

(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2017-70224  
(P2017-70224A)

(43) 公開日 平成29年4月13日(2017.4.13)

(5) Int.Cl.	F I	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 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-198160 (P2015-198160)  
(22) 出願日 平成27年10月6日 (2015.10.6)

(71) 出願人 504147243  
国立大学法人 岡山大学  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号  
(74) 代理人 100088904  
弁理士 庄司 隆  
(74) 代理人 100124453  
弁理士 資延 由利子  
(74) 代理人 100135208  
弁理士 大杉 卓也  
(74) 代理人 100152319  
弁理士 曾我 亜紀  
(72) 発明者 阪口 政清  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号  
国立大学法人岡山大学内

最終頁に続く

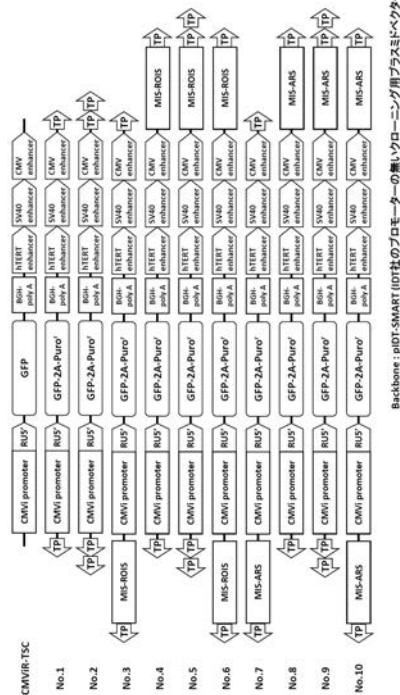
(54) 【発明の名称】 遺伝子発現用カセット及びその産生物

(57) 【要約】

【課題】目的タンパク質を安定かつ高産生するための遺伝子発現用カセットを提供する

【解決手段】発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)が、プロモーター(P)とエンハンサー(P')で挟まれる構造を有する遺伝子発現用カセットにおいて、さらにプロモーター(P)の上流及びエンハンサー(P')の下流にトランスポゾン配列(T)を含むことを特徴とする、遺伝子発現用カセットによる。さらに、上記において、トランスポゾン配列(T)とともに、複製開始配列(S)の上流に核マトリックス結合配列(M)を組み合わせて適宜配置することで、より効果的に目的タンパク質を安定的かつ大量に産生することができる。例えばヒスチジンリッチ糖タンパク質(HRG)や抗体を安定的かつ大量に産生することができる。

【選択図】図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）が、プロモーター（P）とエンハンサー（P'）で挟まれる構造を有する遺伝子発現用カセットにおいて、さらにプロモーター（P）の上流及びエンハンサー（P'）の下流にトランスポゾン配列（T）を含むことを特徴とする、遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 2】

さらに、プロモーター（P）の上流及び／又はエンハンサー（P'）の下流に、複製開始配列（S）が配置されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の遺伝子発現用カセット。

10

## 【請求項 3】

プロモーター（P）、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）、エンハンサー（P'）及びトランスポゾン配列（T）が含まれ、更に選択的に複製開始配列（S）を含む遺伝子発現用カセットが、以下の 1）～ 4）のいずれかに示す順序で含まれる、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子発現用カセット：

- 1）（T）、（P）、（X）、（P'）、（T）；
- 2）（T）、（S）、（P）、（X）、（P'）、（T）；
- 3）（T）、（P）、（X）、（P'）、（S）、（T）；
- 4）（T）、（S）、（P）、（X）、（P'）、（S）、（T）。

20

## 【請求項 4】

複製開始配列（S）の上流に核マトリックス結合配列（M）が配置されていることを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 5】

トランスポゾン配列（T）、プロモーター（P）、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）、エンハンサー（P'）、核マトリックス結合配列（M）、複製開始配列（S）及びトランスポゾン配列（T）を含む、遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 6】

複製開始配列（S）が、ROIS及び／又はARSである請求項 2 ～ 5 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

30

## 【請求項 7】

プロモーター（P）が、CMVプロモーター、CMV-iプロモーター、SV40プロモーター、hTERTプロモーター、アクチンプロモーター及びCAGプロモーターからなる群から選択されるプロモーターである、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 8】

発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）の下流に連結したエンハンサー（P'）が、hTERTエンハンサー、CMVエンハンサー及びSV40エンハンサーから選択されるいずれか 1 種又は複数種を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 9】

発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）において、発現させようとする遺伝子が、疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質をコードするDNAである、1 ～ 8 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

40

## 【請求項 10】

疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質が、ヒスチジンリッチ糖タンパク質（HRG）である、請求項 9 に記載の遺伝子発現用カセット。

## 【請求項 11】

疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質が、抗体である、請求項 9 に記載の遺伝子発現用カセット。

50

**【請求項 1 2】**

請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセットを含む、遺伝子発現用プラスミド。

**【請求項 1 3】**

請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセットを含む、遺伝子発現用ベクター。

**【請求項 1 4】**

請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の発現用カセットを用いて発現させようとする遺伝子を発現させる方法。

**【請求項 1 5】**

請求項 1 0 に記載の遺伝子発現用カセットを用いて産生されたヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG)。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、組換えタンパク質を大量かつ安定的に産生しうる遺伝子発現用カセットに関し、さらには当該遺伝子発現用カセットを用いた遺伝子の発現方法及びその産生物に関する。具体的には、プロモーター、エンハンサー等を含む遺伝子発現用カセットに関し、さらには当該プロモーター、エンハンサー等を用いて遺伝子の発現を上昇させる方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

遺伝子発現効率を上昇させるために、CMVプロモーターやCAGプロモーターなど様々な遺伝子発現プロモーターが開発されている (特許文献 1 ~ 3)。本発明者らが開発したプロモーター、エンハンサーなどの組み合わせを最適化し、大半の哺乳細胞で遺伝子の発現を上昇させるシステムもその 1 つである (特許文献 4、非特許文献 1、2 を参照)。

