

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/114678

発行日 平成25年6月27日 (2013.6.27)

(43) 国際公開日 平成23年9月22日 (2011.9.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

出願番号	特願2012-505492 (P2012-505492)	(71) 出願人	304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/001449	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(22) 国際出願日	平成23年3月13日 (2011.3.13)	(72) 発明者	赤田 倫治 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大 学法人山口大学工学部内
(31) 優先権主張番号	特願2010-57732 (P2010-57732)	(72) 発明者	中村 美紀子 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大 学法人山口大学工学部内
(32) 優先日	平成22年3月15日 (2010.3.15)	Fターム(参考)	4B024 AA01 AA20 CA11 GA13 4B065 AA90X BA05 CA60
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤

(57) 【要約】

本発明の課題は、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤や、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法や、哺乳動物細胞の形質転換方法を提供することにある。tRNAをリポフェクション試薬と併用することを特徴とする。好適には、リポフェクション溶液中のtRNA濃度が3～50μg/mLの範囲内であって、培養液中の濃度が約1/10になるように用いることができる。より好適には、tRNA及びPEGをリポフェクション試薬と併用することができる。本発明によれば、哺乳動物細胞への高い遺伝子導入効率を得ることができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

tRNA を含有し、リポフェクション試薬と併用することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤。

【請求項 2】

tRNA 及びリポフェクション試薬を含有することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤。

【請求項 3】

リポフェクション溶液中の tRNA 濃度が 3 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内となるように用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の向上剤。

【請求項 4】

さらにポリエチレングリコールを併用することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の向上剤。

【請求項 5】

ポリエチレングリコールの分子量が、2000 ~ 6000 の範囲内であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の向上剤。

【請求項 6】

ポリエチレングリコールの分子量が、3000 ~ 5000 の範囲内であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の向上剤。

【請求項 7】

哺乳動物が、ヒト、マウス、サルから選ばれる哺乳動物であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の向上剤。

【請求項 8】

tRNA をリポフェクション試薬と併用することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法。

【請求項 9】

tRNA をリポフェクション試薬と併用することにより、目的遺伝子を哺乳動物細胞へリポフェクションすることを特徴とする哺乳動物細胞の形質転換方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤や、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法や、哺乳動物細胞の形質転換方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

細胞への遺伝子導入方法には様々なものが知られている。例えば、生物学的方法としては、ウイルスベクターを利用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法が知られており、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法、超音波遺伝子導入法が知られており、化学的方法としては、リン酸カルシウム共沈殿法、リポソーム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、アルカリ金属法が知られている。上記リポフェクション法は、陽性荷電脂質等からなる脂質二重膜小胞（リポソーム）と、導入するDNAとの間の電気的な相互作用によって、リポソーム-DNA複合体を形成させ、その複合体を貪食や膜融合によって宿主細胞に取り込ませる方法である。DNAを必ずしもリポソーム内に封入しない点で、リポフェクション法は、リポソーム法と区別される。一般的に、遺伝子導入を行う場合には簡便さの点から、まずはリポフェクション法がおこなわれる。リポフェクション法は、汎用性及び簡便性が高く、また、多サンプル処理に適しているというメリットを有しているため、比較的広く用いられている。しかし、このリポフェクション法は、遺伝子導入効率の点で、エレクトロポレーション法や、ウイルスベクターを利用する方法に劣っているというデメリットもあった。一方、ウイルスベクターを利用する方法には、高い遺伝子導入効率を有するといっ

10

20

30

40

50

たメリットがある反面、1) ウイルスベクターに目的遺伝子を入れた後、かかるウイルスベクターをウイルス産生細胞に導入し、その後目的遺伝子を含むウイルスを産生し、かかるウイルスを細胞に感染させるまで1週間程度もの時間が必要、2) ウイルスベクターを扱う施設が必要、3) ウイルスベクターを扱うのに十分な熟練の技術者が必要、4) ウイルスベクターが体細胞ゲノムに挿入され、残ってしまうことがあること、などの問題があった。したがって、ウイルスベクターを利用せずに、効率よく遺伝子導入する方法を開発できれば、有用な方法となる。

【0003】

本発明者らは、これまでに、酵母への遺伝子導入効率を向上させる研究を行ってきた。例えば特許文献1には、酵母培養液に直接、該酵母細胞に導入するDNA、アルカリ金属イオンおよびポリエチレングリコール(PEG)を含有する溶液を混合して、形質転換を行なうことを特徴とする酵母の形質転換法が記載されている。また、特許文献1には、上記の混合溶液に、キャリアDNAやキャリアRNAをさらに用いることが記載されている。しかし、この特許文献1の方法は、酵母細胞を対象とし、また、アルカリ金属法に基づいた方法である。一方、本願発明の方法は、哺乳動物細胞を対象とし、また、リポフェクション法に基づいた方法であるため、特許文献1の方法とは全く異なる。加えて、特許文献1は、tRNAについて何ら教示していない。なお、酵母細胞は細胞壁を有するため、リポフェクション法は通常用いられない。

10

【0004】

ところで、特許文献2には、哺乳動物細胞を宿主細胞とし、遺伝子導入効率が高い形質転換法が記載されている。特許文献2の形質転換法は、哺乳動物複製開始領域と、哺乳動物核マトリックス結合領域とを含む第1ベクター、および哺乳動物細胞内において機能するプロモーターと、分泌タンパク質をコードする目的遺伝子とを含む第2ベクターを、第2ベクターに対する第1ベクターのモル比が0.3~5の範囲となるように、哺乳動物細胞へ同時に導入することを特徴としている。また、非特許文献1や非特許文献2には、特定の分子量のポリエチレングリコールを用いると、遺伝子導入効率が向上することが開示されている。しかし、上記のいずれの文献にも、哺乳動物細胞の遺伝子導入の際に、tRNAを用いることについて、何ら教示はない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0005】

【特許文献1】特開2005-269920号公報

【特許文献2】特開2009-195197号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Journal of Applied Polymer Science, 114,2221-2225, 2009

【非特許文献2】The Journal of Gene Medicine, 3, 115-124, 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

40

本発明は、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤や、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法や、哺乳動物細胞の形質転換方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、リポフェクション法による哺乳動物細胞への遺伝子導入の効率を向上させるべく、導入遺伝子の濃度、リポフェクション試薬の濃度、宿主細胞数などについて至適条件を検討したが、遺伝子導入効率をそれほど向上させることはできなかった。本発明者らは、さらに鋭意研究を続けた結果、tRNAをリポフェクション試薬と併用すると、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を顕著に向上させ得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

50

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、(1) tRNAを含有し、リポフェクション試薬と併用することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤や、(2) tRNA及びリポフェクション試薬を含有することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤や、(3) リポフェクション溶液中のtRNA濃度が3～50 µg/mLの範囲内となるように用いることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の向上剤や、(4) さらにポリエチレングリコールを併用することを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載の向上剤や、(5) ポリエチレングリコールの分子量が、2000～6000の範囲内であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の向上剤や、(6) ポリエチレングリコールの分子量が、3000～5000の範囲内であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の向上剤や、(7) 哺乳動物が、ヒト、マウス、サルから選ばれる哺乳動物であることを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載の向上剤に関する。

10

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、(8) tRNAをリポフェクション試薬と併用することを特徴とする、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法や、(9) tRNAをリポフェクション試薬と併用することにより、目的遺伝子を哺乳動物細胞へリポフェクションすることを特徴とする哺乳動物細胞の形質転換方法に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 1 】

