

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月25日 (25.01.2001)

PCT

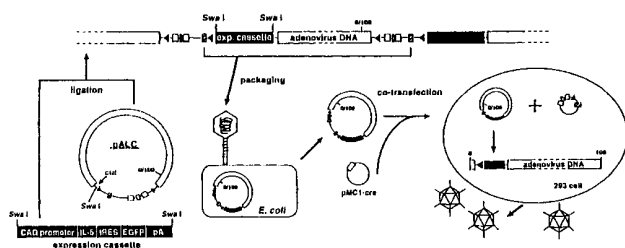
(10) 国際公開番号
WO 01/05989 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/861, 5/10 (MIYAZAKI, Junichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府吹田市上山田6-8-810 Osaka (JP). 田代 文 (TASHIRO, Fumi) [JP/JP]; 〒567-0057 大阪府茨木市豊川4丁目26番12号 ムーリス千里北306号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04815
- (22) 国際出願日: 2000年7月18日 (18.07.2000)
- (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: 特願平11/205355 1999年7月19日 (19.07.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮崎純一
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 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ダンスノート」を参照。



(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING RECOMBINANT ADENOVIRUS VECTOR

(54) 発明の名称: 組換えアデノウイルスベクターの作製方法



cosmid vector sequence from the recombinant cosmid adenovirus vector in the cell. This method makes it possible to conveniently and efficiently construct a recombinant adenovirus vector.

(57) Abstract: A recombinant adenovirus vector comprising an adenovirus genomic DNA and an expression cassette is produced by inserting and ligating a cosmid sequence having recombinase recognition sequences at both ends and the expression cassette into either deletion sites of the adenovirus genomic DNA with the deletion of the E1 domain or E1 and E3 domains to thereby construct a recombinant cosmid adenovirus vector; cotransfecting this recombinant adenovirus vector and a recombinase expression vector into a cell producing adenovirus E1 protein; and eliminating the

WO 01/05989 A1



(57) 要約:

この出願は、E1 領域もしくは E1 および E3 領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA のいずれかの欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列と発現カセットとを挿入結合して組換えコスミドアデノウイルスベクターを製し、この組換えコスミドアデノウイルスベクターとレコンビナーゼ発現ベクターとをアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にコトランスフェクションし、細胞中において組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミドベクター配列を除去することによって、アデノウイルスゲノム DNA および発現カセットからなる DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクターを製造する。この発明の方法によって、組換えアデノウイルスベクターを簡便かつ高効率で作製することが可能となる。

明細書

組換えアデノウイルスベクターの作製方法

5 技術分野

この出願の発明は、組換えアデノウイルスベクターの作製方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、哺乳動物細胞への遺伝子導入に有用な組換えアデノウイルスベクターの作製方法と、この方法に用いる遺伝子操作材料に関するものである。

10

背景技術

近年、分子生物学や分子遺伝学等における知識の蓄積や様々な技術開発により生命科学は大きく発展し、生命現象に関して多くの情報が得られるようになってきている。種々の分野において活発な研究開発が行われているが、中でも、遺伝子機能の解析は大きな比重を占めており、単離した遺伝子を細胞や生物個体に導入するための様々な技術やそのためのベクターが開発されている。

哺乳類の細胞への遺伝子導入に用いられるベクターも数多く開発されているが、最近ではウイルスを利用したベクター（ウイルスベクター）が注目されている。特に、アデノウイルスベクターは分裂する細胞だけでなく、非分裂細胞にも感染し、高いウイルス価に調製することができ、しかも様々な組合せのエンハンサーおよびプロモーターの制御下で目的の遺伝子を発現させることができるため、遺伝子治療への応用も検討されている。

これまでに、組換えアデノウイルスベクターの作製法として、*in vivo* 相同組換えを利用した方法や *in vitro* でライゲーションする方法など、多くの方法が開発されている。また、アデノウイルスゲノムの E1 領域を欠損させたベクターを用いると、導入した遺伝子は発現するが感染性ウイルス粒子は産生されないため、特に遺伝子治療等における有用な遺伝子導入手段として利用されている。

このように、他のウイルスベクターと比較して多くの利点を持つアデノウイルスベクターではあるが、ウイルスゲノムが 36kb と長いため、実際の組換えベクターの構築においては、手順が複雑であったり作製効率が低いといった問題がある。例えば、E1 領域を置き換えた組換えアデノウイルスベクターの作製方法として、2つのプラスミド間での哺乳動物細胞（例えば 293 細胞）における in vivo 5 相同組換えを利用した方法（例えば、Virology 163:614-617, 1988 ; Nucleic Acids Res. 26:3687-3693, 1998）が知られている。これらの方法の場合、第 1 のプラスミドはアデノウイルスゲノムの 5' 端 ITR (inverted terminal repeat)、パッケージングシグナル、目的の遺伝子およびウイルスゲノムの任意部分を含み、第 10 のプラスミドは、第 1 プラスミドと重なるウイルスゲノム部分と 3' 端 ITR を含む残りのウイルスゲノムを保有している。しかしながら、哺乳動物細胞における相同組換えの起こる頻度はかなり低いため、これらの方法では哺乳動物細胞への両プラスミドのトランスフェクションを大量に行う必要がある。

また、別の方法として、COS-TPC 法が提案されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1320-1324, 1996）。これは、全長のアデノウイルスゲノムと目的遺伝子の発現ユニットとを含むコスミドベクターと、制限酵素で消化したウイルス DNA-TPC (terminal protein complex) を同時に哺乳動物細胞にトランスフェクションする15 方法である。この方法は、ウイルス DNA-TPC を用いることによって、目的の組換えアデノウイルスベクターを効率よく回収することができる。しかしながら、この方法の場合には、アデノウイルスゲノムを制限酵素で消化することによってアデノウイルス親株の出現を防止してはいるものの、その除去は完全でなく、安全性の点で問題がある。

さらに別の方法としては、Cre-loxP 組換えシステムを応用した組換えアデノウイルスベクターの作製法が報告されてもいる（J. Virol. 71:1842-1849, 1997）。この方法は、Cre レコンビナーゼが働くことによって、ドナーとなるアデノウイルスと、発現カセットを持つシャトルプラスミドとの間での分子間組換えを生じさせる方法であり、効率よく組換えアデノウイルスベクターを作製することができる。25 しかしながら、この発明の場合には、ドナーウイルスを用意する必要がある。