**【0003】**

より高い効率で遺伝子を発現させることができるシステムの開発を試み、様々な遺伝子のプロモーターやエンハンサーの組み合わせによるプロモーター活性の比較、検討を行うことにより、プロモーターの下流に発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含む DNA 構築物の下流にエンハンサー又は第 2 のプロモーターが連結した、遺伝子の発現用カセットを用いることで、遺伝子を高効率で発現させ得ることが本発明者らにより見いだされ、報告されている (特許文献 4、非特許文献 1、2 を参照)。しかしこのベクターは、細胞の一過性発現に有効なベクターであり、現在、医薬品生産の現場で求められる目的タンパク質を安定かつ高産生する哺乳動物細胞を作製するためには、さらにベクターを改良する必要があった。

**【0004】**

一般的に、遺伝子組換えの手法による目的タンパク質を安定かつ高産生させる細胞を取得するためには、宿主細胞内の染色体に目的遺伝子を組み込み、遺伝子増幅を利用し、目的遺伝子が多コピー組み込まれた細胞を構築する。その方法として最も頻繁に用いられているのが、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 欠損株 CHO-DG44 細胞を用いた方法である。具体的には、目的遺伝子及び DHFR 遺伝子を含むベクターを細胞に導入し、目的遺伝子が多コピー組み込まれた細胞を取得する (非特許文献 3、4 を参照)。しかしながら、係る DHFR 欠損細胞を用いた方法は、DHFR 阻害剤である methotrexate (MTX) の濃度を段階的に増加させながら培養し、高濃度の MTX 耐性のクローンを選択することにより、MTX の濃度を段階的に増加させながら培養を行う必要があるため、クローンの取得に時間がかかり、他の細胞への汎用性が低いなどの問題点がある。

**【0005】**

上述したごとく、遺伝子発現効率を上昇させるための技術は、様々なプロモーターの開発などにより、改良が進められている。しかし哺乳動物細胞におけるタンパク質の産生系

10

20

30

40

50

は、大腸菌や酵母など他の宿主と比較して十分なタンパク質を得ることが難しい。バイオテクノロジーの分野では、これらの従来技術を用いても、細胞の種類や遺伝子の種類によって、遺伝子発現がほとんど起こらない、又は発現タンパク質量が極めて少ないといった問題が日常的に発生している。また、この問題は、遺伝子発現を診断や治療に用いる医療の発展において、大きな障壁となっている。

【0006】

例えば、HRG (Histidine-rich glycoprotein) は、1972年にHeimburger et al (1972) によって同定された分子量約80 kDaの血漿タンパク質である。合計507個のアミノ酸より構成され、そのうちヒスチジンが66存在する高ヒスチジン含有タンパク質であり、主として肝臓で合成され、約100~150 µg/mLという非常に高いと考えられる濃度でヒト血漿中に存在する。しかしながら、HRGの臨床的意義を検討するために、遺伝子組み換え技術によって充分量のHRGを産生する方法が望まれていた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第2814433号公報

【特許文献2】米国特許第5168062号公報

【特許文献3】米国特許第5385839号公報

【特許文献4】国際公開第2011/062298号公報

【非特許文献】

20

【0008】

【非特許文献1】Sakaguchi M. et al., Mol Biotechnol. 56(7), 621-30 (2014)

【非特許文献2】Watanabe M. et al., Oncol Rep. 31(3), 1089-95 (2014)

【非特許文献3】Chasin LA. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 77(7), 4216-20 (1980)

0)

【非特許文献4】Kaufman RJ. et al., Mol Cell Biol. 3(4), 699-711 (1983)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、目的タンパク質を安定かつ高産生するための遺伝子発現用カセットを提供することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本願発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)が、プロモーター(P)とエンハンサー(P')で挟まれる構造を有する遺伝子発現用カセットに、さらにプロモーター(P)の上流とエンハンサー(P')の下流に、各々トランスポゾン配列(T)を含む遺伝子発現用カセットを用いることで目的タンパク質を安定かつ高産生できることを見出し、本発明を完成した。

【0011】

すなわち本発明は、以下よりなる。

40

1. 発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)が、プロモーター(P)とエンハンサー(P')で挟まれる構造を有する遺伝子発現用カセットにおいて、さらにプロモーター(P)の上流及びエンハンサー(P')の下流にトランスポゾン配列(T)を含むことを特徴とする、遺伝子発現用カセット。

2. さらに、プロモーター(P)の上流及び/又はエンハンサー(P')の下流に、複製開始配列(S)が配置されていることを特徴とする、前項1に記載の遺伝子発現用カセット。

3. プロモーター(P)、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)、エンハンサー(P')及びトランスポゾン配列(T)が含まれ、更に選択的に複製開始配列(S)を含む遺伝子発現用カセットが、以下の1)~4)のいずれかに示す順

50

序で含まれる、前項 1 又は 2 に記載の遺伝子発現用カセット：

- 1) (T)、(P)、(X)、(P')、(T)；
- 2) (T)、(S)、(P)、(X)、(P')、(T)；
- 3) (T)、(P)、(X)、(P')、(S)、(T)；
- 4) (T)、(S)、(P)、(X)、(P')、(S)、(T)。

4. 複製開始配列 (S) の上流に核マトリックス結合配列 (M) が配置されていることを特徴とする前項 2 又は 3 に記載の遺伝子発現用カセット。

5. トランスポゾン配列 (T)、プロモーター (P)、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X)、エンハンサー (P')、核マトリックス結合配列 (M)、複製開始配列 (S) 及びトランスポゾン配列 (T) を含む、遺伝子発現用カセット

10

6. 複製開始配列 (S) が、ROIS及び / 又はARSである前項 2 ~ 5 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

7. プロモーター (P) が、CMVプロモーター、CMV-iプロモーター、SV40プロモーター、hTERTプロモーター、アクチンプロモーター及びCAGプロモーターからなる群から選択されるプロモーターである、前項 1 ~ 6 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

8. 発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X) の下流に連結したエンハンサー (P') が、hTERTエンハンサー、CMVエンハンサー及びSV40エンハンサーから選択されるいずれか 1 種又は複数種を含む、前項 1 ~ 7 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

20

9. 発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X) において、発現させようとする遺伝子が、疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質をコードするDNAである、1 ~ 8 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセット。

10. 疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質が、ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) である、前項 9 に記載の遺伝子発現用カセット。

11. 疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質が、抗体である、前項 9 に記載の遺伝子発現用カセット。

12. 前項 1 ~ 11 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセットを含む、遺伝子発現用プラスミド。

