

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-74749

(P2008-74749A)

(43) 公開日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/04	4 B 0 2 4
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P 11/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-254538 (P2006-254538)
 (22) 出願日 平成18年9月20日 (2006.9.20)

(71) 出願人 304026696
 国立大学法人三重大学
 三重県津市栗真町屋町1577
 (74) 代理人 100108280
 弁理士 小林 洋平
 (72) 発明者 保富 康宏
 三重県津市鳥居町191-2鳥居住宅5-52
 (72) 発明者 河野 光雄
 三重県津市観音寺町511大学宿舎C-11
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 DA20 EA04
 GA11
 4C085 AA03 BA09 BA57 CC07 CC08
 DD62 DD63 EE01
 最終頁に続く

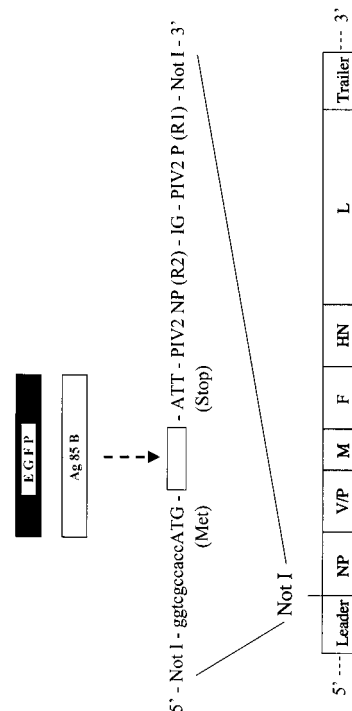
(54) 【発明の名称】 パラインフルエンザ2型ウイルスを用いた医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 パラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)に 抗原等を組み込んだアレルギー性疾患の治療・予防に使用可能な医薬用組成物等を提供すること。

【解決手段】 抗酸菌(例えば、Mycobacterium kansasii)由来の 抗原(抗原85複合体構成蛋白85B)、その類似体(85A、または85Cなど)、それらと同様の機能を有するそれらの変異体をコードする遺伝子をM蛋白質を欠損させたPIV2に組み込んだ医薬用組成物によって達成される。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗酸菌由来の 抗原、その類似体、それらと同様の機能を有するそれらの変異体をコードする遺伝子を M 蛋白質を欠損させた P I V 2 に組み込んだことを特徴とするアレルギー性疾患の予防用または治療用医薬組成物。

【請求項 2】

前記 抗原が、*Mycobacterium kansasii* 由来のものであることを特徴とする請求項 1 に記載のアレルギー性疾患の予防用または治療用医薬組成物。

【請求項 3】

抗原の類似体が、抗原 85 複合体構成蛋白 85 A または抗原 85 複合体構成蛋白 85 C であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のアレルギー性疾患の予防用または治療用医薬組成物。

10

【請求項 4】

アレルギー性疾患が、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、または潰瘍性大腸炎であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のアレルギー性疾患の予防用または治療用医薬組成物。

【請求項 5】

抗酸菌由来の 抗原、その類似体、それらと同様の機能を有するそれらの変異体をコードする遺伝子を M 蛋白質を欠損させた P I V 2 に組み込み、これをヒトを含む哺乳動物に投与することを特徴とするアレルギー性疾患の予防または治療方法。

20

【請求項 6】

前記 抗原が、*Mycobacterium kansasii* 由来のものであることを特徴とする請求項 5 に記載のアレルギー性疾患の予防または治療方法。

【請求項 7】

抗原の類似体が、抗原 85 複合体構成蛋白 85 A または抗原 85 複合体構成蛋白 85 C であることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のアレルギー性疾患の予防または治療方法。

【請求項 8】

アレルギー性疾患が、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、または潰瘍性大腸炎であることを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載のアレルギー性疾患の予防または治療方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、パラインフルエンザ 2 型ウイルス (P I V 2) を用いた医薬組成物等に関するものである。

【背景技術】

【0002】

P I V 2 は、パラミクソウイルス科に属するウイルスである。ゲノムは約 15000 塩基の一本のマイナス鎖 RNA であり、これにヌクレオカプシド蛋白 (N) が結合し、らせん対称ヌクレオプロテイン複合体 (ヌクレオカプシド、RNP) を形成している。ウイルスゲノムがコードするタンパク質のうち、M 蛋白は、ウイルス糖蛋白の細胞質内ドメイン、エンベロープ脂質二重膜および RNP と相互作用し、ウイルス粒子の出芽に重要である。遺伝子組換えにより、M 蛋白を欠失させたウイルスゲノムは、細胞に感染して、所定のウイルスタンパク質を発現するものの、出芽することができない。本発明者は、M 蛋白を欠失させた P I V 2 が、外来タンパク質を標的細胞で発現させるためのベクターとして使用できることを見出した (非特許文献 1)。

40

一方、本発明者は、抗酸菌由来の 抗原が、アレルギー性疾患の予防・治療に効果的であることを見出した (特許文献 1)。

【特許文献 1】国際公開公報 2002/066055

50

【非特許文献1】第52回日本ウイルス学会学術集会、M蛋白欠損パラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)及びマウスIL-4を挿入したPIV2の性状解析、2004年11月21日