本発明の遺伝子導入効率の向上剤や、遺伝子導入効率の向上方法によると、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を顕著に向上させることができる。また、本発明の哺乳動物細胞の形質転換方法によると、哺乳動物細胞の形質転換を高効率で行うことができる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【図1】 [実施例1 遺伝子導入効率に対するtRNAの影響]の結果を示す図である。

【図2】 [実施例2 各生物種由来のtRNAの効果]の結果を示す図である。

【図3】 [実施例3 リポフェクション試薬の種類による効果]の結果を示す図である。

【図4】 [実施例4 宿主細胞の種類による効果]の結果を示す図である。

【図5】 [実施例5 リポフェクション試薬及びtRNAに、PEGをさらに添加することによる相乗効果]の結果を示す図である。左のグラフはHEK293細胞を用いた結果を示し、右のグラフはHeLa細胞を用いた結果を示す。

30

【図6】 [リポフェクション試薬及びtRNAに、PEGをさらに添加することによる相乗効果]の結果を示す図である。EB5細胞を用いた結果を示す。

【図7】 [参考例1 リポフェクション試薬にPEGを添加することによる効果]の結果を示す図である。

【図8】 [参考例2 リポフェクション試薬の種類の影響]の結果を示す図である。

【図9】 [参考例3 宿主細胞の種類による影響]の結果を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 3 】

1. 本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤

本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤(以下、「本発明の向上剤」とも表示する。)は、tRNAを含有し、かつ、リポフェクション試薬と併用することを特徴とする。tRNAを含有する本発明の向上剤を、リポフェクション試薬と併用すると、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を顕著に向上させることができる。なお、リポフェクション試薬と併用してリポフェクションを行ったときに、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を向上させ得る効果を、本明細書において「本発明の遺伝子導入効率向上効果」とも表示する。本発明の遺伝子導入効率向上効果の作用機作は明確ではないが、tRNAをリポフェクション試薬と併用すると、哺乳動物細胞への遺伝子の取り込み効率が向上すると考えられる。

40

50

【0014】

本明細書における「tRNA」としては、本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するtRNAである限り特に制限されず、仔ウシ肝臓(calf liver; Bovine)由来のtRNA(例えば配列番号1記載の配列からなるロイシントRNA)、酵母(Yeasts; Saccharomyces cerevisiae)由来のtRNA(例えば配列番号2記載の配列からなるロイシントRNA)、小麦胚芽(wheat germ; Wheat)由来のtRNA(例えば配列番号3記載の配列からなるフェニルアラニンtRNA)、大腸菌(E. coli)由来のtRNA(例えば配列番号4記載の配列からなるロイシントRNA)を好適に例示することができ、中でも、本発明の遺伝子導入効率向上効果の程度が高いことから、酵母由来のtRNAをより好適に例示することができる。

10

【0015】

本明細書における「tRNA」には、本発明の遺伝子導入効率向上効果を有している限り、tRNAの変異体(以下、単に「tRNA変異体」と表示する。)も含まれる。かかるtRNA変異体とは、配列番号1~4のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドの変異体であって、かつ、いずれかの哺乳動物細胞において本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するポリリボヌクレオチドを意味する。

かかるtRNA変異体としては、

(a) 配列番号1~4のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドに対して80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有し、かつ、いずれかの哺乳動物細胞において本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するポリリボヌクレオチド:

20

(b) 配列番号1~4のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドにおいて、1若しくは2個以上のリボヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリリボヌクレオチドとなり、かつ、いずれかの哺乳動物細胞において本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するポリリボヌクレオチド:

(c) 配列番号1~4のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、いずれかの哺乳動物細胞において本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するポリリボヌクレオチド:

【0016】

上記(b)における「1若しくは2個以上のリボヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリリボヌクレオチド」とは、例えば1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個、中でも1~3個の任意の数のリボヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリリボヌクレオチドを意味する。

30

【0017】

上記(c)における「ストリンジェントな条件下」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、具体的には、80%以上、好ましくは85%以上の同一性を有するDNA同士(又はDNAとRNA)がハイブリダイズし、それより同一性が低いDNA同士(又はDNAとRNA)がハイブリダイズしない条件あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である65、1xSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)、0.1%SDS、又は0.1xSSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークロニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができる。上記(c)における「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリリボヌクレオチド」としては、プローブとして使用するポリヌクレオチドと一定以上の同一性を有するポリリボヌクレオチドが挙げることができ、例えば80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有するポリリボヌクレオチドを好適に例示することができる。

40

【0018】

上記の配列番号1~4のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドは、化学合成法や、

50

R N A ポリメラーゼを利用した遺伝子工学的的手法などの当業者に既知の任意の方法により作製することもできる。

【 0 0 1 9 】

また、前述のポリリボヌクレオチドの変異体は、化学合成法、遺伝子工学的的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法により作製することもできる。具体的には、配列番号 1 ~ 4 のいずれかに示されるポリリボヌクレオチドに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的な手法等を用いて、これらポリリボヌクレオチドに変異を導入することにより、ポリリボヌクレオチドの変異体を取得することができる。遺伝子工学的的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークロニング第 2 版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1 ~ 38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明におけるポリリボヌクレオチドとしては、一次構造として、一本鎖であるポリリボヌクレオチドを好適に例示することができ、二次構造として、Dアーム、アンチコドンアーム及びTアームを持つクローリーフ構造を有するポリリボヌクレオチドを好適に例示することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の向上剤と併用するリポフェクション試薬としては、本発明の遺伝子導入効率向上効果が得られる限り、特に制限されず、市販のリポフェクション試薬を用いることができる。市販のリポフェクション試薬としては、Fugene (登録商標) HD transfection reagent (Roche Applied Science社製)、Lipofectamine (登録商標) 2000 (invitrogen社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX (invitrogen社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX plus (invitrogen社製)、JetPEI (登録商標) (Polypplus-transfection社製)、GeneJuice (登録商標) (Takara Bio社製)、Turbofect (登録商標) (Fermentas社製)などを好適に例示することができ、中でも、より優れた本発明の遺伝子導入効率向上効果が得られることから、Fugene (登録商標) HD transfection reagent、Lipofectamine (登録商標) 2000をより好適に例示することができる。

20

【 0 0 2 2 】

本発明において併用する t R N A とリポフェクション試薬の好適な組合せとしては、酵母由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、仔ウシ肝臓由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、麦胚芽由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、大腸菌 (E. coli) 由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、酵母由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、仔ウシ肝臓由来の t R N A とLipofectamine (登録商標) 2000との組合せ、麦胚芽由来の t R N A とLipofectamine (登録商標) 2000との組合せ、大腸菌 (E. coli) 由来の t R N A とLipofectamine (登録商標) 2000との組合せを挙げることができ、中でも、酵母由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せ、仔ウシ肝臓由来の t R N A とFugene (登録商標) HD transfection reagentとの組合せをより好適に挙げることができる。

30

40

【 0 0 2 3 】

本発明の向上剤をリポフェクション試薬と併用する方法としては、通常のリポフェクション法において、リポフェクション試薬と共に本発明の向上剤を用いる方法である限り特に制限されず、より詳細には、リポフェクションを行う際に、本発明の向上剤と、導入する遺伝子と、リポフェクション試薬とが、宿主である哺乳動物細胞に共に接触している工程を含んでいる限り特に制限されず、該工程としては、蒸留水等の溶媒に、本発明の向上剤と、導入する遺伝子と、リポフェクション試薬とを添加、混合することによって作製したリポフェクション溶液を、哺乳動物細胞に添加する工程を好適に例示することができる。