30

13. 前項 1 ~ 11 のいずれかに記載の遺伝子発現用カセットを含む、遺伝子発現用ベクター。

14. 前項 1 ~ 11 のいずれかに記載の発現用カセットを用いて発現させようとする遺伝子を発現させる方法。

15. 前項 10 に記載の発現用カセットを用いて産生されたヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) 。

【発明の効果】

【0012】

本発明は、一過性発現に適した遺伝子発現用カセット (例えば、特許文献 4 に示す pCMV iR-TSCベクター) を「トランスポゾン配列 (T)」で挟むことにより、染色体に高効率に高コピー数の遺伝子発現用カセットを挿入することを可能にする。さらに「複製開始配列 (S)」、「核マトリックス結合配列 (M)」を遺伝子発現用カセットの上流又は下流、もしくは上流と下流に連結させることにより、遺伝子発現用カセットのコピー数を高効率に増幅させることが可能となる。具体的には、「プロモーター (P)」の上流に「トランスポゾン配列 (T)」、「プロモーター (P)」の下流に「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X)」の下流に「エンハンサー (P')」、さらにその下流に「核マトリックス結合配列 (M)」、「複製開始配列 (S)」、「トランスポゾン配列 (T)」を連結させることにより、目的タンパク質を安定かつ高産生する細胞が得られる。本発明の新規な遺伝子発現用ベクターは、薬剤選択後の安定発現細胞株にも関

40

50

ならず、従来の遺伝子発現用ベクターと比較して数倍から数十倍の高産生を達成したpCMV iR-TSCベクターの一過性発現量を更に凌駕する発現量を達成した。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】一過性発現において、最も高効率にタンパク質を産生可能な発現ベクターpCMViR-TSCのコンストラクトの構造を示す図である。IDT社のプロモーターのないクローニング用プラスミドベクター(pIDT-SMART)に、一過性発現用の遺伝子発現用カセットを挿入した遺伝子発現用プラスミドベクターを示す図である。(実施例1)

【図2】実施例にて具体的に構築したNo.1~10の各種遺伝子発現用カセットの構成を示す概念図である。(実施例1、2)

【図3】「プロモーター(P)」の上流の5'側TP(5'TP)の塩基配列(配列番号1)及び5'側TP領域の全配列(配列番号2)を示す図である。(実施例1)

【図4】「エンハンサー(P')」の下流の3'側TP(3'TP)の塩基配列(配列番号3)及び3'側TP領域の全配列(配列番号4)を示す図である。(実施例1)

【図5-1】No.4遺伝子発現ベクターの全塩基配列の一部(配列番号8の一部)を示す図である。(実施例2)

【図5-2】No.4遺伝子発現ベクターの全塩基配列の一部(配列番号8の一部、図5-1の続き)を示す図である。(実施例2)

【図5-3】No.4遺伝子発現ベクターの全塩基配列の一部(配列番号8の一部、図5-2の続き)を示す図である。(実施例2)

【図6-1】No.1遺伝子発現ベクターの全塩基配列の一部(配列番号9の一部)を示す図である。(実施例2)

【図6-2】No.1遺伝子発現ベクターの全塩基配列の一部(配列番号9の一部、図6-1の続き)を示す図である。(実施例2)

【図7】No.1~10の各遺伝子発現ベクター及びコントロールを導入したCHO細胞について、各細胞のGFP蛍光強度を測定した結果を示す図である。(実施例2)

【図8】No.1~10の各遺伝子発現ベクター及びコントロールを導入したHEK293T細胞について、各細胞のGFP蛍光強度を測定した結果を示す図である。(実施例2)

【図9】No.1~10の各遺伝子発現ベクターを導入したCHO細胞について、各細胞のGFP蛍光強度を、タンパク質量値により補正した結果を示す図である。(実施例2)

【図10】No.1~10の各遺伝子発現ベクターを導入したHEK293T細胞について、各細胞のGFP蛍光強度を、タンパク質量値により補正した結果を示す図である。(実施例2)

【図11】ヒスチジンリッチ糖タンパク質(HRG)を作製するためのHRG搭載コンストラクト(No.4-HRG)の構造を示す図である。(実施例3)

【図12】No.4-HRG遺伝子発現用カセットを含むベクターを用いて作製したHRGについて、好中球の培養系にHRGを加えたときに好中球の形態に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。(実験例3-1)

【図13】No.4-HRG遺伝子発現用カセットを含むベクターを用いて作製したHRGについて、CLP敗血症モデルマウスの生存率に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。(実験例3-2)

【図14】No.4-HRG遺伝子発現用カセットを含むベクターを用いて作製したHRGについて、活性酸素分子種の産生抑制活性に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。(実験例3-3)

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書において「遺伝子発現用カセット」とは、発現させようとするタンパク質を遺伝子組換え操作によって発現可能とするためのDNAのセットをいい、より具体的には、目的タンパク質をコードする遺伝子(発現させようとする遺伝子)を含み、さらに当該遺伝子を発現可能とするための各種DNA配列を含むDNAのセットをいう。

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書において「遺伝子発現用カセット」には、少なくとも「プロモーター（P）」、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）」及び「エンハンサー（P'）」の機能を有する各DNAを含み、さらに「トランスポゾン配列（T）」を含むことを特徴とする。さらに、「複製開始配列（S）」や「核マトリックス結合配列（M）」を含んでいてもよい。

【0016】

本発明の「遺伝子発現用カセット」は、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）」が、少なくとも「プロモーター（P）」と「エンハンサー（P'）」で挟まれる構造を有し、さらに「プロモーター（P）」の上流、及び「エンハンサー（P'）」の下流に「トランスポゾン配列（T）」を含むことを特徴とする。さらに、

10

【0017】

本発明は、一過性発現に適した遺伝子発現用カセット（例えば、特許文献4に示すpCMV iR-TSCベクター）を「トランスポゾン配列（T）」で挟むことにより、染色体に高効率に高コピー数の遺伝子発現用カセットを挿入することを可能にする。さらに「複製開始配列（S）」、「核マトリックス結合配列（M）」を遺伝子発現用カセットの上流又は下流、或いは上流と下流に連結させることにより、遺伝子発現用カセットのコピー数を高効率に増幅させることが可能となる。具体的には、「プロモーター（P）」の上流に「トランスポゾン配列（T）」、「プロモーター（P）」の下流に「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）」、その下流に「エンハンサー（P'）」、さらにその下流に「核マトリックス結合配列（M）」、「複製開始配列（S）」、「トランスポゾン配列（T）」を連結させることにより、目的タンパク質を安定かつ高産生する細胞が得られる。