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

特許文献1では、抗原をCMVプロモーターおよびTPAシグナルペプチドの下流に組み込んだ発現ベクターp cDNA - - Kとして構築し、アトピー性皮膚炎マウスモデルでの検証を行った。しかしながら、抗原を更に有効に用いるために発現量が多いベクターが求められていた。ここで、PIV2は、ウイルス系のベクターとしては、発現量が多いものの、応用例が少ないことから如何なるタンパク質に応用できるのか未知の点が多かった。

10

本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、PIV2に抗原等を組み込んだアレルギー性疾患の治療・予防に使用可能な医薬用組成物等を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、鋭意検討の結果、M蛋白質を欠損させたPIV2に抗原を組み込んだ発現ベクターが、所定の部位で抗原を発現させることにより、アレルギー性疾患に有効であることを見出し、基本的には本発明を完成させるに至った。

本発明者は、抗酸菌由来の抗原遺伝子をPIV2に組み込んで呼吸器に投与することにより、呼吸器粘膜のみならず他の粘膜(例えば、消化管の粘膜)においても特異的な抗体が発現されることを見出した。抗原遺伝子あるいは抗原蛋白は、Th2型サイトカイン優位の免疫状態を改善し、さらにアレルギー性疾患の諸症状を抑制・改善でき、広くアレルギー性疾患の予防もしくは治療に有効であることは、既に本発明者の検討によって明らかとされていることから(特許文献1)、今回の発明は抗原を更に有効に用いるものとなる。

20

【0005】

こうして、第一の発明に係るアレルギー性疾患の予防用または治療用医薬組成物は、抗酸菌由来の抗原、その類似体、それらと同様の機能を有するそれらの変異体(以下、「抗原等」という)をコードする遺伝子をM蛋白質を欠損させたPIV2に組み込んだことを特徴とする。

30

また、第二の発明に係るアレルギー性疾患の予防または治療方法は、抗酸菌由来の抗原、その類似体、それらと同様の機能を有するそれらの変異体をコードする遺伝子をM蛋白質を欠損させたPIV2に組み込み、これをヒトを含む哺乳動物に投与することを特徴とする。

なお、抗原が、*Mycobacterium kansasii*由来のものであることが好ましい。また、抗原の類似体が、抗原85複合体構成蛋白85Aまたは抗原85複合体構成蛋白85Cであることが好ましい。

また、アレルギー性疾患が、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、または潰瘍性大腸炎であることが好ましい。

40

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、抗原等をコードする遺伝子をM蛋白質を欠損させたPIV2に組み込んだ発現ベクターをアレルギー性疾患患者に投与した場合に、アレルギー性疾患の改善をもたらす極めて有効な効果を発揮することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及

50

ぶものである。

【0008】

本発明に用いるPIV2は病原性が極めて少なく、かつ蛋白質の発現量が多い。このため、そのまま外来蛋白質である抗原等をコードする遺伝子を組み込んだPIV2を調整して、これを用いることも不可能ではない。しかしながら、PIV2のM蛋白質を欠損させることにより、感染および蛋白質の発現は同等に行われるものの、出芽ができないために次世代のPIV2を生産しないという、より安全なPIV2ベクターとなる。このため、本発明においては、M蛋白質を欠損させたPIV2に抗原等をコードする遺伝子を組み込むこととした。抗原等を組み込む場所としては、PIV2ゲノムのいずれの位置でも良いが、アンチセンスウイルスゲノムの5'末端側に組み込むことにより、外来蛋白質の発現量が多くなるので好ましい。アンチセンスPIV2ゲノムは、一本鎖RNAであり、5'末端から3'末端に向かって、リーダー(Leader:プロモーター配列)、NP、V/P、M、F、HN、L、トレーラー(Trailer)という構造を持っている。このため、抗原等をコードする遺伝子は、リーダー(プロモーター配列)の直後、またはNPとV/Pの間等の5'末端側に近い位置であることが好ましい。

10

【0009】

M蛋白質を欠損させるには、M蛋白質をコードする遺伝子部分の全部または一部を取り除く方法、またはM蛋白質をコードする遺伝子のどこかにストップコドンを組み込む方法などが例示される。

本発明において、アレルギー性疾患とは、正常人が反応しない環境抗原・自己抗原などに対して過敏に反応を示し、自己の免疫系により各臓器の破壊、障害を生ずる疾患である。具体的には、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、潰瘍性大腸炎などが含まれるが、本発明の適用はこれらの具体的疾患には限定されない。

20

【0010】

本発明において、抗原とは、抗酸菌に普遍的に存在する蛋白の一つであり、抗原85複合体の一つである抗原85複合体構成蛋白85Bとして同定されたものである。この抗原85複合体は、分子量が30-32kd程度の抗原85複合体構成蛋白85A(Infected.Immun.57:3123-3130,1989)、抗原85複合体構成蛋白85B(J.Bacteriol.170:3847-3854,1988)、および抗原85複合体構成蛋白85C(Infected.Immun.59:3205-3212,1991)から構成され、これらは抗酸菌の主要な分泌蛋白である。これらの分泌蛋白は、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium bovis、Mycobacterium kansasii等の同属の細菌間では、遺伝子・アミノ酸配列が種を超えて高い相同性を示し、モノクローナル抗体に対する交差反応性を示す(Microbiol.Rev.56:648-661,1992)。抗原(抗原85複合体構成蛋白85B)の類似体としては、抗原85複合体構成蛋白85A、抗原85複合体構成蛋白85Cなどが挙げられる。

