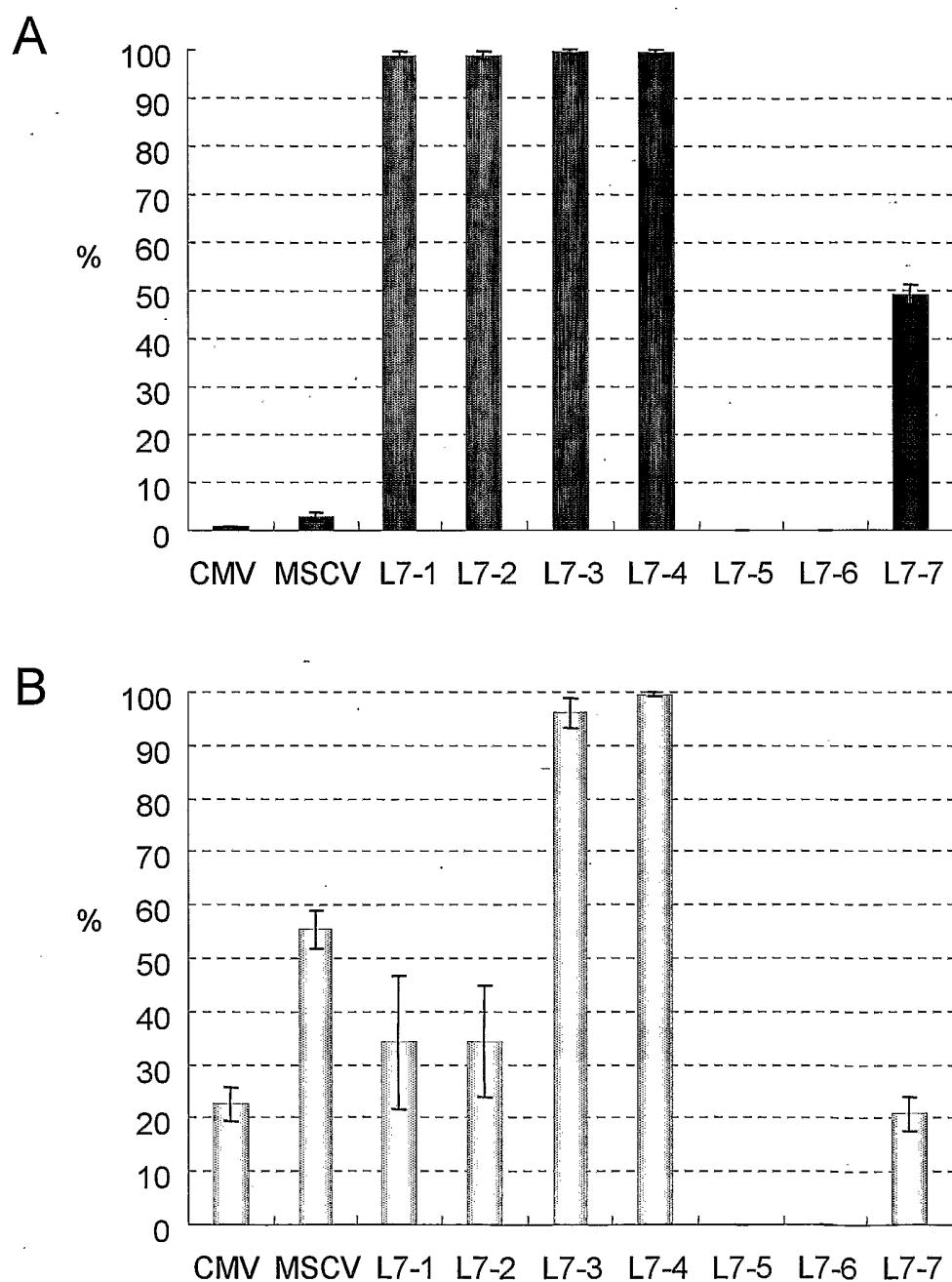


図 15