り、またドナーウイルスが最終的なウイルス試料に残存する可能性がある。

その他にも、コスミドベクターを用いて in vitro で全アデノウイルスゲノムを再構築する試みがなされているが、哺乳動物細胞へのトランスフェクションの前に複雑な DNA 作製過程が必要であり、実用的なものではない。

5 【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり組換えアデノウイルスベクターの作製法に関する様々な報告や提案より以前に、Graham は、アデノウイルス 5 型の E1 領域に 1 カ所のみ存在する制限酵素 Xba I サイトに小さなプラスミドを挿入して構築した環状 DNA を哺乳動物細胞 (293 細胞) にトランスフェクションすると、この環状 DNA はウイルス DNA と同様の効率で感染性ウイルスを産生することを報告している (EMBO J. 3:2917-2922, 1984)。

この報告は、環状アデノウイルス DNA の E1 領域あるいは E3 領域を外来性遺伝子に置き換えることによって、組換えアデノウイルスベクターが簡単に作製できることを示しているが、実際にこの方法で組換えアデノウイルスベクターを構築するに当たっては 2 つの問題が存在した。一つは、アデノウイルスゲノム DNA を含む非常に大きなプラスミドに発現カセットを組み込む効率の低さであり、もう一つの問題は、作製されたアデノウイルスベクターにプラスミド DNA 部分が残ることである。

20 **発明の開示**

この出願の発明は、組換えアデノウイルスベクターを簡便かつ高効率で作製することのできる新しい方法と、この発明を実施するための遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

25 この出願の第 1 の発明は、E1 領域もしくは E1 および E3 領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA のいずれかの欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列と発現カセットとを挿入結合して組換えコスミドアデノウイルスベクターを作製し、この組換えコスミドアデノウイルスベクターとし

コンビナーゼ発現ベクターとをアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にコトランスフェクションし、細胞中において組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミドベクター配列を除去することによって、アデノウイルスゲノム DNA および発現カセットからなる DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクター

5 作製することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターの作製方法である。

この第 1 発明の作製方法においては、レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列であること、またはレコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列であることを好ましい態様とする。

さらに、アデノウイルス E1 タンパク質産生細胞が、ヒト胎児腎細胞由来 293 細胞

10 であることを別の好ましい態様とする。

この出願の第 2 の発明は、E1 領域もしくは E1 および E3 領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA のいずれかの欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列と発現カセットとを挿入結合して組換えコスミドアデノウイルスベクターを作製し、この組換えコスミドアデノウイルスベクターを、

15 レコンビナーゼおよびアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にトランスフェクションし、細胞中において組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミドベクター配列を除去することによって、アデノウイルスゲノム DNA および発現カセットからなる DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクターを作製することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターの作製方法である。

20

この第 2 発明の作製方法においては、レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列であること、またはレコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列であることを好ましい態様とする。

さらに、レコンビナーゼおよびアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞が、レコンビナーゼを産生するヒト胎児腎細胞由来 293 細胞であることを別の好ましい態様とする。

25

この出願は、第 3 の発明として、E1 領域もしくは E1 および E3 領域を欠失さ

せたアデノウイルスゲノム DNA の欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列が挿入結合されていることを特徴とするコスミドアデノウイルスベクターを提供する。

この第3発明のコスミドアデノウイルスベクターにおいては、レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列であること、またはレコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列であることをそれぞれ好ましい態様としている。

この出願は、第4の発明として、FLP レコンビナーゼを産生するヒト胎児腎細胞由来293細胞を提供する。

すなわち、この出願の前記発明においては、「コスミド配列」とは、両端に同方向のレコンビナーゼ認識配列を有する直鎖状のコスミドベクター配列を意味する。また、「コスミドアデノウイルスベクター」とは、E1領域もしくはE1およびE3領域を欠失したアデノウイルスゲノムDNAと前記コスミド配列とからなる環状DNAコンストラクトを意味する。さらに、「組換えコスミドアデノウイルスベクター」とは、前記コスミドアデノウイルスベクターに発現カセットを組み込んだ環状DNAコンストラクトを意味する。さらにまた、「組換えアデノウイルスベクター」とは、前記組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミド配列が除去された直鎖状DNA配列を感染性粒子内に組み込んだアデノウイルスを意味する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で構築したコスミドアデノウイルスベクターpACL(上)と発現カセット(下)の構造を示す模式図である。34kbのアデノウイルスゲノムDNAは白い環で、ゲノムの方向は矢印で示す。7kbのコスミドベクターは黒三角で示す loxP 配列で挟まれており、その中に cos 部位、カナマイシン耐性遺伝子(Km)、大腸菌 ori、アンピシリン耐性遺伝子(Ap)を含む。発現カセットは CAG プロモ

ーター、マウス IL-5 cDNA、IRES、EGFPcDNA、ポリ A 添加シグナル (pA) から成る。発現カセットは pALC ベクターの Swa I サイトに挿入され、実施例 2 の組換えコスミドアデノウイルスベクター pALC-IL-5 が構築される。

- 5 図 2 は、実施例 3 で構築した組換えアデノウイルスベクターの作業工程の概要を示す模式図である。実施例 2 の pALC-IL-5 を大腸菌 DH10B を用いて増殖・精製し、pMC1-cre プラスミドと共に 293 細胞にトランスフェクションした。一過性に発現する Cre レコンビナーゼは、効率よく 7 kb のコスミド配列を切り出し、最終的に、IL-5 と EGFP の発現カセットを含む感染性の組換えアデノウイルス粒子が産生された。
- 10