20

【0018】

本発明の「遺伝子発現用カセット」は、プロモーターを（P）、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物を（X）、エンハンサーを（P'）及びトランスポゾン配列を（T）、複製開始配列を（S）としたときに、少なくとも以下の1）～4）のいずれかに示す順序で構成される。ここにおいて、「トランスポゾン配列（T）」には、トランスポゾン特定する配列を2回以上連結したものが含まれていてもよい。

30

- 1）（T）、（P）、（X）、（P'）、（T）；
- 2）（T）、（S）、（P）、（X）、（P'）、（T）；
- 3）（T）、（P）、（X）、（P'）、（S）、（T）；
- 4）（T）、（S）、（P）、（X）、（P'）、（S）、（T）。

【0019】

本明細書において、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物（X）」のうち、「発現させようとする遺伝子」は、人工的に挿入した外来タンパク質をコードする遺伝子（DNA）を含み、宿主細胞と由来が異なる遺伝子であってもよいし、由来が同じ遺伝子であってもよい。また、発現遺伝子の検出や疾患の診断のためにレポーター遺伝子が含まれていてもよい。なお、発現させようとする遺伝子を標的遺伝子や目的遺伝子と呼び、産生させようとするタンパク質を標的タンパク質や目的タンパク質と呼ぶ場合もある。また、遺伝子発現用カセットの構築の観点からは、これらの遺伝子を本発明の遺伝子発現用カセットの標的遺伝子の領域に挿入するので、挿入遺伝子ともいい、また外来遺伝子ということもある。「ポリA付加配列（ポリアデニル化配列、polyA）」は自体公知の配列を適用することができ、その由来は限定されず、成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加配列、例えばウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加配列やヒト成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加配列、SV40ウイルス由来のポリA付加配列、ヒトやウサギのグロビン遺伝子由来のポリA付加配列等が挙げられる。ポリA付加配列を遺伝子発現用カセットに含ませることにより、転写効率が增大する。

40

【0020】

50

本明細書において、「発現させようとする遺伝子」の種類は限定されず、組換え体を製造しようとするあらゆるタンパク質をコードするDNAや特定の疾患の治療に用いるために生体内で発現させようとするタンパク質をコードするDNAを用いることができる。「発現させようとする遺伝子」として、疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質をコードするDNAが挙げられる。疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質として、具体的には「ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG)」や「抗体」が挙げられる。

#### 【0021】

HRGをコードする全長cDNA、又はHRGの活性を有する部分をコードするcDNA、例えば、成熟HRGのアミノ酸配列(配列番号10)をコードする全長cDNA、又は部分をコードするcDNAを、発現ベクターにクローニングし、調製することもできる。例えば、GenBank Accession No.NM000412で特定されるヌクレオチドの全体又は部分から、遺伝子組換え技術を用いて調製することもできる。本発明の有効成分としてのHRGは、成熟HRGの全体であっても良いし、成熟HRGのうちHRG活性を有する部分タンパク質又はペプチドであっても良い。さらに、糖鎖を含むものであってもよいし糖鎖がなくても良い。HRGは好中球活性化調節剤として機能し、好中球活性化に起因する疾患の治療薬の有効成分として、利用することができる。HRGは好中球活性化に起因する疾患及び/又は好中球活性化を伴う炎症性疾患の治療方法にも有効である。

10

#### 【0022】

抗体は、重鎖(H鎖)及び軽鎖(L鎖)と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、H鎖はN末端側より可変領域(VH)、定常領域(CH)、L鎖はN末端側より可変領域(VL)、定常領域(CL)により、それぞれ構成される。CHはさらに、N末端側よりCH1、ヒンジ、CH2、CH3の各ドメインより構成される。また、CH2とCH3を併せてFc領域という。本発明の方法によって作製される抗体は、インタクト型抗体又は低分子抗体である抗体フラグメントであってもよい。抗体のクラスとしては、例えばイムノグロブリンG(IgG)、イムノグロブリンA(IgA)、イムノグロブリンE(IgE)、及びイムノグロブリンM(IgM)が挙げられる。本発明の方法によって産生されうる抗体は、IgGであることが好ましい。IgGのサブクラスとしては、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4が挙げられる。本発明の方法によって産生されうる抗体のサブクラスは、用途目的に応じて適宜決定することができ、いずれのサブクラスの抗体であってもよい。抗体フラグメントとしては、Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、Fab'、Fcフラグメント、ダイアボディーからなる群より選択されるその機能的抗体フラグメントが挙げられる。例えば、抗体のFc領域と必要なタンパク質を融合させたFc融合タンパク質(Fc fusion protein)であってもよい。

20

30

#### 【0023】

トランスポゾン(Transposon: TP)とは、細胞内においてゲノム上の位置を転移(transposition)することのできる塩基配列である。動く遺伝子、転置因子(Transposable element)とも呼ばれる。DNA断片が直接転移するDNA型と、転写と逆転写の過程を経るRNA型がある。トランスポゾンは、例えばバクテリアや酵母などの微生物でも発見され、これら転置因子は一定の塩基配列をもったDNAで、バクテリアや酵母などの正常の染色体の構成成分として1細胞あたり複数個存在している。この因子は染色体に組み込まれて存在するので挿入配列(insertion sequence: IS)とも呼ばれる。トランスポゾンは遺伝子導入のベクターや変異原として有用であり、遺伝学や分子生物学において様々な生物で応用されている。本明細書においても、トランスポゾンは遺伝子発現用カセットに組み込まれる。本明細書において、「トランスポゾン配列(T)」とは、上記トランスポゾンを特定する配列をいう。繰り返しになるが、「トランスポゾン配列(T)」には、トランスポゾンを特定する配列を2回以上連結したものが含まれていてもよい。

40

#### 【0024】

DNAの複製反応は染色体上の決まった部位、複製開始点から始まり両方向に進行していく。真核生物の長大な染色体DNAを細胞周期の決まった時期に正確に複製するためには非常に多くの複製開始点が必要であり、それらの活性は時間的、空間的に制御されていると