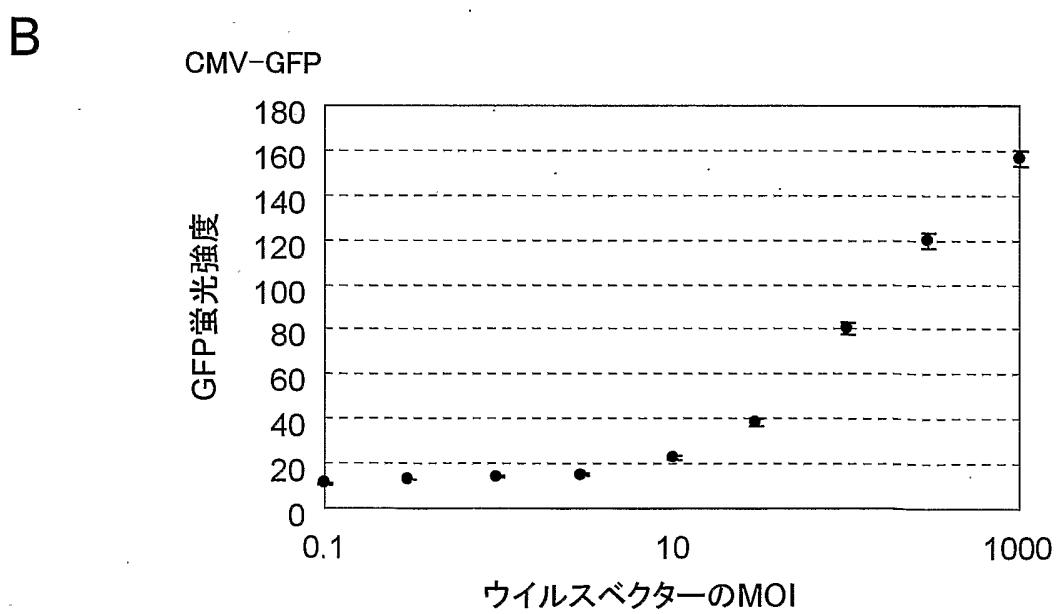
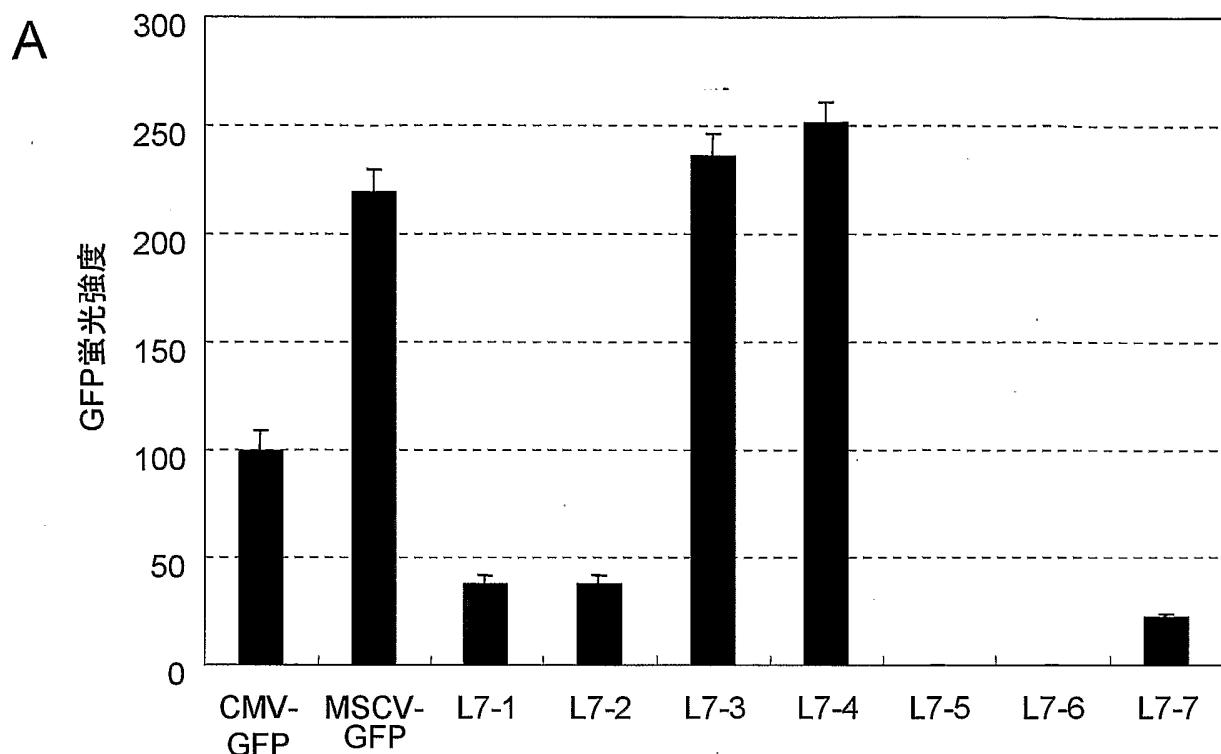