【 0 0 2 4 】

50

本発明の向上剤をリポフェクション試薬と併用する際の、本発明の向上剤の濃度としては、本発明の遺伝子導入効率向上効果が得られる限り特に制限されず、用いる tRNA の種類や宿主細胞の種類に応じて適宜調節することができるが、リポフェクションのリポフェクション溶液の tRNA の濃度で換算して、例えば 1 ~ 100 µg / mL の範囲内、好ましくは 3 ~ 50 µg / mL の範囲内、より好ましくは 5 ~ 25 µg / mL の範囲内で用いることを好適に例示することができる。本明細書において「リポフェクション溶液中の濃度」とは、目的遺伝子を宿主細胞にリポフェクションする際に用いる、リポフェクション試薬と DNA を混合した状態の溶液（リポフェクション溶液）中の濃度を意味する。なお、リポフェクションする際に用いるリポフェクション溶液の量としては、宿主細胞に接触する溶液に、リポフェクション溶液を添加することにより、リポフェクション溶液が 5 ~ 15 倍、好適には 7 ~ 13 倍、より好適には 9 ~ 11 倍、特に好適には 10 倍に希釈されるような量を例示することができる。

10

20

30

40

50

【0025】

上記の宿主である哺乳動物細胞としては、本発明の遺伝子導入効率向上効果が得られる限り特に制限されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等の哺乳動物由来の細胞を好適に例示することができる。中でも、ヒト、サル又はマウス由来の細胞をより好適に例示することができる。ヒト由来の細胞としては、293細胞（ATCC CRL - 1573）、HeLa細胞（ATCC CCL - 2）を好適に例示することができる。サル由来の細胞としては、COS7細胞（ATCC CRL - 1651）を好適に例示することができる。マウス由来の細胞としては、NIH3T3細胞（ATCC CRL - 1658）やEB5細胞（RIKEN BRC AES0151）を好適に例示することができる。これらの哺乳動物細胞は、例えば293細胞、HeLa細胞及びCOS7細胞はATCCから、前述のATCC番号に基づいて入手することができ、EB5細胞は、前述のRIKEN番号に基づいて独立行政法人理化学研究所から入手することができる。

【0026】

哺乳動物細胞にリポフェクションする目的遺伝子は、宿主細胞内で発現可能なプロモーターの制御下に作動可能に配置されていることが好ましい。ここで、目的遺伝子が該プロモーターの制御下に作動可能に配置されているとは、該プロモーターに転写因子が結合することにより、その目的遺伝子の発現が誘導されるように、該プロモーターと、その目的遺伝子とが連結されていることを意味する。かかるプロモーターとしては、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター（CMVプロモーター）、SV40初期プロモーター、SRプロモーター、ヒト伸長因子1 - プロモーター、ウシ成長ホルモンプロモーター、アクチン遺伝子プロモーター等を好適に例示することができる。上記「目的遺伝子」としては、任意の遺伝子であればよいが、なんらかの有用なタンパク質をコードする有用タンパク質遺伝子を好適に例示することができる。有用タンパク質遺伝子としては、エリスロポエチン等のサイトカイン遺伝子、抗体をコードする遺伝子や、ウイルスワクチンタンパク質の遺伝子を好適に例示することができる。また、上記目的遺伝子やプロモーターは、宿主細胞内で複製し得るベクターに挿入して用いることが好ましく、かかるベクターとしては、宿主細胞内で複製し得るプラスミドを好適に例示することができ、中でも、CMVプロモーターを持つpCMVベクターを好適に例示することができる。

【0027】

上記の目的遺伝子が宿主細胞内に導入されたかどうかは、目的遺伝子と共にマーカー遺伝子を導入し、形質転換体におけるそのマーカー遺伝子の発現を確認するなどして容易に確認することができる。

【0028】

本発明の向上剤は、本発明の遺伝子導入効率向上効果を有する。ある tRNA が本発明の遺伝子導入効率向上効果を有するかどうかは、例えば、ガウシア由来の分泌型ルシフェラーゼ（Gaussia Luciferase : GLuc）が CMV（Cytomegalovirus）プロモーターの支配下に配置されたプラスミドである pCMV - GLuc を用意する工程、蒸留水 100

μL に、 $0.5\ \mu\text{g}$ のpCMV-GLuc、 $0.1\sim 10\ \mu\text{g}$ の範囲内のtRNA、 $1\ \mu\text{L}$ のFugene(登録商標)HD transfection reagent(Roche Applied Science社製)添加した後、28℃で30分間静置してリポフェクション溶液を作製する工程、いずれか1種の哺乳動物細胞を96ウエル平底プレートに $200\ \mu\text{L}$ /ウエル(2×10^3 細胞/ウエル)ずつ播種して、20時間培養する工程、各ウエルの培地を取り除き、新たな培地を $180\ \mu\text{L}$ /ウエルずつ添加する工程、その直後に、前述のリポフェクション溶液を、1ウエルにつき $20\ \mu\text{L}$ ずつ添加し、リポフェクションを行う工程、リポフェクション溶液の添加から24時間経過後に、各ウエルについて、ルシフェラーゼ活性を測定する工程、及び、 $0.1\sim 10\ \mu\text{g}$ の範囲内のtRNAを用いた場合におけるルシフェラーゼ活性の測定値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))の最大値と、tRNAを用いないこと以外は同様のアッセイにより測定したルシフェラーゼ活性の測定値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))(コントロール値)とを比較し、コントロール値よりも最大値が高い場合に本発明の遺伝子導入効率向上効果を有すると評価する工程を含むルシフェラーゼアッセイ等により容易に確認することができる。ここで「最大値」とは、 $0.1\sim 10\ \mu\text{g}$ の範囲内の5点以上(好適には8点以上)のtRNAを用いた場合におけるルシフェラーゼ活性の測定値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))の最大値を意味し、より好適には $0.1\ \mu\text{g}$ 、 $0.2\ \mu\text{g}$ 、 $0.3\ \mu\text{g}$ 、 $0.5\ \mu\text{g}$ 、 $1\ \mu\text{g}$ 、 $2.5\ \mu\text{g}$ 、 $5\ \mu\text{g}$ 、 $10\ \mu\text{g}$ の8点のtRNAを用いた場合におけるルシフェラーゼ活性の測定値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))の最大値を例示することができる。また、上記の「いずれか1種の哺乳動物細胞」としては、NIH3T3細胞、COS7細胞、293細胞、HeLa細胞、及び、EB5細胞から選択される哺乳動物細胞を好適に例示することができる。

【0029】

本発明の遺伝子導入効率向上効果の好ましい程度としては、例えば、上記のルシフェラーゼアッセイにおける最大値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))が、コントロール値(RLU(count/sec $\cdot\mu\text{L}$))に対して、2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは5倍以上、さらに好ましくは7倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは15倍以上、より好ましくは20倍以上、さらに好ましくは30倍以上、より好ましくは50倍、さらに好ましくは75倍以上であることを好適に含む。

【0030】

本発明の向上剤におけるtRNAの含有量としては、特に制限されないが、本発明の向上剤に対して本発明におけるtRNAを例えば $0.1\sim 100$ 質量%、好適には $0.5\sim 90$ 質量%、より好適には $1\sim 80$ 質量%とすることができる。