図 3 A は実施例 3 で構築した組換えアデノウイルスベクター DNA の構造を示す模式図である。アデノウイルスゲノム (白いバー) と IL-5 と EGFP の発現カセット (黒いバー) の結合したものの中に、Cre レコンビナーゼによって除去されたコスミド配列の loxP (黒三角) 1 個が残る。下方の数字はアデノウイルスゲノムのマップユニット (m.u.) を、上方の数字は組換えアデノウイルスベクター DNA を Xba I で消化した場合の断片の長さ (kb) をそれぞれ示す。図 3 B および C は、様々な DNA を Xba I で消化し、0.4% (B) および 0.9% (C) アガロースゲルで電気泳動したパターンを示す図面に代わる写真である：レーン 1 と 2 は pALC-IL-5 と pMC1-cre を 293 細胞にコトランスフェクションして産生されたウイルス DNA；レーン 3 は pFG140 を 293 細胞にトランスフェクションして産生されたウイルス DNA；レーン 4 は pALC-IL-5 DNA。レーン 1 と 2 の DNA はそれぞれ独立したトランスフェクションから得られたウイルスから調製した。loxP で挟まれたコスミド配列は 9.1 kb の DNA 断片に含まれている (レーン 4、黒三角)。

15

20

25

組換えアデノウイルス DNA には 9.1 kb の断片は見られず、2.1 kb 断片が生じている (レーン 1、2、白三角)。レーン M はサイズマーカーを泳動しており、そのサイズを左側に示す (kb)。

図 4 は、実施例 3 で構築した組換えアデノウイルスベクターのプラーク形成と、
プラーク周辺の EGFP の発現を示す図面に代わる写真である。pALC-IL-5 と
pMC1-cre をコトランスフェクションした 293 細胞にはウイルスによるプラーク
が認められる（写真 A、C）。また、組換えアデノウイルスベクターを感染した
5 293 細胞にもプラークが認められる（写真 B、D）。写真 A、B の視野を蛍光顕
微鏡で観察すると、EGFP の蛍光が認められる（C、D）。

発明を実施するための最良の形態

この出願の第 1 発明および第 2 発明の組換えアデノウイルスベクターの作製方
10 法においては、第 3 発明のコスミドアデノウイルスベクターを使用する。このコ
スミドアデノウイルスベクターの調製において、アデノウイルスゲノム DNA（約
36kb）は公知のクローン（例えば、実施例で使用した pFG140 等）を利用するこ
とができる。そして、このゲノム DNA を適当な制限酵素やヌクレアーゼ等で処
理することによって、その E1 領域（約 2.0kb）もしくは E1 領域と E3 領域（約
15 3.0kb）の両方を欠失させた DNA 断片（約 31~34kb）を得ることができる。この
DNA 断片を、開裂して直鎖状にしたコスミド配列とライゲーションし、環状 DNA
コンストラクトを形成する。コスミドベクターは大腸菌 λ ファージの cos 部位を
有するプラスミドであり、30~42kb の外来 DNA を挿入することができるため、
前記の約 34kb の DNA 断片を収納することができる。このコスミド配列はまた、
20 両端にレコンビナーゼ認識配列を有している。この認識配列は、使用するレコン
ビナーゼの種類によって決定され、例えば、Cre レコンビナーゼの場合には loxP
配列を、また、FLP レコンビナーゼの場合には FRT 配列を用いることができる。
例えば、loxP 配列は 34bp の配列であり、公知のクローン（例えば、実施例で使
用した pBS 246 : GIBCO BRL 社製等）から切り出して用いることができる。ま
25 た、FRT 配列は公知のクローン pNEO β GAL（Stratagene 社製等）から切り出し
て用いることができる。さらに、コスミド配列のレコンビナーゼ認識配列の外側
には、アデノウイルスゲノム DNA 接続部位以外に、少なくとも 1 カ所のクロー
ニングサイト（制限酵素部位）を有する DNA 配列を延長させるのが好ましい。

この出願の前記アデノウイルスベクター作製方法においては、以上のとおりに調製した環状のコスミドアデノウイルスベクターに、外来遺伝子を含む発現カセットを挿入結合し、組換えコスミドアデノウイルスベクターを調製する。発現カセットは、プロモーター配列、外来遺伝子（cDNA）およびポリ A シグナル等からなる DNA 断片である。

なお、この出願の前記第 1 および第 2 の方法発明においては、予めコスミドベクター配列と発現カセットを連結し、これと前記アデノウイルス DNA 断片とをライゲーションして組換えコスミドアデノウイルスベクターとすることもできる。あるいは、外来遺伝子（cDNA）を含まない発現カセットを挿入したコスミドアデノウイルスベクターを作製し、この発現カセット内に外来遺伝子（cDNA）を組み込んで組換えコスミドアデノウイルスベクターとすることもできる。

この出願の前記第 1 の発明方法は、次いで、これらの組換えコスミドアデノウイルスベクターを、レコンビナーゼ発現ベクターとともに、アデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にコトランスフェクトする。レコンビナーゼ発現ベクターとしては、例えば、Cre レコンビナーゼまたは FLP レコンビナーゼ発現ベクターを使用することができる。Cre レコンビナーゼは loxP 配列を認識し、2つの loxP 配列に挟まれた DNA 配列を切り出す（Nucleic Acids Res. 17:147-161, 1989）。また、FLP レコンビナーゼは FRT 配列を認識し、2つの FRT 配列に挟まれた DNA 配列を切り出す（Trends Genet. 9:413-421, 1993）。従って、これらのレコンビナーゼ発現ベクターと前記の組換えコスミドアデノウイルスベクターとを共にホスト細胞に導入すると、レコンビナーゼの作用によって環状 DNA の loxP 配列または FRT 配列に挟まれたコスミドベクター配列が切り出され、アデノウイルスゲノム DNA と発現カセットとからなる直鎖状 DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクターが作製される。

Cre レコンビナーゼ発現ベクターとしては、公知のクローン（例えば、実施例で使用した MC1-cre プラスミド等）を使用することができる。また、FLP レコンビナーゼ発現ベクターとしては、pOG44（Stratagene 社製）等を用いることができる。

- 5 アデノウイルス E1 タンパク質産生細胞としてはヒト胎児腎細胞由来 293 細胞が好ましいが、これに限定されるものではなく、例えば、予め E1 タンパク質遺伝子を導入した HeLa 細胞や正常細胞等を用いることができる。あるいはまた、E1 タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニック動物から単離した細胞を用いることもできる。