図 16

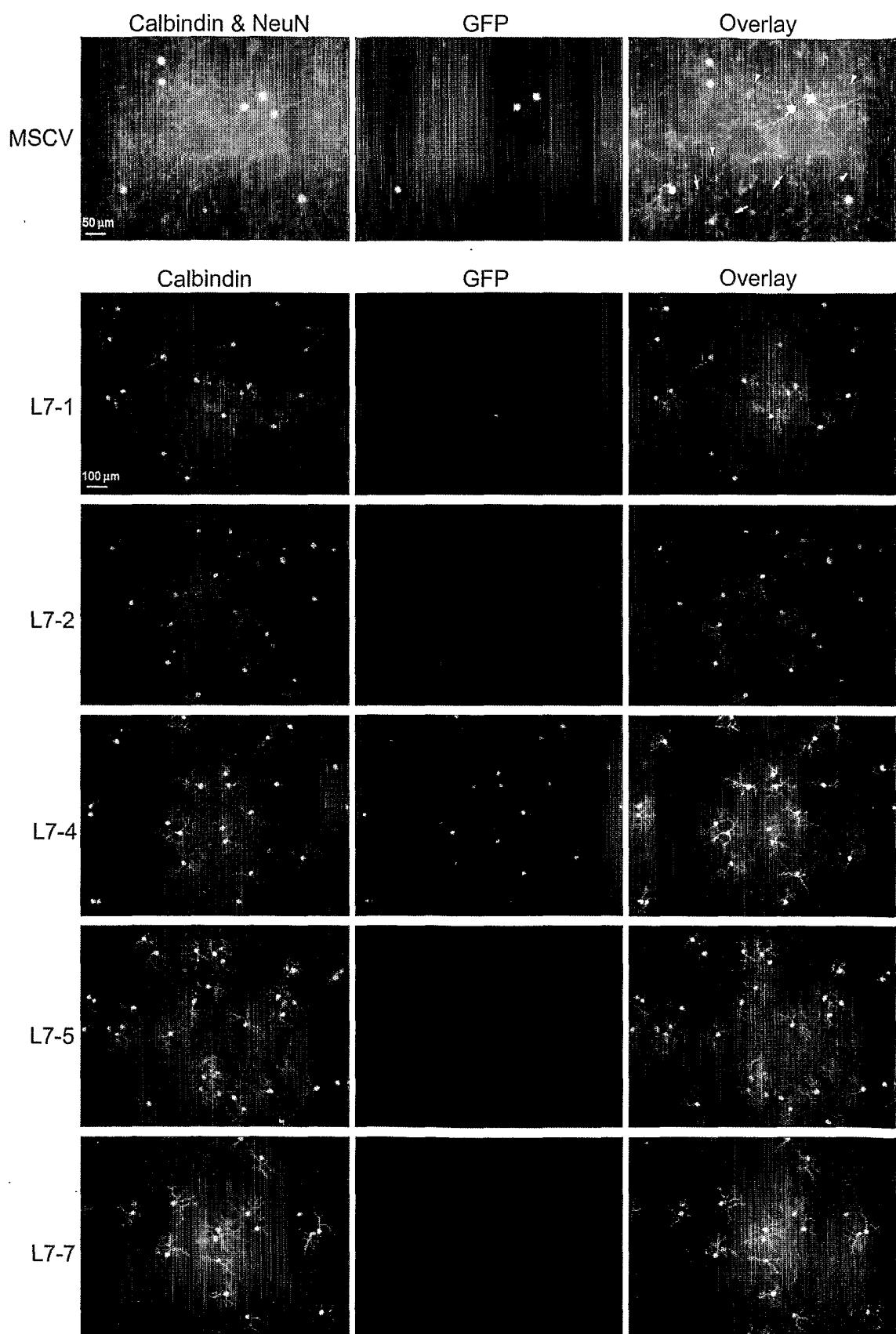
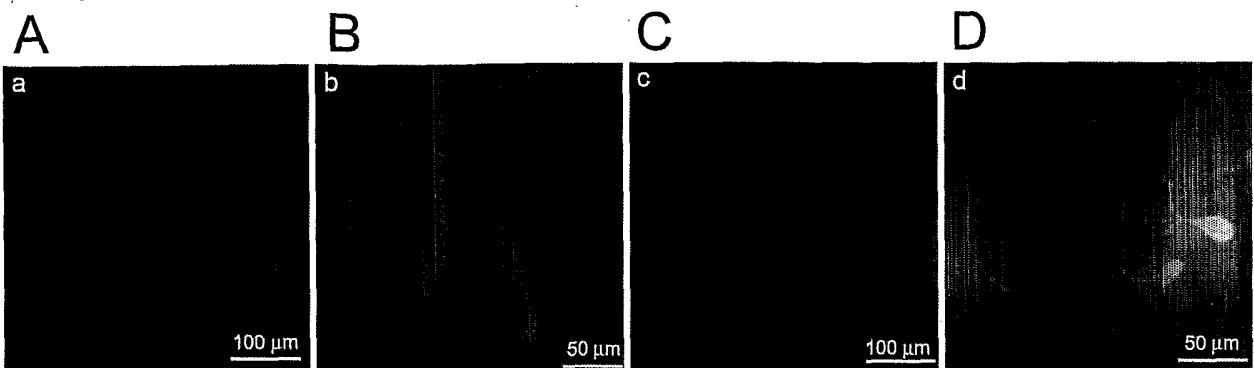
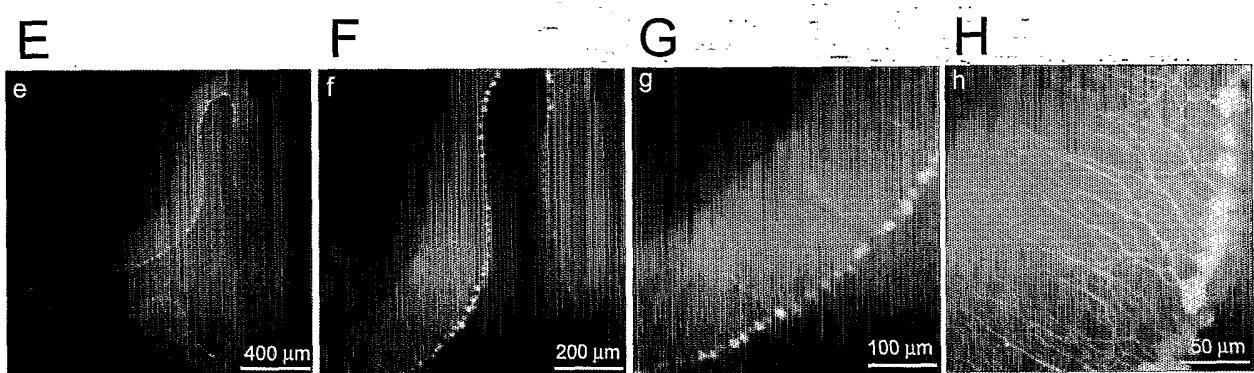


図 1 7

L7-1 promoter



L7-4 promoter



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/055017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</i>		
B. FIELDS SEARCHED <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N15/09, A01K67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/18, A61P25/28, A61P25/32, C12N5/02, C12N7/00</i></p>		
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) <i>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JDream2)</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> Y <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> X	<p>JP 2006-50956 A (Japan Science and Technology Agency), 23 February, 2006 (23.02.06), (Family: none)</p> <p>TORASHIMA T et al., "In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors.", Brain Res., 2006.04.12, Vol.1082, No.1, p.11-22 Epub 2006.03.06</p> <p>JP 2004-506444 A (Cedars-Sinai Medical Center), 04 March, 2004 (04.03.04), & WO 2002/016147 A2 & EP 1311667 A & US 6515197 B1</p>	<p>1-12, 15, 16, 17, 19 13, 14, 18</p> <p>5-11</p> <p>23, 24</p>
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* 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 </small>		<small>"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 </small>
Date of the actual completion of the international search 13 June, 2007 (13.06.07)		Date of mailing of the international search report 26 June, 2007 (26.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/055017