50



考えられている。さらにDNA複製を含めた染色体上で起こる様々な反応は互いに密接に関連し、染色体の恒常性が保持されている。複製開始が行われる領域には、「複製開始配列」があり、例えば「複製開始配列 (replication origin initiation sequence: ROIS)」や「自立複製配列 (autonomously replicating sequence: ARS)」が挙げられる。

#### 【0025】

核マトリックスとは、核内のクロマチンの保持だけでなく、遺伝子の転写や複製、DNA損傷修復、アポトーシスに代表される様々な核内イベントが機能するための重要な場を構成すると考えられる。複製開始配列と核マトリックス結合領域を含むプラスミドは、細胞内で効率よく遺伝子を増幅すると考えられる。本明細書において、「核マトリックス結合配列 (M)」とは、上記核マトリックスに結合する配列として特定される配列をいう。本発明の「遺伝子発現用カセット」において、「複製開始配列 (S)」とともに「核マトリックス結合配列 (M)」を含むのがより好適である。この場合、「複製開始配列 (S)」よりも上流域において「核マトリックス結合配列 (M)」が配置されているのが好適である。

10

#### 【0026】

本明細書において、「プロモーター」とはDNAを鋳型に転写を開始するDNA上の特定の塩基配列であり、発現させようとする遺伝子上流に配置される。本明細書において使用可能な「プロモーター (P)」は特許文献4に示す「第1のプロモーター」を参照し、「エンハンサー (P')」は特許文献4に示す「エンハンサー」や「第2のプロモーター」の記載を参照することができる。具体的には、以下に説明する。

20

#### 【0027】

本明細書において、「プロモーター (P)」の配列は特に限定されず、自体公知のプロモーターを適用することができる。あらゆる細胞や組織で外来遺伝子の発現を促進させ得る非特異的プロモーターも組織若しくは器官特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、発生若しくは分化特異的プロモーター等の特異的あるいは選択的プロモーターも用いることができる。特に本発明において適用可能なプロモーターとして、感染プラスミドのコピー数を上げるプロモーターや増殖性細胞特異的プロモーターが好適である。具体的には、SV40プロモーター、CMVプロモーター、アクチンプロモーター、CAGプロモーター、EF1- $\alpha$ プロモーター、ユビキチンプロモーターなどが挙げられる。さらに具体的には、例えば、CMV-*i*プロモーター (hCMV + イントロンプロモーター) 等が用いられる。アクチンプロモーターの由来動物種は限定されず、哺乳類アクチンプロモーター、例えば、ヒトアクチンプロモーターやニワトリアクチンプロモーターが用いられる。また、上記のCMV-*i*プロモーター等の人工的なハイブリッドプロモーターも用いることもできる。CMV-*i*プロモーターは米国特許第5168062号明細書や米国特許第5385839号明細書の記載に基づいて合成することができる。また、用途に応じて、癌・腫瘍特異的プロモーターとしてはhTERT (ヒトテロメラーゼ逆転写酵素)、PSA (前立腺特異的抗原)、c-myc、GLUTプロモーターなどが、遺伝子発現を抑制することを目的としたショートヘアピン型RNA (shRNA) を発現させるプロモーターとしてはU6、H1プロモーターなどが、ES細胞・癌幹細胞特異的プロモーターとしてはOCT3/4、NANOGプロモーターなどが、神経幹細胞特異的プロモーターとしてはNestinプロモーターなどが、細胞ストレス感知プロモーターとしてはHSP70、HSP90、p53プロモーターなどが、肝細胞特異的プロモーターとしてはアルブミンプロモーターなどが、放射線感受性プロモーターとしてはTNF- $\alpha$ プロモーターなどが連結されていてもよい。

30

40

#### 【0028】

本明細書において、「エンハンサー (P')」とは、転写により生成するメッセンジャーRNA (mRNA) の量を結果的に増加させるものであれば限定されない。エンハンサーはプロモーターの作用を促進する効果を持つ塩基配列であり、一般的には100bp前後からなるものが多い。エンハンサーは配列の向きにかかわらず転写を促進することができる。本発明で用いられる「エンハンサー (P')」に含まれるエンハンサーは1種類でもよいが、2つ以上の同一のエンハンサーを複数用いたり、又は異なる複数のエンハンサーを組み合

50

わせて用いてもよい。具体的には、その順番は限定されない。例えば、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、hTERT (Telomerase Reverse Transcriptase) エンハンサー等を用いることができる。一例として、hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサーをこの順で連結したものが挙げられる。「エンハンサー ( P ' ) 」は本明細書の「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 ( X ) 」の下流に配置され、遺伝子発現がより強力に発現可能となる。例えば、プロモーターと同様の機能を有し、プロモーターと同様の配列であってもよい。「プロモーター ( P ) 」と「エンハンサー ( P ' ) 」は同じであっても異なってもよい。例えば、「プロモーター ( P ) 」として特異的プロモーターを用いて、「エンハンサー ( P ' ) 」として、非特異的なプロモーターを用いることができる。具体的には、CMV-iプロモーターとCMVエンハンサーの組合せにより、ほぼ全ての細胞 ( 宿主細胞 ) において、あらゆる遺伝子を挿入した場合に、如何なるトランスフェクション試薬を用いた場合においても、発現させようとする遺伝子の強力なタンパク質発現が可能となる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 2 9 】**

本発明において、「エンハンサー ( P ' ) 」に含まれるエンハンサーの他、エンハンサー配列を「プロモーター ( P ) 」の上流に配置することもできる。「プロモーター ( P ) 」の上流に1個以上のエンハンサー配列を挿入することにより、特定の細胞 ( 例えば、特許文献4の実施例に示すHEK293細胞株やMCF7細胞株 ) において、特定の遺伝子、例えば、REIC / Dkk-3遺伝子やCD133遺伝子において、発現がさらに増強される。また、CMVエンハンサーを「プロモーター ( P ) 」の上流に、例えば4個挿入することにより、特定の細胞 ( 例えば、HepG2細胞株やHeLa細胞株 ) によっては、さらに発現の増強が期待される。