【0031】

本発明の向上剤には、tRNAの他に、さらにリポフェクション試薬を含有していることが好ましい。かかる本発明の向上剤には、tRNAとリポフェクション試薬を同一容器内で含有している場合や、tRNAとリポフェクション試薬を別々の容器で備えている場合が含まれる。また、本発明の向上剤は、本発明の遺伝子導入効率向上効果が得られる限り、本発明におけるtRNAの他に、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の他の向上剤や、ポリエチレングリコール(PEG)等の任意成分を含んでいてもよい。

【0032】

ポリエチレングリコールをさらに併用すると、本発明の遺伝子導入効率向上効果がより高めることができるので、さらにポリエチレングリコールを併用することが好ましい。ポリエチレングリコールの分子量は特に制限されないが、本発明の遺伝子導入効率向上効果をより高める観点から、 $2000\sim 6000$ の範囲内の分子量を好適に例示することができ、 $3000\sim 5000$ の範囲内の分子量をより好適に例示することができ、 $3000\sim 4000$ の範囲内の分子量をさらに好適に例示することができる。

【0033】

また、ポリエチレングリコールの使用量としては、リポフェクション溶液中の濃度で $3\sim 30$ 質量%の範囲内を好適に例示することができ、 $3\sim 20$ 質量%の範囲内をより好適に例示することができ、 $4\sim 6$ 質量%の範囲内をさらに好適に例示することができる。ポ

10

20

30

40

50

リエチレングリコールの使用量の別の表現としては、用いるリポフェクション試薬に対して300～1000質量%の範囲内を好適に例示することができ、300～750質量%の範囲内をより好適に例示することができ、400～600質量%の範囲内をさらに好適に例示することができる。

【0034】

本発明の向上剤に含有されるtRNAは、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤の剤型としては、粉剤などの固形製剤、溶液剤などの液剤を例示することができるが、tRNAをより安定的に保存し得ることから、固形製剤を好適に例示することができる。本発明におけるtRNAを製剤とする場合には、製剤上の必要に応じて、適宜の担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、防腐剤、抗酸化剤、滑沢剤、湿潤剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。なお、本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上剤は、本発明の哺乳動物への遺伝子導入剤とも表現することができる。

10

【0035】

2. 本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法

本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法は、tRNAをリポフェクション試薬と併用することを特徴とする。tRNAをリポフェクション試薬と併用する方法としては、前述した本発明の向上剤をリポフェクション試薬と併用する方法と同様の方法を好適に例示することができる。本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法によれば、哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を顕著に向上させることができる。なお、本発明の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率の向上方法は、本発明の哺乳動物への遺伝子導入方法とも表現することができる。

20

【0036】

3. 本発明の哺乳動物細胞の形質転換方法

本発明の哺乳動物細胞の形質転換方法は、tRNAをリポフェクション試薬と併用することにより、目的遺伝子を哺乳動物細胞へリポフェクションすることを特徴とする。tRNAをリポフェクション試薬と併用する方法としては、前述した本発明の向上剤をリポフェクション試薬と併用する方法と同様の方法を好適に例示することができる。本発明の哺乳動物細胞の形質転換方法によれば、哺乳動物細胞での形質転換を高効率で行うことができる。

30

【実施例1】

【0037】

[遺伝子導入効率に対するtRNAの影響]

遺伝子導入効率に対するtRNAの影響を調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

【0038】

まず、レポータープラスミドとして、pCMV-GLuc (New England BioLab社製) を用意した。かかるpCMV-GLucでは、ガウシア由来の分泌型ルシフェラーゼ (Gaussia Luciferase: GLuc) をコードする遺伝子が、CMV (Cytomegalovirus) プロモーターの支配下に配置されている。CMVプロモーターは、哺乳動物細胞において構成的に発現するプロモーターであるので、リポフェクション実験のレポータープラスミドの作製に適している。

40

【0039】

次に、仔ウシの肝臓由来のtRNA (Sigma Aldrich社製、「Ribonucleic acid, transfer Type VI From Bovine liver」、Cat#R4752-50UN) と、トータルRNA (Sigma Aldrich社製、「Ribonucleic acid from calf liver Type IV」、Cat# R7250-100MG) を用意した。なお、トータルRNAのほとんどが、rRNAからなる。次いで、蒸留水100μLにつき、0.5μgのpCMV-GLucと、所定量のRNA (tRNA又はトータルRNA) を添加した。その溶液にリポフェクション試薬の1種であるFugene (登録商標) HD transfection reagent (Roche Applied Science社製) を1μL添加して10μLとし

50

た。この溶液を28℃で30分間静置した。この溶液（以下、「リポフェクション溶液」とも表示する。）を合計404μLほど作製した。なお、上記の所定量とは、RNAがtRNA、トータルRNAのいずれの場合も、0μg、0.078μg、0.156μg、0.313μg、0.625μg、1.25μg、2.5μg、5μg、10μg（リポフェクション溶液における濃度換算で、それぞれ、0μg/mL、10.78μg/mL、21.56μg/mL、33.13μg/mL、56.25μg/mL、1012.5μg/mL、25μg/mL、50μg/mL、100μg/mL）であった。

【0040】

一方、マウスの胎児皮膚から分離した培養細胞であるNIH3T3（NIH-3T3）細胞を用意し、培地（RPMI1640に10%FCSを混合した培地）を含む96ウエル平底プレートに200μL/ウエル（ 2×10^3 細胞/ウエル）ずつ播種して、NIH3T3細胞を20時間培養した。その後、各ウエルの培地を取り除き、新たな培地（RPMI1640に10%FCSを混合した培地）を180μL/ウエルずつ添加した。その直後に、前述のリポフェクション溶液を、1ウエルにつき20μLずつ添加し、リポフェクションを行った。リポフェクション溶液の添加から24時間経過後に、各ウエルについて、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図1に示す。

10

【0041】

図1の結果から分かるように、0.5~2.5μg（リポフェクション溶液中の濃度で5~25μg/mL）のtRNAを、リポフェクション試薬と併用すると、トータルRNAとリポフェクション試薬とを併用した場合と比べて、遺伝子導入効率が飛躍的に高まること示された。特に、tRNAを1.25μg（リポフェクション溶液中の濃度で12.5μg/mL）用いたときは、RNAを用いなかった場合（コントロール）と比較して、遺伝子導入効率が5.8倍にも高まっていた。

20

【実施例2】

【0042】

[各生物種由来のtRNAの効果]

実施例1では、宿主細胞としてマウス由来の細胞を用い、及び、仔ウシ由来のtRNAを用いた。宿主細胞として他の哺乳動物細胞を用い、及び、他の生物種由来のtRNAを用いた場合であっても、遺伝子導入効率向上効果を有しているかを調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

30

【0043】

tRNAとして、仔ウシ肝臓（calf liver）由来のtRNAの他に、酵母（Yeasts）由来のtRNA（Sigma Aldrich社製、「Ribonucleic acid, Type X-SA transfer from baker's yeast」、Cat#R8759-100UN）、小麦胚芽（wheat germ）由来のtRNA（Sigma Aldrich社製、「Ribonucleic acid, Type V, transfer from Wheat Germ」、Cat# R7876-500UN）、大腸菌（E. coli）由来のtRNA（Sigma Aldrich社製、「Ribonucleic acid, transfer Type XX from Escherichia coli strain W」、Cat#R1753-100UN）を用意した。また、宿主細胞として、サルの腎臓由来の培養細胞であるCOS7細胞を用意した。NIH3T3細胞に代えてCOS7細胞を用い、tRNAとして各生物種由来のtRNAを用いたこと以外は、実施例1におけるリポフェクション実験と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、コントロールとして、tRNAを用いない方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図2に示す。