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-504651 A (Amura Therapeutics Ltd.), 09 February, 2006 (09.02.06), Particularly, Par. No. [1808] & WO 2004/007501 A1 & EP 1546150 A1 & US 2006/100431 A1	23, 24
X	WO 2002/096892 A1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 December, 2002 (05.12.02), & US 2004/204368 A1	23, 24
Y	JP 2002-543796 A (Merck Frosst Canada and Co.), 24 December, 2002 (24.12.02), & WO 2000/068414 A2 & EP 1214444 A1 & US 6346373 B1	13-18
P, X P, Y	TORASHIMA T et al., "Exposure of lentiviral vectors to subneutral pH shifts the tropism from Purkinje cell to Bergmann glia"., Eur. J. Neurosci., 2006 Jul, Vol.24, No.2, p.371-380	<u>5-11, 19, 21</u> <u>1-4, 12-18</u>
P, X P, Y	Hirokazu HIRAI, "Shinkei Saibo Sentakuteki na HIV Yurai Lentiviral Vectors no Sakuseiho", Experimental Medicine, 01 December, 2006 (01. 12.06), Vol.24, No.19, pages 2997 to 3001	<u>5-11, 19, 21</u> <u>1-4, 12-18</u>
A	KURSCHNER C et al., "The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron- specific gene expression", Mol. Cell. Biol. (1995) Vol.15, No.1, p.246-254	1-24
A	Hiroshi KIDO et al., "Influenza Virus no Kansen Kanjusei to Kansen Zoki Tokusei o Kimeru Kotai no Protease-gun", The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, 2004, Vol.15, No.4, page 362 to 365	1-24
A	Shizue OOKA et al., "RNA Virus to Tropism to Byogensei", Protein, nucleic acid and enzyme, 2003, Vol.48, No.4, pages 517 to 523	1-24
A	TASHIRO M et al., "Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity", J. Virol. (1992) Vol.66, No.12, p.7211-7216	1-24
A	HAAG L et al., "Acid-induced movements in the glycoprotein shell of an alphavirus turn the spikes into membrane fusion mode", EMBO J. (2002) Vol.21, No.17, p.4402-4410	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2007/055017

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAEMMERER WF et al., "In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors", Mol. Ther. (2000) Vol.2, No.5, p.446-457	1-24
A	AGUDO M et al., "Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using a herpes simplex virus I amplicon", Hum. Gene Ther. (2002) Vol.13, No.5, p.665-674	1-24
A	BOUKHTOUCHE F et al., "Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation", J. Neurosci., 2006.02.01, Vol.26, No.5,p.1531-1538	1-24
P,A	MORIZONO K et al., "Transient low pH treatment enhances infection of lentiviral vector pseudotypes with a targeting Sindbis envelope." Virology, 2006.11.10, Vol.355, No.1, p.71-81, Epub 2006.08.14	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/055017

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P25/32(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2007/055017**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

The common technical feature among the inventions of claims 1-24 resides in "a Purkinje cell-tropic viral vector".

However, the vector is already known, as disclosed in the reference documents 1 and 2 shown below. Therefore, the common technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Therefore, it cannot be considered that the inventions of claims 1-24 are so linked as to form a single general inventive concept through a common special technical feature.