30

【0011】

本発明において、抗酸菌由来の抗原もしくはその類似体をコードする遺伝子とは、抗原蛋白あるいは抗原85複合体構成蛋白85A、抗原85複合体構成蛋白85Cなどの抗原蛋白の類似体を発現することが可能な遺伝子を指す。具体的には、抗原もしくはその類似体をコードする遺伝子を含む発現ベクターの形態にある遺伝子が挙げられる。抗原をコードする遺伝子としては、Mycobacterium kansasii(Infected.Immun.58:550-556,1990)、Mycobacterium avium(Infected.Immun.61:1173-1179,1993)、Mycobacterium intracellulare(Biochem.Biophys.Res.Comm.196:1466-1473,1993)、Mycobacterium leprae(Mol.Microbiol.6:153-163,1992)などの抗酸菌由来の抗原をコードする遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子のいずれも本発明に用いることができる。これらのうち、Mycobacteriu

40

50

m kansasiiの抗原をコードする遺伝子として、配列番号1に示す390番目～1244番目までの塩基配列を有するDNAが挙げられる。このDNA以外にも、このDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異体DNA、このDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数(好ましくは数個)のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAであって、Mycobacterium kansasii由来の抗原と同様の機能を有する蛋白質をコードする変異体DNAを用いることもできる。Mycobacterium kansasii由来の抗原と同様の機能とは、同様のアレルギー性疾患の予防効果または治療効果を奏することを示している。

【0012】

変異体DNAを得るための具体的方法としては、例えば次の方法が挙げられる。即ち、50%ホルムアミド、4xDenhardt、5xSSPE(SSPE溶液:EDTAリン酸ナトリウム塩(SSPE)、1xDenhardt:0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン)、0.2%SDS、100µg/ml ssDNA、および12.5ngのプロンプ(配列番号1に示す390番目～1244番目までの塩基配列を有するcDNA断片12.5ngを、BcaBest DNA Labeling Kit(Takara)を用いて[-32P]dCTP(Amersham)により標識したもの)存在下で、45℃で14～16時間コロニーハイブリダイゼーションを行った後、フィルターを1xSSPE、0.5%SDS溶液中で45℃にて30分間、その後0.1xSSPE、0.5%SDS溶液中で55℃にて1時間、最後に0.1xSSPE、0.5%SDS溶液中で65℃にて1時間洗浄し、バックグラウンドを落とした後、X線フィルム(Fuji)に-80℃で72時間露出し、対応するコロニーの位置を決定して単離することによって変異体DNAを得ることができる。これらの変異体がコードするアミノ酸配列は、抗原のアミノ酸配列に対して通常60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性を有する。Mycobacterium kansasii以外の抗酸菌由来の抗原をコードする遺伝子の場合にも、同様にそれらの変異体であってもよい。

【0013】

抗原の類似体である抗原85複合体構成蛋白85Aをコードする遺伝子としては、上記した抗原遺伝子についての各種抗酸菌と同様の抗酸菌由来の遺伝子が挙げられる。より具体的には、Mycobacterium tuberculosis由来の抗原85複合体構成蛋白85AをコードするDNAが挙げられる(Infected.Immun.57:3123-3130,1989)。抗原85複合体構成蛋白85Cをコードする遺伝子についても、同様に各種抗酸菌由来の遺伝子が挙げられ、より具体的には、Mycobacterium tuberculosis由来の抗原85複合体構成蛋白85CをコードするDNAが挙げられる(Infected.Immun.59:3205-3212,1991)。これらのDNAについても、上記と同様に、これらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAや、このDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数(好ましくは数個)のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAであって、抗原85複合体構成蛋白85Aあるいは抗原85複合体構成蛋白85Cと同様の機能を有する蛋白質をコードする変異体を用いることができる。

【0014】

上記DNAは、前記文献に記載されている配列情報、Genbank等の配列情報等に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、抗酸菌由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、クローニングすることができる。また、アミノ酸配列情報に基づき化学合成することもできる。上記DNAの変異体は、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができる。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明では、アレルギー性疾患の予防もしくは治療に抗酸菌由来の 抗原蛋白、その類似体である抗原 85 複合体構成蛋白 85 A もしくは抗原 85 複合体構成蛋白 85 C そのもの、あるいはそれらの変異体蛋白を用いることもできる。このような 抗原としては、上記した 抗原をコードする遺伝子によってコードされる蛋白質が挙げられる。具体的には、例えば配列番号 1 に示した *Mycobacterium kansasii* 由来の塩基配列を有する DNA によってコードされる 抗原であって配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有する 抗原が挙げられる。このアミノ酸配列を有する 抗原以外にも、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して 1 若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であって該 抗原と同様の機能を有する変異体蛋白質であってもよい。*Mycobacterium kansasii* 以外の抗酸菌由来の 抗原の場合にも、同様にそれらのアミノ酸配列に対して 1 若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であって該 抗原と同様の機能を有する変異体蛋白質であってもよい。また、抗原 85 複合体構成蛋白 85 A もしくは抗原 85 複合体構成蛋白 85 C についても、*Mycobacterium tuberculosis* 由来の抗原 85 複合体構成蛋白 85 A (Infect. Immun. 57: 3123 - 3130, 1989)、*Mycobacterium tuberculosis* 由来の抗原 85 複合体構成蛋白 85 C (Infect. Immun. 59: 3205 - 3212, 1991) などが挙げられる。これらの 抗原蛋白の類似体についても、 抗原蛋白の変異体と同様の変異体であってもよい。