10

- 一方、この出願の前記第 2 発明の作製方法においては、前記のとおりで作製した組換えコスミドアデノウイルスベクターを、レコンビナーゼおよびアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にトランスフェクトする。すなわち、この方法では、
- 15 宿主細胞がレコンビナーゼを恒常的に産生しているために、組換えコスミドアデノウイルスベクターのみをトランスフェクションすることによって、宿主細胞が産生するレコンビナーゼの作用により環状 DNA のレコンビナーゼ認識配列に挟まれたコスミドベクター配列が切り出され、アデノウイルスゲノム DNA と発現カセットとからなる直鎖状 DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクターが作製される。なお、レコンビナーゼおよび E1 タンパク質産生細胞としては、
- 20 例えば、文献公知の Cre レコンビナーゼ産生 293 細胞（J. Virol. 71:1842-1849, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13565-13570, 1996）や、後記する実施例に示した方法によって作製される Cre レコンビナーゼ産生 293 細胞を用いることができる。また、この出願によって新たに提供される前記第 4 発明の FLP レコンビナーゼ産生 293 細胞を用いることができる。さらには、予め E1 タンパク質遺伝子とレコンビナーゼ遺伝子とを導入した HeLa 細胞や正常細胞、あるいは E1 タンパク質遺伝子とレコンビナーゼ遺伝子とを導入したトランスジェニック動物から単離した細胞等を用いることもできる。
- 25

このようにして作製した組換えアデノウイルスベクターの全長は、野生型アデノウイルスと同様の 36kb 前後であり、様々な動物細胞に対して高い感染力を有している。

- 5 なお、この出願の第 4 発明の FLP レコンビナーゼ産生 293 細胞は、公知の方法によって作製することができる。例えば、FLP レコンビナーゼをコードする DNA 断片を動物細胞用発現ベクターに組込み、このベクターを 293 細胞に導入することによって、FLP レコンビナーゼ産生 293 細胞を作製することができる。FLP レコンビナーゼをコードする DNA 断片は、公知の発現ベクター pOG44 (Stratagene
- 10 社製) 等から切り出して使用することができる。また、動物細胞用発現ベクターには、前記のベクター pOG44 を直接使用することができる他、プロモーター、スプライシング領域、ポリ (A) 付加部位等を有する公知のベクターを使用することができる。発現ベクターを 293 細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いること
- 15 ができる。さらに、FLP レコンビナーゼ発現ベクターには、ピューロマイシン等の薬剤耐性遺伝子を併せて組み込み、ベクターが導入された細胞の選択マーカーとすることもできる。

以下、実施例を示してこの出願の発明を詳細かつ具体的に説明するが、この出

20 願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1

実施例 1 : コスミドアデノウイルスベクターの構築

コスミドベクター SuperCos 1 は Stratagene 社 (La Jolla, CA) より、loxP 配列を

25 含むプラスミド pBS 246 は GIBCO BRL 社 (Rockville, MD) より購入した。pBS 246 の loxP で挟まれる領域中の Hind III サイトを Xba I へ、BamH I サイトを Swa I へ変更した。これを Not I で切断し、2 個の loxP を持つ 260bp の断片を分離した。SuperCos 1 に 1 か所ある Xba I サイトは予め破壊しておき、Not I で切

断したところに2個の loxP を持つ 260bp の断片を挿入し、コスミドベクター配列 (pLC コスミド) を調製した。

アデノウイルスゲノム DNA は pFG140 から調製した。pFG 140 はアデノウイルス 5dl309 の全ゲノムが環状に連結しており、その E1 領域の Xba I サイトに
5 2.2kb のベクター部分を持つプラスミドであるが、この E1 領域の 681~2559bp (ゲノム 5' 端より) を Bal31 ヌクレアーゼによって欠失させ、そこに Xba I サイトを再構築した。

E1 領域を欠失したアデノウイルス DNA と前記 pLC コスミドをそれぞれ Xba I 切断し、ライゲーションした後、in vitro パッケージングによりバクテリオファージラムダの頭部に収容し、41kb のコスミドアデノウイルスベクター (pALC コスミド) を作製した (図 1 参照)。
10

実施例 2 : 組換えコスミドアデノウイルスベクターの構築

様々なタイプの細胞で強く働くことが知られている CAG プロモーター (サイトメガロウイルス初期エンハンサー・ニワトリ β アクチンプロモーターのハイブリッド) の下流にマウスインターロイキン 5 (mIL-5)、EMC ウイルス由来 IRES (Internal ribosome entry site)、pEGFP-N1 プラスミド由来 EGFP (enhanced green fluorescent protein) cDNA を結合し、その両端に Swa I サイトを付加して DNA 断片を調製し、この DNA 断片をカナマイシン耐性の pHSG298 由来のベクターに組み込んだのち、この組換えベクターから Swa I 断片を切り出して発現カセット (4.2kb) を調製した。
20

この発現カセットを、実施例 1 で構築した pALC コスミドの Swa I サイトに挿入した後、in vitro パッケージングによりバクテリオファージラムダの頭部に組み込み、組換えコスミドアデノウイルスベクター (pALC-IL-5) を構築した。このベクターを大腸菌 DH10B を用いて大量調整・精製し、回収した。
25

実施例 3 : 組換えアデノウイルスベクターの構築

実施例 2 で構築した組換えコスミドアデノウイルスベクター (pALC-IL-5) と

Cre レコンビナーゼ発現ベクター (MC1-cre プラスミド) とを、恒常的にアデノウイルス E1 タンパク質を産生しているヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞にコトランスフェクションした。293 細胞の培養液は非働化 10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む MEM (Minimum Essential Medium) を用い、ゼラチンで表面をコートしたシャーレ、あるいはマルチプレートを使用した。

1 μg の pALC-IL-5 と、0.1 μg の MC1-cre プラスミドを 12 穴マルチプレートにまいた 293 細胞に LIPOFECTAMINE (GIBCO BRL 社製) を用いてコトランスフェクションした (図 2 参照)。