(continued to extra sheet)

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**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2007/055017
--

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Then, lay out the inventions of these claims based on the technical features. The claims of the present application include four inventions classified as follows: (1) claims 1-4; (2) claims 5-18; (3) claims 19-22; and (4) claims 23 and 24.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P25/32(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027, A61K31/7088, A61K35/76, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/18, A61P25/28, A61P25/32, C12N5/02, C12N7/00

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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JDream2)

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
X Y	JP 2006-50956 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006. 02. 23 (ファミリーなし)	1-12, 15, 16, <u>17, 19</u> 13, 14, 18
X	TORASHIMA T et al., "In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors.", Brain Res., 2006. 04. 12, Vol. 1082, No. 1, p. 11-22 Epub 2006. 03. 06	5-11

 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」国際出願目前の出願または特許であるが、国際出願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」国際出願目前で、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 13. 06. 2007	国際調査報告の発送日 26. 06. 2007
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 松田 芳子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8 4 B 3 4 3 5

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
X	JP 2004-506444 A (セダーズーシナイ メディカル センター) 2004. 03. 04 & WO 2002/016147 A2 & EP 1311667 A & US 6515197 B1	23, 24
X	JP 2006-504651 A (アミュラ テラピューティクス リミテッド) 2006. 02. 09, 特に段落【1808】 & WO 2004/007501 A1 & EP 1546150 A1 & US 2006/100431 A1	23, 24
X	WO 2002/096892 A1 (小野薬品工業株式会社) 2002. 12. 05 & US 2004/204368 A1	23, 24
Y	JP 2002-543796 A (メルク フロスト カナダ アンド カンパニー) 2002. 12. 24 & WO 2000/068414 A2 & EP 1214444 A1 & US 6346373 B1	13-18
P, X P, Y	TORASHIMA T et al., "Exposure of lentiviral vectors to subneutral pH shifts the tropism from Purkinje cell to Bergmann glia"., Eur. J. Neurosci., 2006 Jul, Vol. 24, No. 2, p. 371-380	<u>5-11, 19, 21</u> <u>1-4, 12-18</u>
P, X P, Y	平井宏和, "神経細胞選択性な HIV 由来レンチウイルスベクターの作製法", 実験医学, 2006. 12. 01, Vol. 24, No. 19, pp. 2997-3001	<u>5-11, 19, 21</u> <u>1-4, 12-18</u>
A	KURSCHNER C et al., "The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression", Mol. Cell. Biol. (1995) Vol. 15, No. 1, p. 246-254	1-24
A	木戸博ほか, "インフルエンザウイルスの感染感受性と感染臓器特異性を決める個体のプロテアーゼ群", 日本血栓止血学会, 2004, Vol. 15, No. 4, pp. 362-365	1-24
A	大岡静衣ほか, "RNA ウィルスのトロピズムと病原性", 蛋白質 核酸 酵素, 2003, Vol. 48, No. 4, pp. 517-523	1-24
A	TASHIRO M et al., "Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity", J. Virol. (1992) Vol. 66, No. 12, p. 7211-7216	1-24
A	HAAG L et al., "Acid-induced movements in the glycoprotein shell of an alphavirus turn the spikes into membrane fusion mode", EMBO J. (2002) Vol. 21, No. 17, p. 4402-4410	1-24

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
A	KAEMMERER WF et al., "In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors", Mol. Ther. (2000) Vol. 2, No. 5, p. 446-457	1-24
A	AGUDO M et al., "Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using a herpes simplex virus I amplicon", Hum. Gene Ther. (2002) Vol. 13, No. 5, p. 665-674	1-24
A	BOUKHTOUCHE F et al., "Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation", J. Neurosci., 2006. 02. 01, Vol. 26, No. 5, p. 1531-1538	1-24
P, A	MORIZONO K et al., "Transient low pH treatment enhances infection of lentiviral vector pseudotypes with a targeting Sindbis envelope." Virology, 2006. 11. 10, Vol. 355, No. 1, p. 71-81, Epub 2006. 08. 14	1-24

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 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

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とこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-24に係る発明は、「プルキンエ細胞指向性ウイルスベクター」を共通の技術的特徴としている。

しかしながら、そのようなベクターは下記の文献1, 2により公知であるから、この共通の技術的特徴は、特別な技術的特徴とはいえない。

よって、請求の範囲1-24に係る発明は、特別な技術的特徴を有することにより、單一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

そこで、技術的特徴に基づき整理すると、この国際出願の請求の範囲は、(1) 請求の範囲1-4 (2) 請求の範囲5-18 (3) 請求の範囲19-22 (4) 請求の範囲23, 24とに区分される4発明を包含するものである。

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

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立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あったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。