【0016】

このような蛋白質は、それをコードする遺伝子を用いた組換え DNA 法により製造することもでき、また化学合成によって製造することもできる。あるいは、*Mycobacterium kansasii* などの抗酸菌を適当な培地で培養し、その培養液から公知の精製法によって精製して得ることもできる (Scand. J. Immunol. 43: 202 - 209, 1996; J. Bacteriol. 170: 3847 - 3854, 1988; Hiroshima J. Med. Sci. 32: 1 - 8, 1983)。

本発明において、アレルギー性疾患の予防もしくは治療に、抗酸菌由来の 抗原、その類似体またはそれらの変異体をコードする遺伝子を用いる場合には、具体的には、抗酸菌由来の 抗原、その類似体またはそれらの変異体をコードする遺伝子を含む P I V 2 の形態で用いられる。組換え P I V 2 は、予め M 蛋白質を欠失させた P I V 2 ゲノムを用いることができる。M 蛋白質欠失 P I V 2 ゲノムに 抗原等をコードする遺伝子を組み込むことにより、 抗原等を発現する P I V 2 ベクターが構築される。

【0017】

この発現ベクターは、通常、噴霧剤・経口剤・経粘膜剤・注射剤などの形態としてヒトを含む哺乳動物に投与できる。各剤は常法により調製することができる。例えば、適切な溶剤 (P B S 等の緩衝液、生理食塩水等) に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。各剤には、必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。こうして得られた発現ベクターをアレルギー性疾患の治療に用いるためには、通常の方法によって投与することができる。

【0018】

抗原等をコードする遺伝子を含む発現ベクターは、通常ヒトを含む哺乳動物の皮膚、粘膜、筋肉、腹腔等に投与される。投与量としては、投与形態、投与方法、対象患者、疾患の種類などにより変動し得るが、通常、発現ベクターとして、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個のウイルス、好ましくは約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個のウイルスであり、通常数ヶ月に亘って 1 日 1 回、合計 2 ~ 3 回投与するのが好ましい。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0019】

実施例 1 < M 蛋白欠失アンチセンス r P I V 2 ゲノムの構築 >

図 1 には、M 蛋白質をコードする遺伝子の所定の位置にストップコドンを組み込んだア

ンチセンス r P I V 2 ゲノムの概要を示した。図 1 には、 1 1 9 (M 蛋白遺伝子の 2 5 9 位の A A G を T A G としたもの) および 2 8 9 (M 蛋白遺伝子の 8 9 位の A T G を T A G、2 5 9 位の A A G を T A G としたもの) の 2 種類 M 蛋白質欠損 P I V 2 (それぞれ、r P I V 2 (1 1 9)、および r P I V 2 (2 8 9)) アンチセンス r P I V 2 ゲノムを T7 プロモーターの下流に cDNA として組み込んだプラスミドベクターの様子を示した。M 蛋白を欠損させた P I V 2 を構築するには、当業者に公知の遺伝子手法 (例えば、P C R 法) を用いることができる。

【 0 0 2 0 】

実施例 2 < r P I V 2 の調製方法 >

次に、T7 プロモーターの下流に挿入したアンチセンス r P I V 2 ゲノム cDNA を含むプラスミドからのウイルス粒子の回収方法について説明する。図 2 には、その方法の概要を示した。図 1 のようにして構築したアンチセンス r P I V 2 ゲノム (r P I V 2、r P I V 2 (2 8 9)、r P I V 2 (1 1 9)) を T 7 R N A ポリメラーゼを発現する細胞 (例えば、B S R - T 7 / 5) にトランスフェクションした。このとき、P I V 2 ポリメラーゼユニット (すなわち、N P 蛋白、P 蛋白、L 蛋白) を発現するベクターである P I V 2 - N P、P I V 2 - P、P I V 2 - L の 3 種類の発現ベクターを共にトランスフェクションした。なお、D N A のトランスフェクションには、当業者に周知の方法を用いることができる (本実施形態では、リポフェクトアミンを用いた) 。

10

【 0 0 2 1 】

4 8 時間毎に V e r o 細胞との共培養を 5 ~ 7 回行ったところ、細胞変性効果 (C y t o p a t h i c e f f e c t : C P E) が 9 0 % 以上の効率で確認された。このとき、r P I V 2 では、上清中に大量の組換えウイルス粒子が認められたが、r P I V 2 (2 8 9) および r P I V 2 (1 1 9) では、ほとんど組換えウイルス粒子が確認されなかった。これは、M 蛋白質を欠損すると、P I V 2 の出芽が行われなことを示している。