細胞変性効果 (CPE) はプラーク形成により 10 日以内で観察された。CPE の観察されたプレートの培養上清を 2,000rpm、5 分間、4 °C で遠心し、その上清を 75cm² のフラスコにまいた 293 細胞に加え感染させた。数日後、全面に CPE が確認できたフラスコについて、細胞を集め凍結・融解を 6 回繰り返したものを 3,500rpm、10 分間、4 °C で遠心し、その上清中に含まれる組換えアデノウイルスベクターの力価を測定した。測定は、ゼラチンコートした 96 穴マルチプレートに播いた 293 細胞に段階希釈したウイルス懸濁液を加え培養し、CPE の有無を観察した結果から算定した。

また、コントロールとして、pALC-IL-5 のみを 293 細胞にトランスフェクションし、同様にプラーク形成を観察した。

その結果、Cre レコンビナーゼが存在しないコントロール条件の場合、別々にトランスフェクションした 8 穴の 293 細胞のいずれにもプラークは認められなかった。これは pALC-IL-5DNA はその長さが 45kb であり、感染性アデノウイルス粒子が収容できる長さを超えているため、ウイルスが産生されなかったことを示している。一方、Cre レコンビナーゼ発現ベクターと共にトランスフェクションした場合には、8 日以内に 8 穴の 293 細胞のすべてにおいて CPE が認められた。それぞれについて繰り返し検討した結果、Cre が共存する場合、合計 22 穴の細胞のすべてでプラークを確認した。

以上の結果により、一過性に発現する Cre レコンビナーゼによって pALC-IL-5 のコスミド配列が効率よく除去され、その結果形成される発現カセットを含む

38kbの環状アデノウイルスベクターゲノムから、感染性の組換えアデノウイルスベクターが産生されたことが確認された。

実施例4：ウイルスDNAの解析

- 5 実施例3で構築した組換えアデノウイルスベクターからコスミド配列が除かれているかどうかを確認するため、そのDNAの構造を解析した。

ウイルス懸濁液を1% SDS、0.2mg/ml プロテアーゼ K、10mM EDTA で37°C、3時間消化し、フェノール、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿したものをアガロースゲルで電気泳動し、ゲルからウイルスDNAを抽出・精製した。ウイルスDNAをXba Iで消化し、0.4%および0.9%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。

図3Aは組換えアデノウイルスベクターゲノムの構造とその中のXba Iサイトを示す。組換えアデノウイルスベクターの懸濁液から精製したウイルスDNAをXba Iで消化し、0.4%アガロースゲル(図3B、レーン1、2)、あるいは0.9%ゲル(図3C、レーン1、2)で電気泳動した。レーン1、2のウイルスDNAは別々にトランスフェクションした細胞から調製した。次にpALC-IL-5DNAをXba Iで消化し同様に電気泳動した。loxP配列で挟まれたコスミド配列を含むXba I断片は9.1kbとして認められるが(図3B、C、レーン4)、組換えアデノウイルスベクターのDNAにおいては2.1kbの断片として認められ(図3C、レーン1、2)、その差はpALC中のloxPで挟まれたコスミド配列(約7kb)に相当する。この結果により、pALC-IL-5中のコスミド配列はCreレコンビナーゼの一過性発現によって効率よく除去され、その結果形成された発現カセットを含む38kbの環状アデノウイルスゲノムが増幅してウイルス粒子に收容され、感染性の組換えアデノウイルスベクターが産生されたことが確認された。予想される
25 大きさ以外のDNA断片は認められず、この方法による組換えアデノウイルスベクター構築過程においては、異常な組換えはほとんど起こらないことも確認された。コントロールとして、アデノウイルスゲノムのクローンpFG140をトランスフェクションした293細胞のDNAをXba Iで消化した場合は、予想された

34.6kb、2.2kb および 1.3kb の各断片が認められた（図 3 B、C、レーン 3）。

実施例 5：発現カセットに含まれる遺伝子の発現

IL-5 の発現を確認するため、感染細胞の培養液を回収、遠心し、その上清中の
5 IL-5 活性を ELISA 法で検討した。また、EGFP の発現は蛍光顕微鏡で観察することにより検討した。

293 細胞に組換えコスミドアデノウイルスベクター pALC-IL-5 と pMC1-cre を
コトランスフェクションすると、多くの細胞が EGFP 陽性となり、ウイルスのプ
ラークが発達するに従い、すべてのプラークの周辺に強い EGFP 蛍光が認められ
10 た（図 4 A、C）。

次に実施例 3 で構築した組換えアデノウイルスベクターの懸濁液を希釈し、
293 細胞に感染させプラークを形成させた。30 個以上のプラークを調べ、そのす
べてが EGFP 陽性細胞で囲まれていることを観察した（図 4 B、D）。IL-5 と
EGFP は CAG プロモーターによって bicistronic に転写されることを考えると、
15 EGFP を発現するアデノウイルスベクターは IL-5 もまた発現することが予想され
る。そこで IL-5 の発現を確かめるために、96 穴マルチプレートにまいた 293 細
胞に限界希釈したウイルス懸濁液を加え、別々のウイルスクローンを増殖させた。
10 個のウイルスクローンについて調べたところ、すべて EGFP は陽性であった。
その培養上清の IL-5 活性を ELISA 法を用いて検討した結果、それぞれ高い価を
20 示した（ $>10 \mu\text{g/ml}$ ）。

以上の結果は、この出願の発明方法が、きわめて均一な組換えアデノウイルス
ベクターを産生することが可能であり、このベクターにより動物細胞中で導入遺
伝子を確実に発現させることが可能であることを示している。

25 実施例 6：Cre レコンビナーゼ産生 293 細胞の作製

Cre レコンビナーゼ遺伝子と EMC ウイルス由来の IRES (Internal ribosome
entry site) 配列およびヒューロマイシン耐性遺伝子を pCAGGS (Gene
108(2):193-199, 1991) の EcoR I サイトに挿入して Cre レコンビナーゼ発現プラ