40

【0044】

図2の結果から分かるように、程度に差はあるものの、いずれの生物種由来のtRNAをリポフェクション試薬と併用した場合であっても、tRNAを用いなかった場合（fugene：コントロール）と比較して、遺伝子導入効率の向上効果が見られた。すなわち、リポフェクション溶液中のtRNA濃度が1~100μg/mLの範囲内の濃度における遺伝子導入効率の最大値が、コントロールの遺伝子導入効率の何倍であるかを算出したところ、仔ウシ肝臓由来のtRNAの場合は2.8倍、酵母由来のtRNAの場合は16.5倍、小麦胚芽由来のtRNAの場合は6.5倍、大腸菌由来のtRNAの場合は5.2倍で

50

あった。また、酵母由来の tRNA は、0.5 ~ 2.5 μg (リポフェクション溶液中の濃度で 5 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) において、それ以外の由来の tRNA は、1.25 ~ 5 μg (リポフェクション溶液中の濃度で 12.5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) において、遺伝子導入効率がとりわけ向上した。

【実施例 3】

【0045】

[リポフェクション試薬の種類による効果]

実施例 1 や 2 では、リポフェクション試薬として、Fugene (登録商標) HD transfection reagent (Roche Applied Science 社製) を用いた。そこで、他のリポフェクション試薬を用いた場合であっても、tRNA の遺伝子導入効率向上効果が得られるかを調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

10

【0046】

リポフェクション試薬として、Fugene (登録商標) HD transfection reagent、Lipofectamine (登録商標) 2000 (invitrogen 社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX (invitrogen 社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX plus (invitrogen 社製)、JetPEI (登録商標) (Polyplus-transfection 社製)、GeneJuice (登録商標) (Takara Bio 社製)、又は、Turbofect (登録商標) (Fermentas 社製) を用い、及び、tRNA として酵母由来の tRNA (Sigma Aldrich 社製、「Ribonucleic acid, Type X-SA transfer from baker's yeast」、Cat#R8759-100UN) を 0.625 μg (リポフェクション溶液中の濃度で 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 用いたこと以外は、実施例 2 の方法と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、コントロールとして、tRNA を用いない方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図 3 に示す。

20

【0047】

図 3 の結果から分かるように、いずれのリポフェクション試薬を用いた場合も、tRNA を併用すると、遺伝子導入効率が飛躍的に向上した。中でも、Fugene (登録商標) HD transfection reagent や、Lipofectamine (登録商標) 2000 は、遺伝子導入効率の向上の程度が顕著であった。

【実施例 4】

【0048】

[宿主細胞の種類による効果]

実施例 1 では、宿主細胞として NIH3T3 細胞を用い、実施例 2 ~ 3 では、宿主細胞として COS7 細胞を用いた。そこで、宿主細胞として、他の哺乳動物細胞を用いた場合であっても、tRNA の遺伝子導入効率向上効果が得られるかを調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

30

【0049】

宿主細胞として、NIH3T3 細胞、COS7 細胞、293 細胞、又は、HeLa 細胞を用い、及び、tRNA として酵母由来の tRNA (Sigma Aldrich 社製、「Ribonucleic acid, Type X-SA transfer from baker's yeast」、Cat#R8759-100UN) を様々な濃度で用いたこと以外は、実施例 2 の方法と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、コントロールとして、tRNA を用いない方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図 4 に示す。なお、293 細胞は、ヒト胎児腎細胞由来の培養細胞であり、HeLa 細胞は、ヒト子宮頸部がん由来の培養細胞である。

40

【0050】

図 4 の結果から分かるように、いずれの哺乳動物細胞を用いた場合も、tRNA を併用すると、遺伝子導入効率が飛躍的に向上した。具体的には、COS7 細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して 1.7 倍となり、293 細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して 1.7 倍となり、NIH3T3 細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して 2.2 倍となり、HeLa 細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して 2.7 倍となった。

【実施例 5】

50

【 0 0 5 1 】

[リポフェクション試薬及び tRNA に、PEG をさらに添加することによる相乗効果]
リポフェクション試薬と tRNA に加えて、さらに PEG を用いた場合の影響を調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

【 0 0 5 2 】

tRNA として酵母由来の tRNA (Sigma Aldrich 社製、「Ribonucleic acid, Type X-SA transfer from baker's yeast」、Cat#R8759-100UN) を 0.625 μ g (リポフェクション溶液中の濃度で 6.25 μ g/mL) 用い、哺乳動物細胞として 293 細胞又は HeLa 細胞を用い、及び、リポフェクション溶液にさらに PEG 3350 (Sigma 社製) を 5 質量% となるように添加したこと以外は、実施例 2 におけるリポフェクション実験と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、PEG 3350 を用いない方法でもリポフェクション実験を行った。さらに、コントロールとして、tRNA を用いない方法、及び、tRNA を用いないが PEG 3350 は用いる方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図 5 に示す。

10

【 0 0 5 3 】

図 5 から分かるように、「リポフェクション試薬及び tRNA」に加えて、さらに PEG を用いると、遺伝子導入効率が相乗的にさらに向上することが示された。具体的には、「リポフェクション試薬及び tRNA」に加えて、さらに PEG を用いることによって、宿主細胞が 293 細胞の場合は遺伝子導入効率が約 5.9 倍となり、宿主細胞が HeLa 細胞の場合は遺伝子導入効率が約 3.3 倍となった。

20

【 0 0 5 4 】

上記図 5 で実施したリポフェクション実験を、マウス E14tg2a 細胞由来の ES 細胞、すなわち EB5 細胞においても同様に行った。図 6 から分かるように、「リポフェクション試薬及び tRNA」に加えて、さらに PEG を用いると、遺伝子導入効率が相乗的にさらに向上することが示された。具体的には、「リポフェクション試薬及び tRNA」に加えて、さらに PEG を用いることによって、EB5 細胞における遺伝子導入効率が約 10 倍となった。

【 0 0 5 5 】

[参考例 1 リポフェクション試薬に PEG を添加することによる効果]

tRNA を用いずに、リポフェクション試薬に PEG を添加した場合の影響、及び、PEG の分子量の影響を調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

30

【 0 0 5 6 】

tRNA を用いなかったこと、各分子量 (600、1000、3350、6000、10000) の PEG をリポフェクション溶液における濃度で 0~30% (w/v) (リポフェクション溶液中の濃度で 0~3% (w/v)) 添加したこと以外は、実施例 2 におけるリポフェクション実験と同じ方法でリポフェクション実験を行った。これらの結果を図 7 に示す。

【 0 0 5 7 】

図 7 の結果から分かるように、程度に差はあるものの、いずれの分子量の PEG をリポフェクション試薬と併用した場合であっても、PEG を用いなかった場合 (fugene: コントロール) と比較して、遺伝子導入効率の向上効果が見られた。中でも、分子量 3350 の PEG は、リポフェクション溶液における濃度が 5% (w/v) のときに、コントロールと比較して 2.1 倍もの遺伝子導入効率を示した。