20

そこで、V e r o 細胞に代えて、P I V 2 - M を発現する C o s 細胞 (M 蛋白を発現するベクターである P I V 2 - M をトランスフェクションした C o s 細胞) を用いて共培養した。その結果、r P I V 2 (2 8 9) および r P I V 2 (1 1 9) についても、上清中に大量の組換えウイルス粒子が認められた。

なお上記では、T7 プロモーターを用いた r P I V 2 の調製方法について説明したが、本発明によれば、いずれのベクター (ファージベクター、プラスミドベクターなど) を用いて調製した r P I V 2 であっても使用することができる。

30

【 0 0 2 2 】

実施例 3 < 抗原をコードする遺伝子を含む r P I V 2 の構築 >

配列番号 1 に示した 3 9 0 番目 ~ 1 2 4 4 番目の塩基配列からなる M y c o b a c t e r i u m k a n s a s i i の抗原遺伝子 (- K) を M 蛋白欠損 r P I V 2 の N o t I 部位に挿入することにより、抗原遺伝子を組み込んだ M 蛋白欠損 r P I V 2 (以下、「r P I V 2 - K」、または「P I V 2 A g 8 5 B」という) を構築した (図 3 を参照)。N o t I 部位は r P I V 2 ゲノムのリーダー配列の直後に組み込まれたものであり、アンチセンス r P I V 2 ゲノムの 5 ' 末端付近に設けられている。なおコントロールとして、N o t I 部位に E G F P (オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質) 遺伝子を組み込んだ r P I V 2 (以下、「r P I V 2 - E G F P」という) を構築した。

40

実施例 2 の方法により、r P I V 2 - K および r P I V 2 - E G F P を大量に調製した。

【 0 0 2 3 】

実施例 4 < ハムスターにおける E G F P の発現確認 >

ハムスターに r P I V 2 - E G F P を経鼻投与 (I N : 5×10^5 ウイルス) したところ、気道および肺の上皮細胞において、E G F P の蛍光が確認された。このことから、r P I V 2 は経鼻投与により、気道や肺に極めて高い外来遺伝子の発現を促すことが分かった。

実施例 5 < マウスを用いた卵白アルブミン感作に対する効果確認 >

50

4群(6匹/群)のBALB/Cマウスに、一匹あたり500 μ lのリン酸緩衝液-生理食塩水(PBS)に卵白アルブミン(OVA)10 μ gとAlum(水酸化アルミニウム)1mgを溶かした溶液を実験開始1日目及び14日目に腹腔内投与(IP)による免疫を行い、21日目から5日間エアロゾルにて5%-OVA(PBS)溶液を吸入させ、喘息モデルを作製した。各群については、下記それぞれの処置を施した。

【0024】

1群:PBS(IP)-PBS(IN):上記喘息モデルを作製する際に、OVAに代えて、一匹あたり500 μ lのPBSにAlum1mgを溶かした溶液をIPした。また、実験開始-20日目(OVA感作の前日)にそれぞれ20 μ lのPBSをINした。

2群:OVA(IP)-PBS(IN):実験開始-20日目(OVA感作の前日)に20 μ lのPBSを経鼻投与(IN)した。

3群:OVA(IP)-PIV2(IN):実験開始-20日目(OVA感作の前日)に1 \times 10⁷ウイルス/20 μ lのrPIV2をINした。

4群:OVA(IP)-PIV2Ag85B(IN):実験開始-20日目(OVA感作の前日)に1 \times 10⁷ウイルス/20 μ lのrPIV2-KをINした。

各群については、実験開始から25日目に、血清中OVA特異的IgE濃度(OVA-specific IgE)、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数(Total cell)、総タンパク濃度(Total protein)、インターロイキン5濃度(IL-5)、及びインターロイキン13濃度(IL-13)を測定した。また、肺組織における好酸球を染色(メイギムザ染色)し、顕微鏡にて細胞数を測定した。

【0025】

結果を図4~図9に示した。図4~図8に示すように、第2群または第3群においては、血清中OVA特異的IgE濃度、BALF中の総細胞数、総タンパク濃度、IL-5、及びIL-13濃度は、第1群に比べると有意に($p < 0.01$)増加した。また、第2群と第3群との間には、有意差は認められなかった。

第4群においては、第2群及び第3群と比べると、全てのデータについて、有意に減少が認められた($p < 0.01$)。また、総タンパク濃度とIL-13濃度については、第4群と第1群との間で有意差が認められない程度まで減少した。

図9に示すように、第2群および第3群では、第1群と比較すると、好酸球の浸潤が認められた。一方、第4群では、第2群および第3群と比べると、これらの炎症像は明らかに減少しており、第1群とほとんど差異が認められなかった。

これらの結果より、PIV2Ag85Bは、OVAが起こすアレルギー性の炎症反応に対して、非常に予防的及び治療的に作用することが明らかとなった。特に、先に本発明者が明らかにした特許文献1では、予防効果は認められるものの、治療効果については十分には認められにくかったが、本実施形態では、治療効果についても十分に証明された。