**【 0 0 3 0 】**

本発明の「遺伝子発現用カセット」は、遺伝子発現ベクターに組み込み利用することができる。本発明は、本発明の「遺伝子発現用カセット」を含むベクターも含む。

**【 0 0 3 1 】**

発現させようとする遺伝子は、本発明の遺伝子発現用カセットにおいて、発現させようとする遺伝子を挿入する部位は、マルチクローニングサイトとして存在してもよい。この場合、発現させようとする遺伝子をマルチクローニング部位 ( 挿入部位 ) に制限酵素が認識する配列を利用して挿入することができる。このように発現させようとする遺伝子DNA自体が含まれておらず、該DNAを挿入する部分がマルチクローニング部位として含まれる遺伝子発現用カセットも本発明に含まれる。

**【 0 0 3 2 】**

さらに、特許文献4に示すように、RU5'が発現させようとするタンパク質をコードするDNAの直ぐ上流に連結されていてもよい。直ぐ上流とは、他の特定の機能を有するエレメントを介さず直接連結していることをいうが、リンカーとして短い配列が間に含まれていてもよい。さらに、遺伝子発現用カセットの最上流にSV40-oriが連結されていてもよい。SV40-oriはSV40遺伝子の結合領域であり、後にSV40遺伝子を挿入することにより、遺伝子発現が上昇する。上記の各エレメントは、機能的に連結している必要がある。ここで、機能的に連結しているとは、それぞれのエレメントがその機能を発揮して、発現させようとする遺伝子の発現が増強されるように連結していることをいう。

**【 0 0 3 3 】**

本発明の「遺伝子発現用カセット」を挿入するベクターとしては、プラスミド、アデノウイルス ( Ad ) ベクター、アデノ随伴ウイルス ( AAV ) ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等のウイルスベクターや生分解性ポリマーなどの非ウイルスベクターが挙げられる。上記「遺伝子発現用カセット」を導入したベクターを、感染、エレクトロポレーション等の公知の方法により細胞に導入することができる。遺伝子の導入方法は自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができ、例えば公知のトランスフェクション試薬を用いて導入してもよい。

**【 0 0 3 4 】**

さらに、市販のベクターを改変し、本発明の発現用カセットが含まれるようにしてもよい。例えば、pShuttleベクター等の市販のベクターの遺伝子発現用カセットの下流領域にエンハンサーを組み込んで用いることができる。

【0035】

本発明は、さらに、上記の発現させようとする遺伝子発現用カセットを含むウイルスベクターも含まれる。ウイルスベクターのうち例えばAdベクターやAAVベクターは、癌等の疾患の特異的診断又は治療を可能とするが、本発明の遺伝子発現用カセットは、安定的持続的に遺伝子を発現させることができるので、遺伝子発現の用途に応じて用いるのが望ましい。該ウイルスベクターは、ベクターとして使用可能なウイルスゲノム上に、上記の発現させようとする遺伝子発現用カセットを挿入して作製することができる。

10

【0036】

本発明の遺伝子発現用カセットを挿入したベクターを細胞に導入し、該細胞をトランスフェクトすることにより、該細胞で目的遺伝子を発現させ、目的タンパク質を産生することができる。本発明の遺伝子発現用カセットを導入し目的タンパク質を産生させるためには、真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞及び酵母細胞などの細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌、枯草菌、ブレビパチルス属細菌等の細菌細胞が挙げられる。好ましくは、HEK293細胞、CHO細胞、Hela細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞等の哺乳類細胞が用いられる。形質転換された前記の宿主細胞をin vitro又はin vivoで培養して目的とするタンパク質を産生させることができる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM等の公知の培養用培地を使用することができる。産生されたタンパク質は、分泌タンパク質の場合は培養液中から、非分泌タンパク質の場合は細胞抽出物中から公知の方法で精製することができる。目的タンパク質を産生させる場合、細胞に別々の目的遺伝子を含む複数のベクターを同時にトランスフェクトさせて産生してもよい。このようにすることにより、一度に複数のタンパク質を産生することができる。

20

【実施例】

【0037】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

30

【0038】

(実施例1) 遺伝子発現用カセット

本実施例では、各種コンストラクトの「遺伝子発現用カセット」を構築した。具体的には、IDT社のプロモーターのないクローニング用プラスミドベクター(pIDT-SMART)に特許文献4に示す一過性発現において最も高効率にタンパク質を産生可能な遺伝子発現用カセットを挿入することにより、pCMViR-TSC発現ベクターを作製した(図1)。pCMViRとは、CMV-iプロモーターの下流にRU5'配列が挿入されていることを示す。

【0039】

本発明の「遺伝子発現用カセット」は、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)」の上流及び下流に「トランスポゾン配列(T)」、「複製開始配列(S)」、「核マトリックス結合配列(M)」を図2に示すNo.1~No.10の各組み合わせで構築した。

40

【0040】

本実施例において、発現させようとする遺伝子は、GFP(Green fluorescent protein)、Puro<sup>r</sup>(Puromycin耐性)及び2A(2A self-processing peptide - 短い自己プロセッシング性ペプチド)を含み、「GFP-2A-Puro<sup>r</sup>」で示した。また、ポリA付加配列は「BGH polyA」、プロモーター(P)は「CMViRプロモーター」、エンハンサー(P')は、「hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサーを連結したもの」を用いた。図2において、トランスポゾン配列(T)は「TP」、複製開始配列(S)は「ROIS」又は「ARS」、核マトリックス結合配列(M)は「MIS」で示した。トランスポゾン配列(T)には

50

、例えばNo.2, 5, 9で示すように、「TP」で特定される配列が複数含まれていてもよい。

【 0 0 4 1 】

上記において、「プロモーター ( P )」の上流の5'側TP ( 5' TP ) の塩基配列を配列番号 1 に示し、5'側TP領域の全配列を配列番号 2 に示した ( 図 3 参照 ) 。そして、「エンハンサー ( P ' )」の下流の3'側TP ( 3' TP ) の塩基配列を配列番号 3 に示し、3'側TP領域の全配列を配列番号 4 に示した ( 図 4 参照 ) 。また、「複製開始配列 ( S )」のうち、ROISの塩基配列を配列番号 5 に、ARSの塩基配列を配列番号 6 に示した。さらに、MISの塩基配列を配列番号 7 に示した。