40

【 0 0 5 8 】

[参考例 2 リポフェクション試薬の種類の影響]

参考例 1 や 2 では、リポフェクション試薬として、Fugene (登録商標) HD transfection reagent (Roche Applied Science 社製) を用いた。そこで、他のリポフェクション試薬を用いた場合であっても、PEG の遺伝子導入効率向上効果が得られるかを調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

【 0 0 5 9 】

50

リポフェクション試薬として、Fugene (登録商標) HD transfection reagent、Lipofectamine (登録商標) 2000 (invitrogen社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX (invitrogen社製)、Lipofectamine (登録商標) LTX plus (invitrogen社製)、Carri Gene (Nitto Denko Tech. corp.社製)、JetPEI (登録商標) (Polyplus-transfection社製)、Gene Juice (登録商標) (Takara Bio社製)、又は、Turbofect (登録商標) (Fermentas社製) を用い、及び、PEGとして、分子量3350のPEGを5% (w/v) で用いたこと以外は、参考例1の方法と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、コントロールとして、PEGを用いない方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図8に示す。

【0060】

10

図8の結果から分かるように、いずれのリポフェクション試薬を用いた場合も、PEGを併用すると、遺伝子導入効率が顕著に向上した。

【0061】

[参考例3 宿主細胞の種類による影響]

参考例1~2では、宿主細胞としてCOS7細胞を用いた。そこで、宿主細胞として、他の哺乳動物細胞を用いた場合であっても、PEGの遺伝子導入効率向上効果が得られるかを調べるために、以下のようなリポフェクション実験を行った。

【0062】

宿主細胞として、COS7細胞、NIH3T3細胞、293細胞、又は、HeLa細胞を用い、及び、PEGとして、分子量3350のPEGを5% (w/v) で用いたこと以外は、参考例1の方法と同じ方法でリポフェクション実験を行った。また、コントロールとして、PEGを用いない方法でもリポフェクション実験を行った。これらの結果を図9に示す。

20

【0063】

図9の結果から分かるように、いずれの哺乳動物細胞を用いた場合も、PEGを併用すると、遺伝子導入効率が顕著に向上した。具体的には、COS7細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して2.7倍となり、293細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して2.4倍となり、NIH3T3細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して3.0倍となり、HeLa細胞の場合は、最大値がコントロールと比較して2.7倍となった。

【産業上の利用可能性】

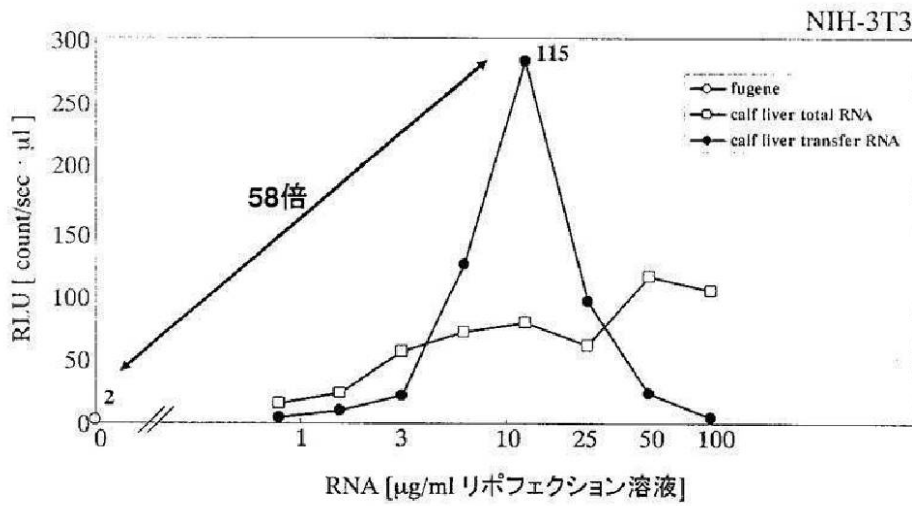
30

【0064】

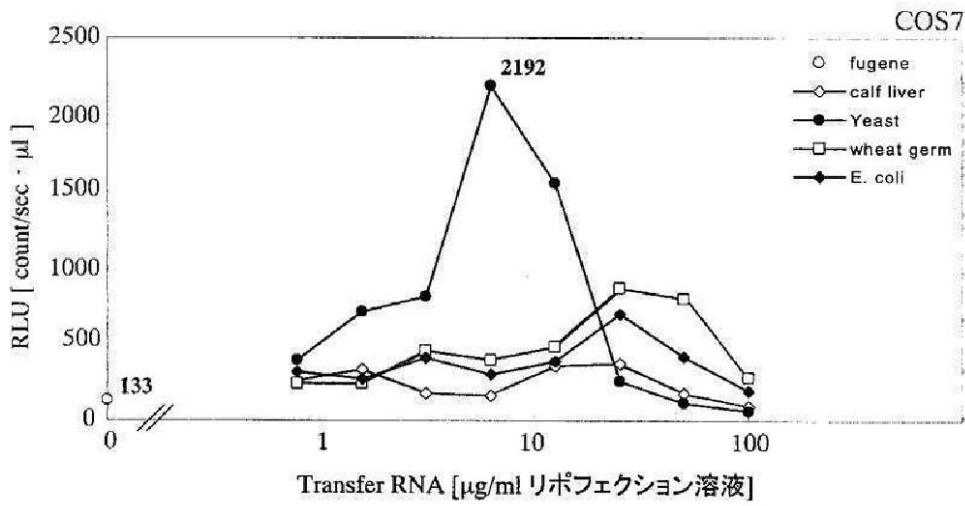
本発明は、哺乳動物細胞への遺伝子導入の分野において、好適に利用することができる。