【0026】

実施例6 <マウスにおける抗原の免疫効果確認>

マウスにrPIV2-Kを経鼻投与(IN:1 \times 10⁷ウイルス)した後、18日後に血清中および糞便(200mg/ml)中のPIV2に対する各種抗体量を測定した。図10~図12には、結果を示した。図より、rPIV2-Kを経鼻投与することにより、血清中のみならず、糞便中にもPIV2に対する特異的な抗体が増加することが示された。これは経鼻的に取り込まれたrPIV2から発現された抗原が、局所部位のみならず他の粘膜にも免疫的な効果を示したことを意味している。

【0027】

こうして、経鼻的にrPIV2-Kを投与することにより、その局所におけるアレルギー性疾患であるアレルギー性鼻炎および喘息に代表される呼吸器におけるアレルギー性炎症疾患に効果的であることに加え、他の部位におけるアレルギー性疾患(例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、潰瘍性大腸炎)にも有効であることを示している。

このように本実施形態によれば、抗原等をコードする遺伝子をM蛋白質を欠損させたPIV2に組み込んだ発現ベクターをアレルギー性疾患患者に投与することにより、アレ

10

20

30

40

50

ルギー性疾患の改善をもたらす極めて有効な効果を発揮することができた。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】 M蛋白を欠失させたアンチセンスrPIV2ゲノムの概要を説明する図である。

【図2】 T7プロモーターの下流に組込んだアンチセンスrPIV2ゲノムcDNAを含むプラスミドベクターからのウイルス粒子を回収する方法を説明する図である。

【図3】 抗原遺伝子を組み込んだM蛋白欠損アンチセンスrPIV2 (rPIV2 - K) の構造を示す図である。

【図4】 喘息様モデルマウスにおける経鼻投与による効果を以下のパラメーターにより比較した図であり、第1群 (PBS)、第2群 (OVA)、第3群 (PIV2)、および第4群 (PIV2 - Ag85B) において、BALF中の総細胞数を比較したグラフである。

10

【図5】 第1群～第4群において、BALF中の総タンパク濃度を比較したグラフである。

【図6】 第1群～第4群において、血清中OVA特異的IgE濃度を比較したグラフである。

【図7】 第1群～第4群において、BALF中のIL-5濃度を比較したグラフである。

【図8】 第1群～第4群において、BALF中のIL-13濃度を比較したグラフである。

【図9】 第1群～第4群において、呼吸器の炎症像を観察したときの代表的な顕微鏡写真図である。

20

【図10】 rPIV2 - Kを経鼻投与した動物の血清中および糞便中のIgA量を示すグラフである。naiveは、rPIV2 - Kを投与しない動物のデータであり、PIV2 / Ag85Bは、rPIV2 - Kを投与した動物のデータである。また、一対となったデータのうち、左側は血清中データ (x100) を、右側は糞便中データ (x5) を示している (図11および図12においても同じである)。

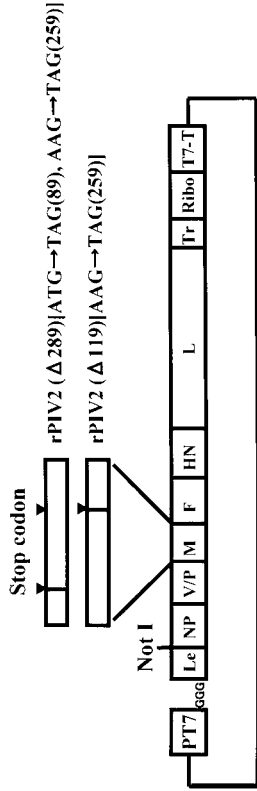
【図11】 rPIV2 - Kを経鼻投与した動物の血清中および糞便中のIgG1量を示すグラフである。