スミド pCAGGS- cre-puro を構築し、293 細胞にトランスフェクトし、2 μ g の
ヒューロマイシン/ml 含有培地で培養した。ヒューロマイシン耐性コロニーを単
離し、293 細胞にレポータープラスミド pCAG-CAT-Z をトランスフェクションす
ることによって Cre レコンビナーゼ活性をテストした。すなわちこのレポーター
5 プラスミドは、CAG プロモーターと lacZ 遺伝子の間に、loxP 配列で挟まれたク
ロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子が挿入されてお
り、Cre レコンビナーゼの作用によって CAT 遺伝子が切り出されると lacZ が発
現されるため、293 細胞の Cre レコンビナーゼ産生をテストすることができる
(Biochem. Biophys. Res. Commun. 17(2):393-401, 1995)。このテストによっ
10 て、Cre レコンビナーゼ産生能を有する細胞株 293cre15 を得た。

実施例 7 : 293cre15 における組換えアデノウイルスベクターの作製

実施例 2 で構築した組換えコスミドアデノウイルスベクター (pALC-IL-5) 1 μ
g/well を、実施例 6 で作製した 293cre15 にトランスフェクションした。9 ウェ
15 ルのトランスフェクション細胞の全てにおいて CPE が観察され、CPE の全スポ
ットには強い EGFP が観られた。

これらの結果から、レコンビナーゼ産生293細胞を用いることにより、レコンビナーゼ発
現ベクターを使用せずとも、組換えコスミドアデノウイルスベクターから効率よく組換えア
デノウイルスベクターが作製可能であることが確認された。

20

実施例 8 : FLP レコンビナーゼ産生 293 細胞の作製

FLP レコンビナーゼ遺伝子と EMC ウイルス由来の IRES (Internal ribosome
entry site) 配列およびヒューロマイシン耐性遺伝子を pgK (phosphoglycerate
kinase) プロモーターの下流に挿入して FLP レコンビナーゼ発現プラスミド
25 pgK-FLP-puro を構築し、293 細胞にトランスフェクトし、2 μ g のヒューロマイ
シン/ml 含有培地で培養した。ヒューロマイシン耐性コロニーを単離し、293 細
胞にレポータープラスミド pNEO β GAL をトランスフェクションすることによっ
て FLP レコンビナーゼ活性をテストした。すなわちこのレポータープラスミドは、

SV40 プロモーターの下流の lacZ 遺伝子の途中に、FRT 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が挿入されており、FLP レコンビナーゼの作用によってネオマイシン耐性遺伝子が切り出されると lacZ が発現されるため、293 細胞の FLP レコンビナーゼ産生をテストすることができる。このテストによって、FLP レコンビナーゼ産生能を有する細胞株 293FLP を得た。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、哺乳動物細胞に感染力を有する組換えアデノウイルスベクターを簡便かつ効率よく作製することが可能となる。例えば、従来の相同組換えを用いた組換えアデノウイルスベクターの作製方法では、予想外の組換えベクターが製造される危険性があり、また、製造過程が複雑で長時間の工程を必要とするが、この発明の方法は複雑な作業工程を必要とせず、しかも所望の構造と機能とを有する組換えベクターを確実に製造することが可能である。また、従来の相同組換えを用いた方法では、使用する 293 細胞の継代数が 50 以下である必要があるが、この出願の発明方法では、少なくとも 70 代以上継代した 293 細胞を用いても組換えアデノウイルスベクターの製造が可能である。

従って、この出願の発明により提供される方法および材料によって、哺乳動物細胞を用いた遺伝子機能解析が促進される。また、遺伝子治療のためのベクター開発も促進される。

請求の範囲

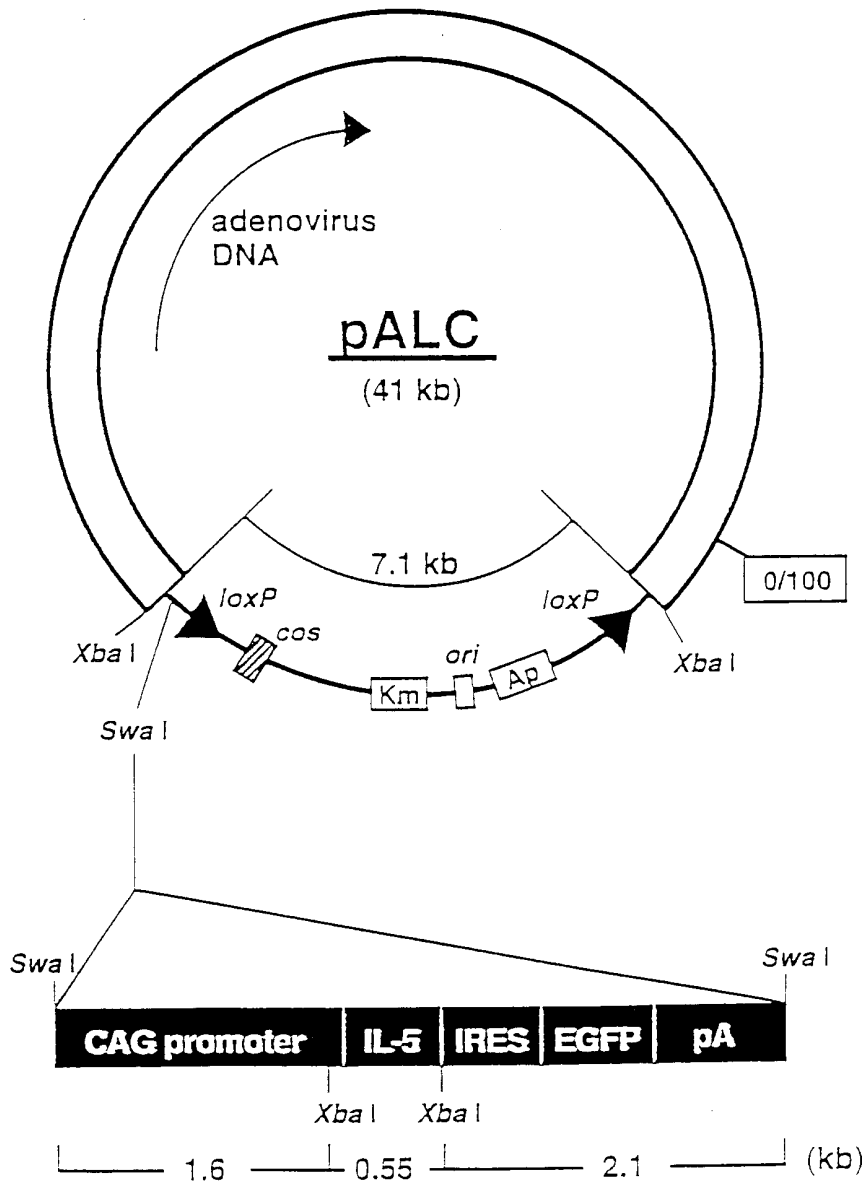
1. E1領域もしくはE1およびE3領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA
のいずれかの欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列
5 と発現カセットとを挿入結合して組換えコスミドアデノウイルスベクターを作製
し、この組換えコスミドアデノウイルスベクターとレコンビナーゼ発現ベクター
とをアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞にコトランスフェクションし、細胞
中において組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミドベクター配列を
除去することによって、アデノウイルスゲノム DNA および発現カセットからな
10 る DNA 配列を有する組換えアデノウイルスベクターを作製することを特徴とす
る組換えアデノウイルスベクターの作製方法。
2. レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列
である請求項 1 の作製方法。
15
3. レコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列
である請求項 1 の作製方法。
4. アデノウイルス E1 タンパク質産生細胞が、ヒト胎児腎細胞由来 293 細胞
20 である請求項 1 から請求項 3 のいずれかの作製方法。
5. E1領域もしくはE1およびE3領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA
のいずれかの欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列
と発現カセットとを挿入結合して組換えコスミドアデノウイルスベクターを作製
25 し、この組換えコスミドアデノウイルスベクターを、レコンビナーゼおよびアデ
ノウイルス E1 タンパク質産生細胞にトランスフェクションし、細胞中において
組換えコスミドアデノウイルスベクターからコスミドベクター配列を除去するこ
とによって、アデノウイルスゲノム DNA および発現カセットからなる DNA 配列