【 0 0 4 2 】

5' TP ( 配列番号 1 )

10

CTCGTTCATTACACGTTTTTTGAACCCGTGGAGGACGGGCAGACTCGCGGTGCAAATGTGTTTTACAGCGTGATGGAGCAGA  
TGAAGATGCTCGACACGCTGCAGAACACGCAGCTAGATTAACCCTAGAAAAGATAATCATATTGTGACGTACGTTAAAGAT  
AATCATGTGTAATAATTGACGCATGTGTTTTATCGGTCTGTATATCGAGGTTTTATTTAATTTGAATAGATATTAAGTT  
TTATTATATTTACACTTACATACTAATAATAAAATTCACAAACAATTTATTTATGTTTTATTTATTTATTTAAAAAAAACAA  
AAACTCAAAATTTCTTCTATAAAAGTAACAAAACCTTTTATGAGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCAGGGATGTAATTAC  
GTCCCTCCCCGCTAGGGGACAGCAGCGAGCCGCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCTCCCCCGCATCCCCGAGCCG  
GCAGCGTGCGGGACAGCCGGGCACGGGAAGGTGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAG  
CCTGCAGACACCTGGGGGATACGGGAAAAGGCCCTCCACGGCC

【 0 0 4 3 】

3' TP ( 配列番号 3 )

20

TTCCTGTCCCTCACAGGAACGAAGTCCCTAAAGAAACAGTGGCAGCCAGGTTTAGCCCCGGAATTGACTGGATTCCTTTTT  
TAGGGCCATTGGTATGGCTTTTTCCCGTATCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAGAGG  
AAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCGTGCCCGGGCTGTCCCGCAGCTGCCGGCTCGGGGATGCGGGGGGAGCGCCGGA  
CCGGAGCGAGCCCCGGCGGCTCGCTGCTGCCCCCTAGCGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGGCTTTGGGGGG  
GGGCTGTCCCTGATATCTATAACAAGAAAATATATATAATAAGTTATCACGTAAGTAGAACATGAAATAACAATATAA  
TTATCGTATGAGTTAAATCTTAAAAGTCACGTAAGATAATCATGCGTCATTTTACTCACGCGGTCGTTATAGTTCAA  
AATCAGTGACACTTACCGCATTGACAAGCACGCCTCACGGGAGCTCCAAGCGGCGACTGAGATGTCCTAAATGCACAGCG  
ACGGATTGCGGCTATTTAGAAAGAGAGCAATATTTCAAGAATGCATGCGTCAATTTTACGCAGACTATCTTTCTAGGG  
TTAATCTAGCTGCATCAGGATCATATCGTCGGGTCTTTTTTCCGGCTCAGTCATCGCCCAAGCTGGCGCTATCTGGGCAT  
CGGGGAGGAAGAAGCCCGTGCCCTTTTCCCGCAGGTTGAAGCGGCATGGAAGAGTTTGCCGAGGATGACTGCTGCTGCA  
TTGACGTTGAGCGAAAACGCACGTTTACCATGATGATTCCGGGAAGGTGTGGCCATGCACGCCTTTAACGGTGAAGTGTTC  
GTTCAGGCCACCTGGGATACCAGTTCGTGCGGGCTTTTCCGGACACAGTTCCGGATGGTCAGCCCCAAGCGCATCAGCAA  
CCCGAACAAATACCGGCACAGCCGAACTGCCGTGCCGGTGTGCAGATTAATGACAGCGGTGCCGGCTGGGATATTACG  
TCAGCGAGGACGGGTATCCTGGCTGGATGCCGCAGAAATGGACATGGATA

30

【 0 0 4 4 】

ROIS ( 配列番号 5 )

AATCTGAGCCAAGTAGAAGACCTTTTCCCCTCTACCCCTACTTTCTAAGTCACAGAGGCTTTTTGTTCCCCCAGACACT  
CTTGACAGATTAGTCCAGGCAGAAACAGTTAGATGTCCCAGTTAACCTCCTATTTGACACCACTGATTACCCCATTTGATA  
GTCACACTTTGGGTTGTAAGTGACTTTTTATTTATTTGATTTTTGACTGCATTAAGAGGTCTCTAGTTTTTTACCTCTT  
GTTTCCAAAACCTAATAAGTAACTAATGCACAGAGCACATTGATTTGTATTTATTCTATTTTTAGACATAATTTATTAG  
CATGCATGAGCAAATTAAGAAAAACAACAATAATGAATGCATATATATGTATATGTATGTGTGTACATATACACATATA  
TATATATATTTTTTTCTTTTCTTACCAGAAGGTTTTAATCCAAATAAGGAGAAGATATGCTTAGAACTGAGGTAGAGTT  
TTCATCCATTCTGTCTGTAAAGTATTTTGCATATTTCTGGAGACGCAGGAAGAGATCCATCTACATATCCCAAAGCTGAAT  
TATGGTAGACAAAAGCTCTTCCACTTTTTAGTGCATCAATTTCTTATTTGTGTAATAAGAAAATTGGGAAAACGATCTTCAA  
TATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATAACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTTGTAGCAATTTGACTGA  
TGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAAGTCCAACCTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGAGCC  
AAGGACAGGTACGGCTGTCTACTTACCTCACCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAACTACTCCAGGAGC  
AGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGT  
GTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA  
GGTGAACGTG

40

50

## 【 0 0 4 5 】

ARS ( 配列番号 6 )

TAGCTTGTATTTTTTGTAAATTTAAAAATAATGATGTATTTAAAAACATTTGTATTCTCTATATATATTTTTAAATTTAGTTTA  
 ATTTTCATAAACATTTCTCAAGAGTATATTTTTGTGCAGGGCATATTGCTAGTCATTATGGGATCTATATAGTTATGTTAAA  
 TTTAAAGTATGGTCTTACGGGGGAAGATGATAGAAAATGTACATTTATAAACTTCCTGCAATGTATGAGTTATTATGTTA  
 TAAACTTTTTACATATTTTGACCCATTTAATCCCCATTTTGTAGATGAGTAGACTGAGGCTCATGAAATGATAAAGATTTT  
 CCCATGGTATCAGGAATAAGAGTTGTCAAAGTAAAATTTAAAACCAGGACTTTTTGGCTCCCTAAAGCTATTCTAATGCTAT  
 TATTTCAAGCATAAAGGCTAGTTTTTATGTAAGTTATAAAAAGAGATACACATTTTAC