【図12】 rPIV2 - Kを経鼻投与した動物の血清中および糞便中のIgG2a量を示すグラフである。

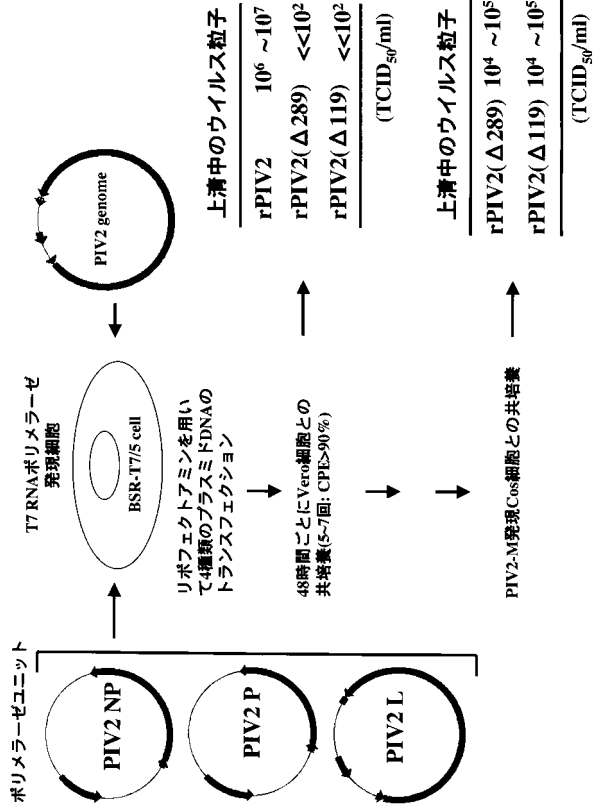
30

【 図 1 】

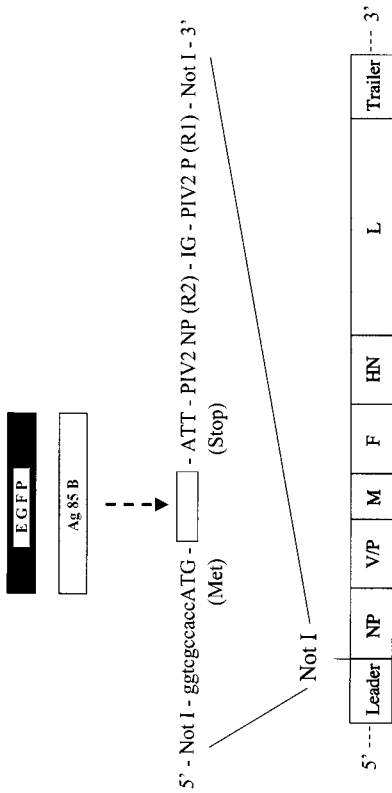
M蛋白を欠失させたアンチセンスrPIV2ゲノムの構築



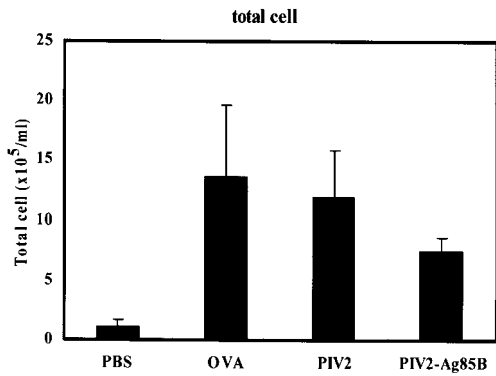
【 図 2 】



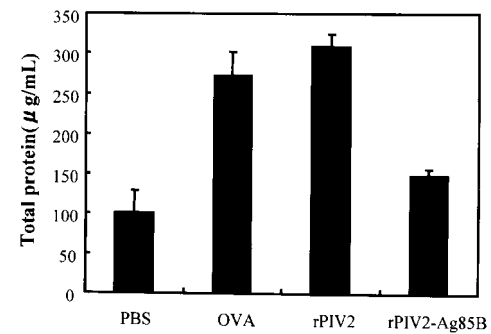
【 図 3 】



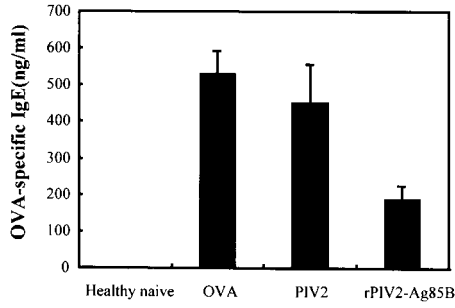
【 図 4 】



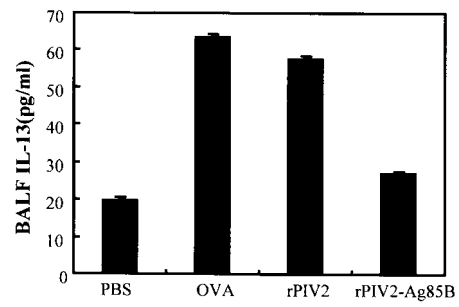
【 図 5 】



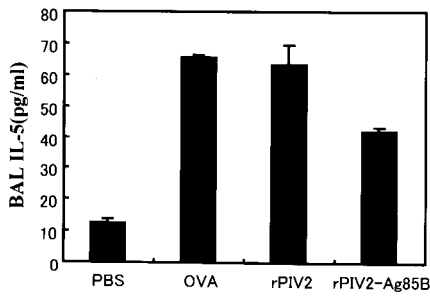
【 図 6 】