を有する組換えアデノウイルスベクターを作製することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターの作製方法。

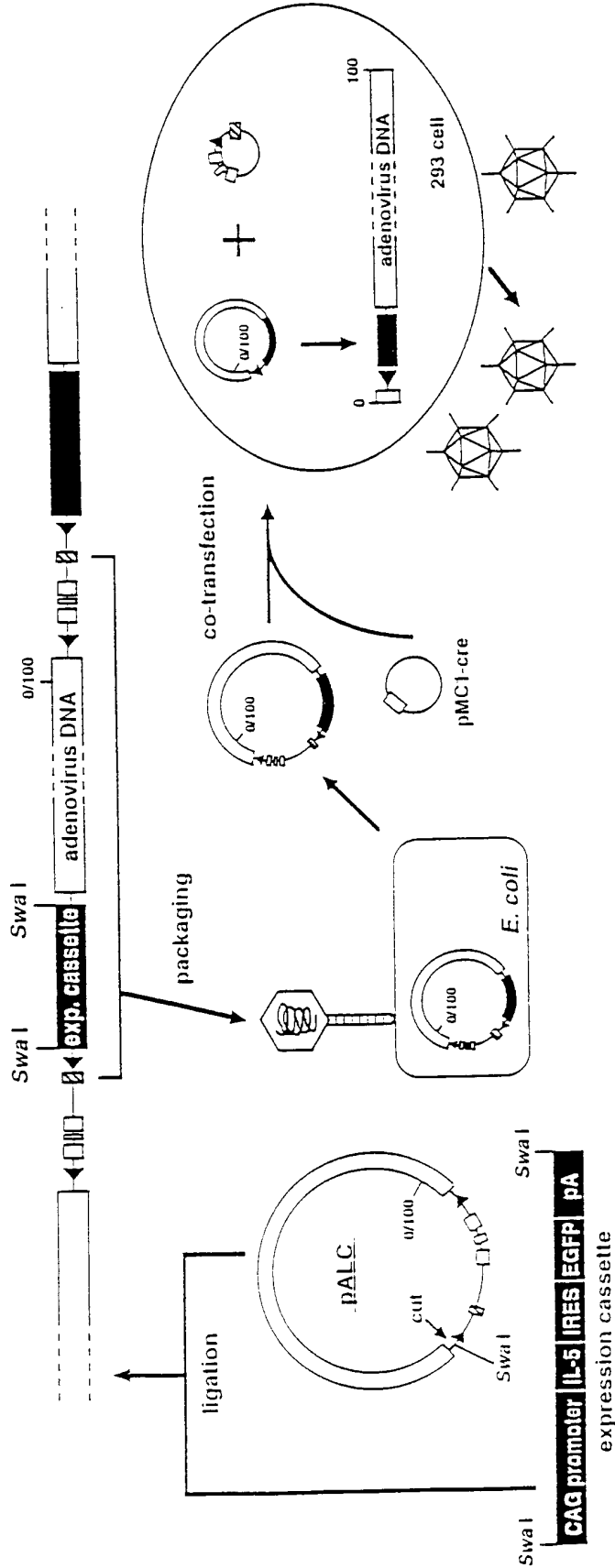
6. レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列
5 である請求項 5 の作製方法。
7. レコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列
である請求項 5 の作製方法。
- 10 8. レコンビナーゼおよびアデノウイルス E1 タンパク質産生細胞が、レコン
ビナーゼを産生するヒト胎児腎細胞由来 293 細胞である請求項 5 から 7 のいずれ
かの作製方法。
9. E1 領域もしくは E1 および E3 領域を欠失させたアデノウイルスゲノム DNA
15 の欠失部位に、レコンビナーゼ認識配列を両端に有するコスミド配列が挿入結合
されていることを特徴とするコスミドアデノウイルスベクター。
10. レコンビナーゼが Cre レコンビナーゼであり、その認識配列が loxP 配列
である請求項 9 のコスミドアデノウイルスベクター。
20
11. レコンビナーゼが FLP レコンビナーゼであり、その認識配列が FRT 配列
である請求項 9 のコスミドアデノウイルスベクター。
12. FLP レコンビナーゼを産生するヒト胎児腎細胞由来 293 細胞。