。

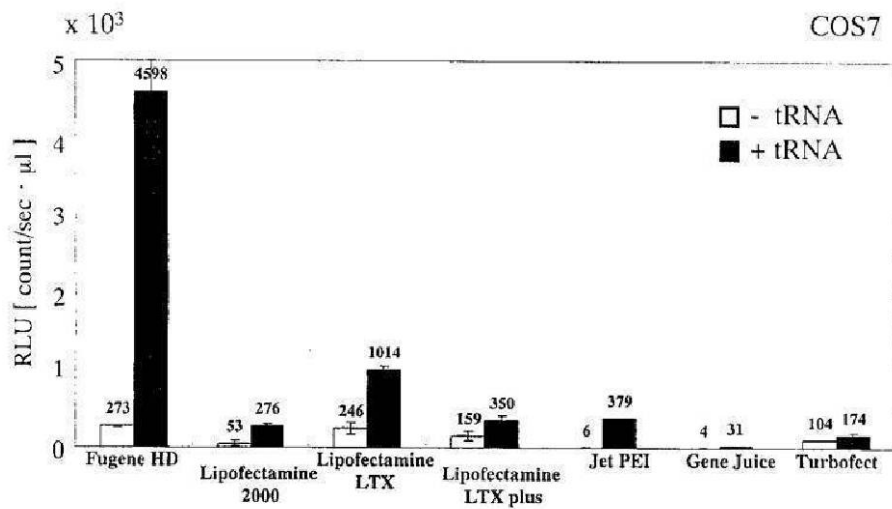
【 図 1 】



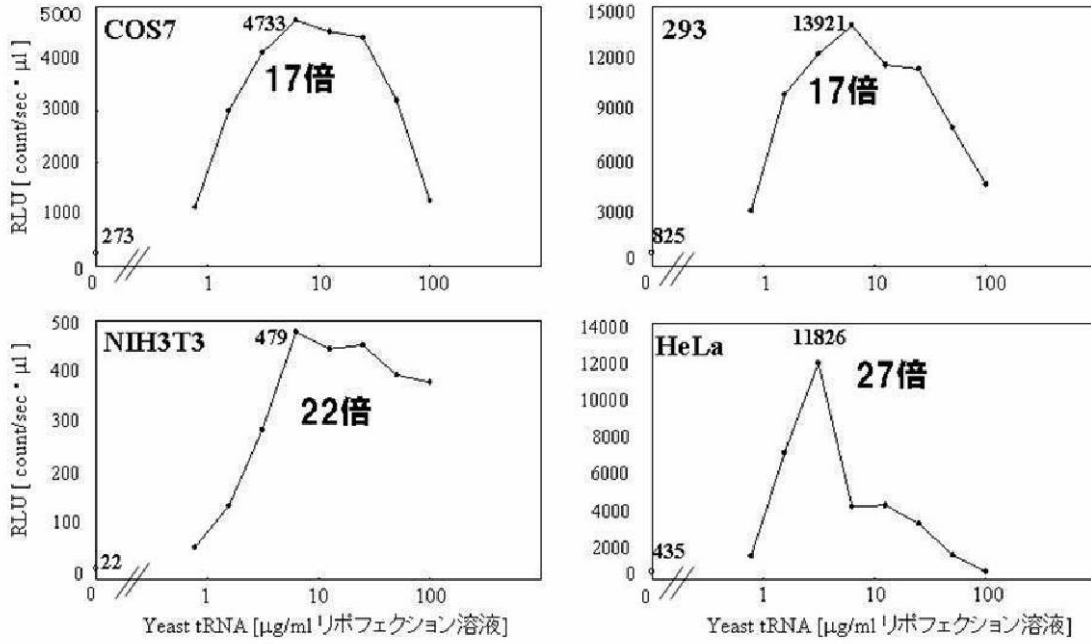
【 図 2 】



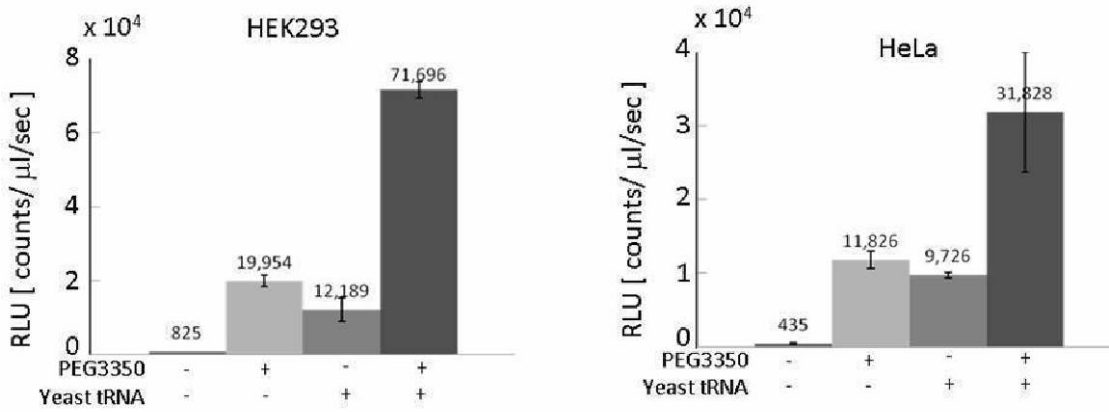
【 図 3 】



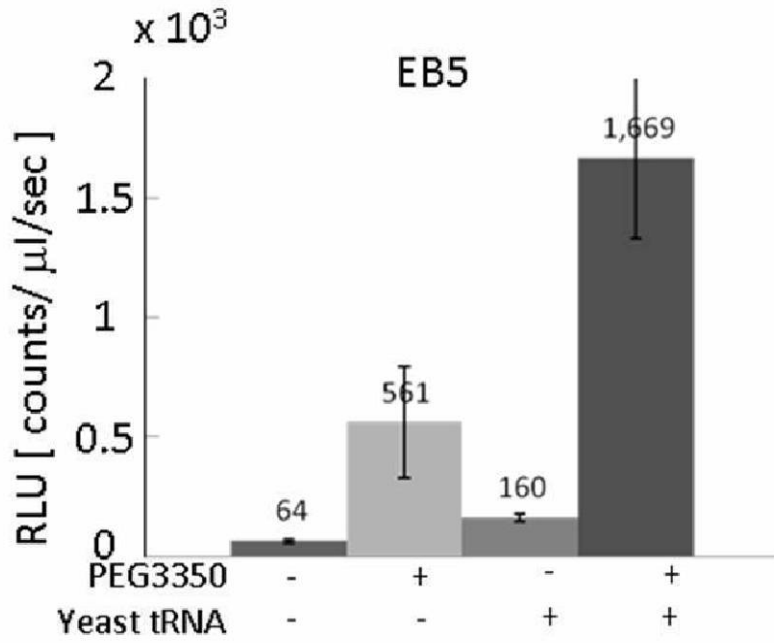
【 図 4 】



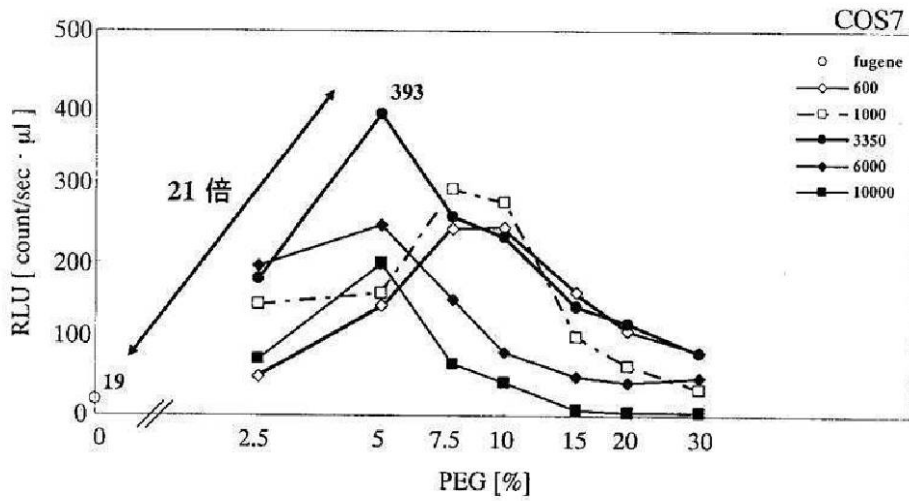
【 図 5 】



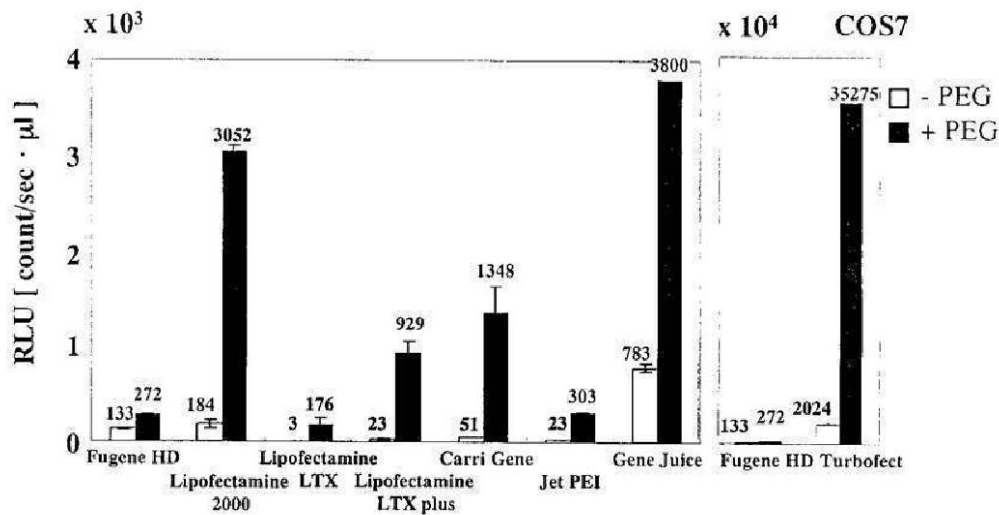
【 図 6 】



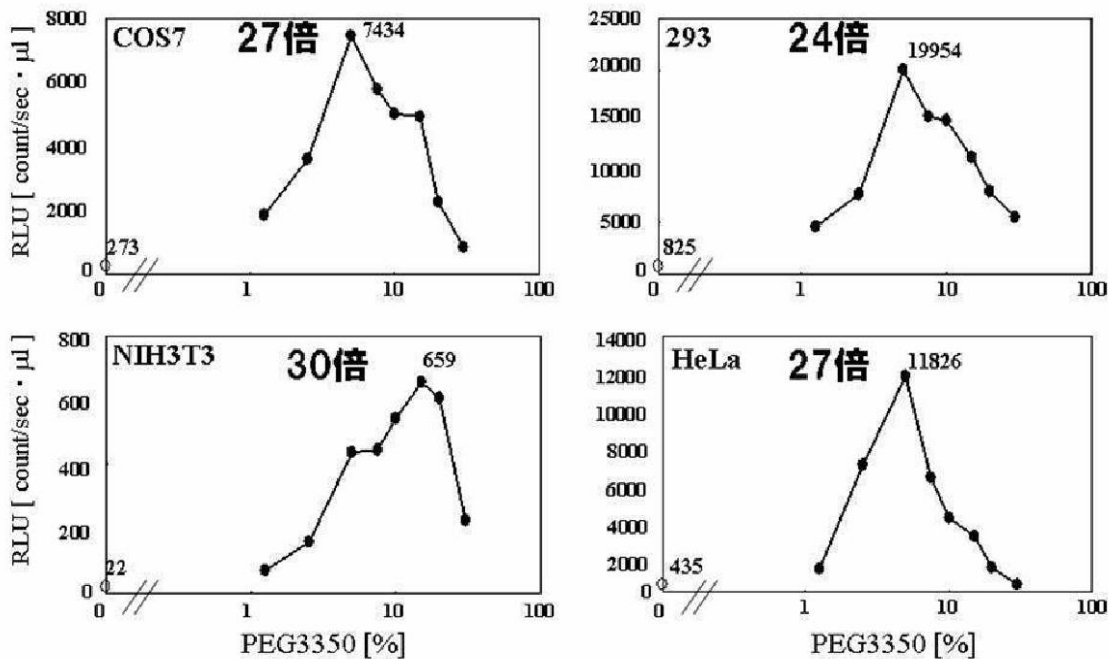
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

201111467800001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成23年9月22日(2011.9.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

トランスファーRNA (tRNA) を含有し、リポフェクション試薬と併用することを特徴とする、インビトロにおいて哺乳動物細胞へ遺伝子導入効率を向上させる向上剤。

【 請求項 2 】

さらにポリエチレングリコールを併用することを特徴とする請求項 1 記載の向上剤。

【請求項 3】

リポフェクション溶液中の tRNA 濃度が 3 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内となるように用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の向上剤

【請求項 4】

ポリエチレングリコールの分子量が、2000 ~ 6000 の範囲内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向上剤。

【請求項 5】

ポリエチレングリコールの分子量が、3000 ~ 5000 の範囲内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向上剤。

【請求項 6】

トランスファー RNA (tRNA) とリポフェクション試薬とを併用することを特徴とする、インビトロにおいて哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法。

【請求項 7】

以下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする請求項 6 記載の方法。

(a) 目的遺伝子を含む DNA と、 tRNA とを混合する工程；

(b) 前記工程 (a) により作製された混合液に、リポフェクション試薬を添加する工程；

(c) 前記工程 (b) により作製されたリポフェクション溶液を、インビトロにおいて哺乳動物細胞に添加する工程；

【請求項 8】

工程 (b) において、ポリエチレングリコールを併用することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

トランスファー RNA (tRNA) とリポフェクション試薬とを併用することにより、目的遺伝子を哺乳動物細胞へリポフェクションすることを特徴とする、インビトロにおける哺乳動物細胞の形質転換方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/001449
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09 (2006.01) i 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) C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Science Direct		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAITSEV, S. et al., Polyelectrolyte Nanoparticles Mediate Vascular Gene Delivery., Pharmaceut. Res., 2004, Vol.21, No.9, P.1656-1661, entire text	1-7
A	GESLAIN, R. and PAN, T., Functional Analysis of Human tRNA Isodecoders., J. Mol. Biol., Vol.396, 2009.12, P.821-831, entire text	1-7
A	JP 2008-540601 A (Curevac GmbH), 20 November 2008 (20.11.2008), entire text & US 2008/0267873 A1 & EP 1881847 A2 & CN 101203245 A	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 14 April, 2011 (14.04.11)		Date of mailing of the international search report 26 April, 2011 (26.04.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001449