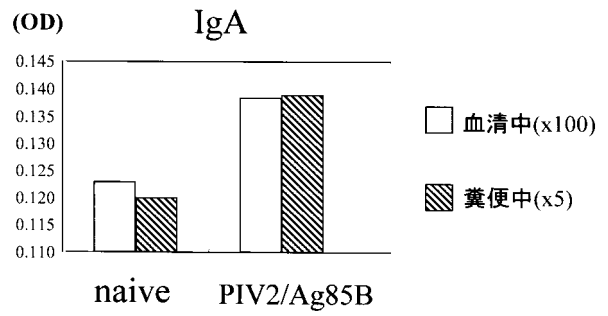
【 図 8 】



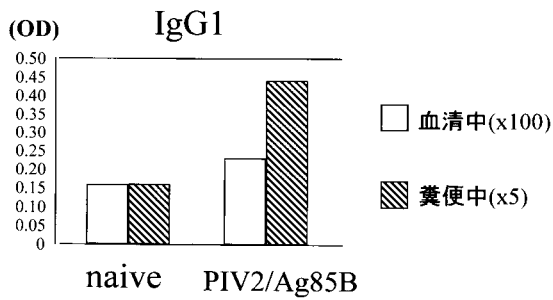
【 図 7 】



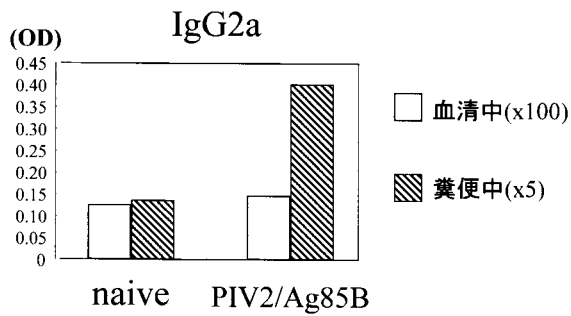
【 図 10 】



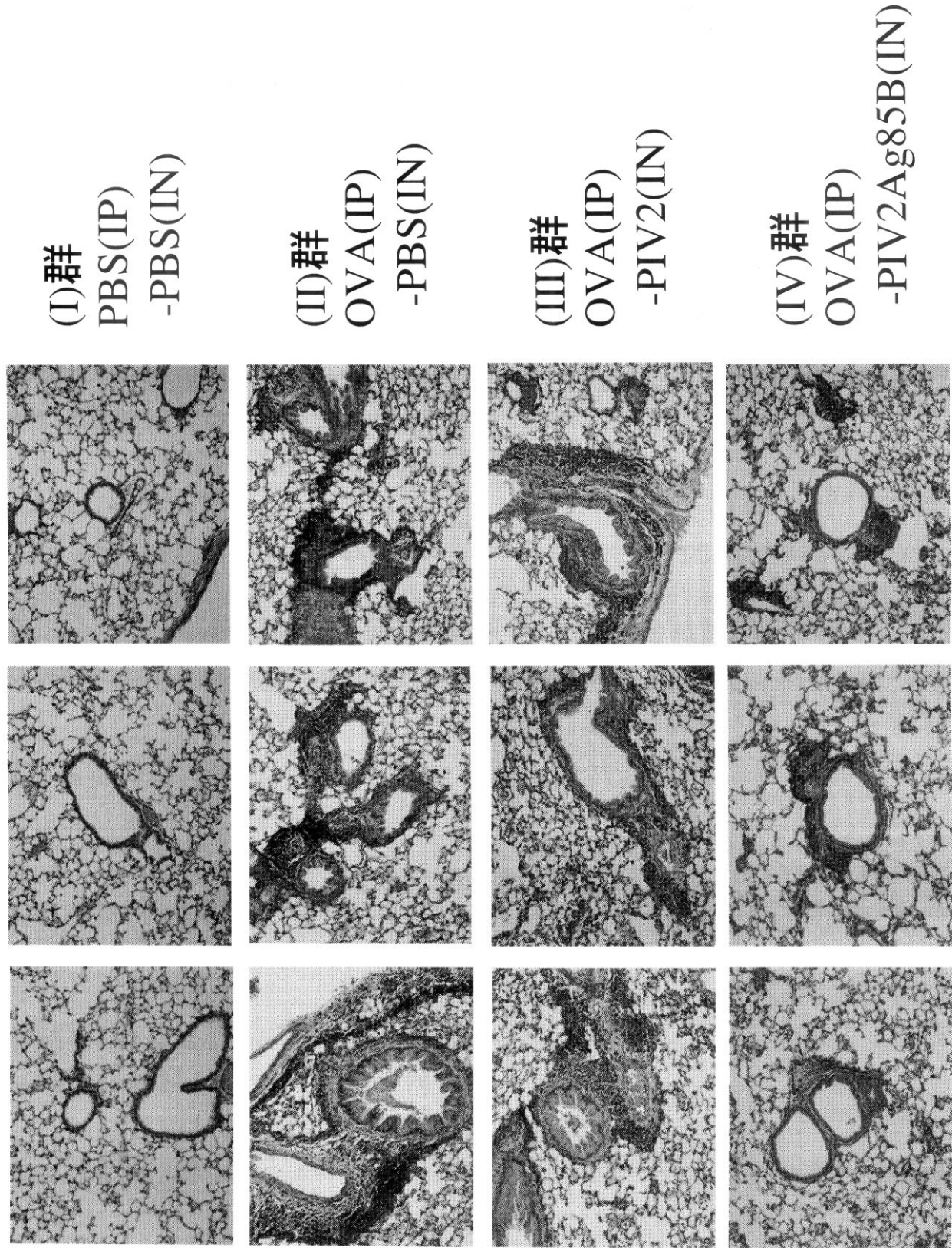
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2008074749000001 . app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 27/14 (2006.01)	A 6 1 P 27/14	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA10 NA14 ZA33 ZA34 ZA68
ZA89 ZB13 ZC51