1/4

☒ 1

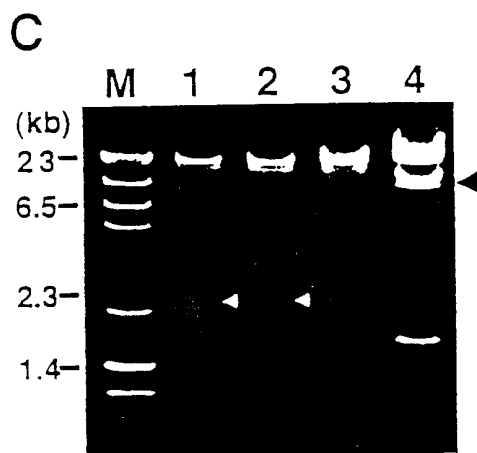
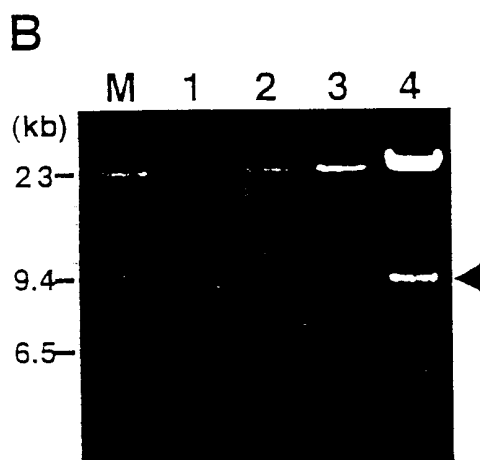
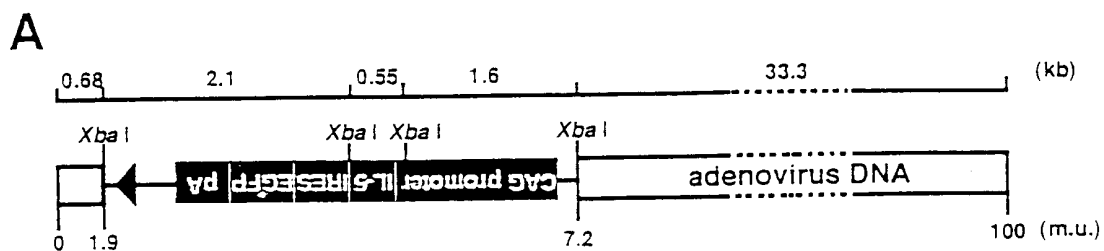


2



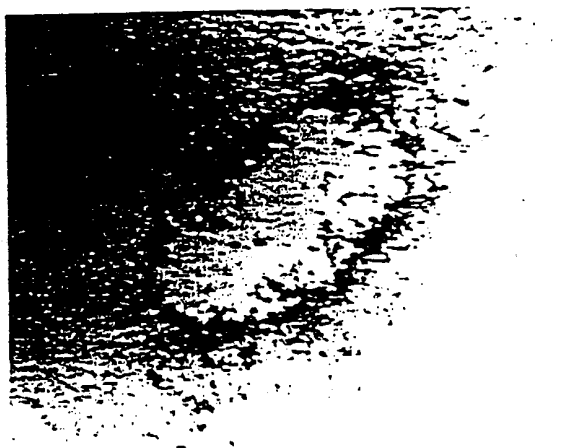
3/4

3



4 / 4

☒ 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/04815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/861, 5/10

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

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)
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A Y	Journal of Virology, 71(3), March 1997 Stephen Hardy et al., "Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination", pp.1842-1849	1-11 12
A Y	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, November 1996 Frank L.Graham et al., "A helper-dependent adenovirus vector system:Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal", pp.13565-13570	1-11 12
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, February 1996 Sanae Miyake et al., "Efficient generation of recombinant adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome", pp.1320-1324	1-12
A	Acta Paediatrica Japonica, 38, 1996 Yumi Kanegae et al., "Adenovirus vector technology : An efficient method for constructiong recombinant adenovirus and on/off switching of gene expression", pp.182-188	1-12
A	Human Gene Therapy, 8(11), July 1997 Fu S, Deisseroth AB, "Use of the cosmid adenoviral vector	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
10 October, 2000 (10.10.00)

Date of mailing of the international search report
24 October 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.


Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04815

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	cloning system for the invitro construction of recombinant adenoviral vectors", pp.1321-1330	
Y	Gene, 166(1), December 1995	12
A	Snaith MR et al., "Multiple cloning sites carrying loxP and FRT recognition sites for the Cre and Flp site-specific recombinases", pp.173-174	1-11
Y	Somatic Cell and Molecular Genetics, 22(6), 1996	12
A	Liane Chen et al., "Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre", pp.477-488	1-11
P, X	Human Gene Therapy, 10, July 1999 Fumi Tashiro et al., "Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system", pp.1845-1852	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ⁷ C12N15/861, 5/10	
B. 調査を行った分野	
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ⁷ C12N15/00-15/90	
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/WPI (STN)	
C. 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
A Y	Journal of Virology, 71(3), Mar. 1997 Stephen Hardy et al., "Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination", p. 1842-1849
A Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, Nov. 1996 Frank L. Graham et al., "A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal", p. 13565-13570
	関連する 請求の範囲の番号
	1-11 12
	1-11 12
<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 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日	10.10.00
国際調査報告の発送日	24.10.00
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 恵理子 
	4B 9838
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, Feb. 1996 Sanae Miyake et al., "Efficient generation of recombinant adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome", p.1320-1324	1-12
A	Acta Paediatrica Japonica, 38, 1996 Yumi Kanegae et al., "Adenovirus vector technology: An efficient method for constructiong recombinant adenovirus and on/off switching of gene expression", p.182-188	1-12
A	Human Gene Therapy, 8(11), July 1997 Fu S, Deisseroth AB, "Use of the cosmid adenoviral vector cloning system for the in vitro construction of recombinant adenoviral vectors", p.1321-1330	1-12
Y	Gene, 166(1), Dec. 1995	12
A	Snaith MR et al., "Multiple cloning sites carrying loxP and FRT recognition sites for the Cre and Flp site-specific recombinases", p.173-174	1-11
Y	Somatic Cell and Molecular Genetics, 22(6), 1996	12
A	Liane Chen et al., "Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre", p.477-488	1-11
P, X	Human Gene Therapy, 10, July 20 1999 Fumi Tashiro et al., "Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system", p.1845-1852	1-12