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/046356 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 April 2007 (26.04.2007), entire text & US 2009/0258923 A1 & EP 1946761 A1 & KR 10-2008-0059648 A & CN 101291678 A	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001449

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.: 8, 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of these claims include a method for introducing a gene into a mammalian cell *in vivo*, and therefore include a method for surgery or treatment of the human body. Thus, the inventions of these claims relate
(continued to extra sheet)
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the 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/JP2011/001449

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/001449									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(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 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Science Direct											
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 請求項の番号									
X	ZAITSEV, S. et al., Polyelectrolyte Nanoparticles Mediate Vascular Gene Delivery., Pharmaceut. Res., 2004, Vol.21, No.9, P.1656-1661, 全文	1-7									
A	GESLAIN, R. and PAN, T., Functional Analysis of Human tRNA Isodecoders., J. Mol. Biol., Vol.396, 2009.12, P.821-831, 全文	1-7									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 14.04.2011		国際調査報告の発送日 26.04.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 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) 鈴木 崇之	4B 4152								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 0 1 4 4 9
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 請求項の番号
A	JP 2008-540601 A (クレファク ゲーエムペーハー) 2008.11.20, 全文 & US 2008/0267873 A1 & EP 1881847 A2 & CN 101203245 A	1-7
A	WO 2007/046356 A1 (大塚製薬株式会社) 2007.04.26, 全文 & US 2009/0258923 A1 & EP 1946761 A1 & KR 10-2008-0059648 A & CN 101291678 A	1-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/001449

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. 請求項 8, 9 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、**in vivo** において哺乳動物細胞に遺伝子を導入する方法を包含し、人間を手術又は治療する方法を含むものであるから、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ 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。

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項について作成した。
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項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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ため、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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。