## 【 0 0 4 6 】

MIS ( 配列番号 7 )

TACCACACAGTCTAAGCTGAACCTGGTTGGTTAACTTGAAAAATGCAGAGATGTAGTTACATCAGCAGTGGGAAGACAAG  
 AAGATCAGTTTTCAGTGGGAGAAGTCATTGCATTGGGAGGGTAATTAACAGAGTGGTAGCATATGTGGAATGTGGGCTCT  
 ATAGATAAGGACTGGCAGGAATGTTGTGTACCAGGGCTGGGGGGATATAGAGGGTAAGGAAGTCTGGCCTTGAAATCAGG  
 GAACAAAAGACAACAAAACCTTAAACGAGCTAAACCTTTGAAGAAGAATTTCTTACTGTAGTCAGCGATCATTATTGTAAA  
 CCTATGACAGTTCTTTCAAAAATATTTTTTCAGACTTGTCAACCGCTGTA

## 【 0 0 4 7 】

( 実施例 2 ) 遺伝子発現用カセットの評価

実施例 1 で構築した No.1 ~ 10 の各種遺伝子発現用カセット ( 図 2 ) を含む発現ベクター  
 ( No.1 ~ 10 の各遺伝子発現ベクター ) を作製した。図 2 に示す pCMViR-TSC を含むベクター  
 をコントロールとした。No.1 ~ 10 の内、CHO 細胞において最も有効な高効率発現プラスミ  
 ドベクターである No.4 遺伝子発現ベクターの全塩基配列を図 5 ( 配列番号 8 ) に示した。  
 また、HEK293T 細胞において最も有効な高効率発現プラスミドベクターである No.1 遺伝子  
 発現ベクターの全塩基配列を図 6 ( 配列番号 9 ) に示した。図 2 に示す各遺伝子発現用カ  
 セットは、目的遺伝子である GFP-2A-Puro をコードする cDNA の配列を EcoRI 制限酵素サイト  
 と XbaI 制限酵素サイトを用いて正方向に挿入した。

## 【 0 0 4 8 】

No.1 ~ 10 の各遺伝子発現ベクター及びコントロールを細胞に各々導入し、以下の手順に  
 従い、GFP 蛍光タンパク質の発現量を蛍光強度で評価した。

10% FCS 含有 GIBCO<sup>(R)</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12  
 (DMEM/F-12) で培養を行った CHO 細胞 ( Chinese Hamster Ovary cells ) 及び HEK293T 細胞  
 ( Human embryonic kidney cells ) を 6 ウェルプレートで 70% ~ 80% までコンフルエント  
 に培養した。FuGENE ( 商標 ) -HD ( 遺伝子導入試薬 ) を用いて、No.1 ~ 10 の各遺伝子発現  
 ベクター及びコントロールを、トランスポゼース発現ベクターと DNA 量 1 : 1 でコトラン  
 スフェクトした。トランスポゼース発現ベクターは、一過性発現用のベクターである pCMV  
 iR-TSC ベクターにトランスポゼース遺伝子を搭載しており、このベクターを No.1 ~ 10 の  
 本発明のトランスポゾン配列 ( TP ) 搭載各遺伝子発現ベクターとコトランスフェクトする  
 ことにより、トランスポゾン配列の末端で遺伝子発現用カセットが切り出され、宿主ゲノ  
 ム中の TTAA 部位に効率よく目的遺伝子が挿入される。このような方法でトランスフェクト  
 した細胞を 24 時間インキュベート後、細胞の GFP 蛍光強度を蛍光プレートリーダー ( FLUOR  
 OSKAN ASCENT FL, Thermo scientific ) を用いて測定した。ベクターを導入していない細胞  
 を (-) とした。

## 【 0 0 4 9 】

さらに同様に No.1 ~ 10 の各遺伝子発現ベクター及びコントロールを導入した CHO 細胞及  
 び HEK293T 細胞を、48 時間培養後から、Puromycin ( 抗生物質 ) 10 µg/mL を添加して、3 日  
 に 1 回培地交換を行いながら 3 週間薬剤選択培養を行った。培養 3 週間経過後の各細胞の蛍  
 光強度を蛍光プレートリーダーにより測定し、コントロール及びトランスフェクト後、24  
 時間培養した細胞の蛍光強度と比較した。CHO 細胞での蛍光強度を図 7 に示し、HEK293T 細  
 胞での蛍光強度を図 8 に示した。CHO 細胞では、培養 24 時間目の GFP 蛍光強度はコントロ  
 ール及び No.1 ~ 10 の各遺伝子発現ベクターのいずれも、(-) と殆ど差を認めなかったが、3 週  
 間経過後では No.1 ~ 10 の各遺伝子発現ベクターを各々導入した細胞では、コントロールに

10

20

30

40

50

比べて、明らかに高いGFP蛍光強度を示した。特に、No.4の遺伝子発現ベクターで高い値を示した(図7)。一方HEK293T細胞では、培養24時間目のGFP発現量はコントロールは高い値を示し、一過性の発現を認めたが、No.1~10の各遺伝子発現ベクターのいずれも、(-)よりやや高い値を示したのみであった。3週間経過後ではNo.1~10の各遺伝子発現ベクターを各々導入した細胞では、コントロールに比べて、高いGFP蛍光強度を示す傾向が認められ、特にNo.1の遺伝子発現ベクターで高い値を示した(図8)。

#### 【0050】

次に、3週間薬剤選択培養を行った各細胞を蛍光強度測定後回収し、タンパク質定量を行った値を基に細胞の蛍光強度を補正し、その補正值に基づいてNo.1~10の各遺伝子発現ベクターの比較・検討を行った。その結果、CHO細胞では、特にNo.4の遺伝子発現ベクターで高い値を示し(図9)、HEK293T細胞では、特にNo.1の遺伝子発現ベクターで高い値を示した(図10)。

10

#### 【0051】

上記の結果、CHO細胞では、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)」の上流及び下流にMIS配列とともにROIS配列又はARS配列を含み、さらに上流及び下流に「トランスポゾン配列(T)」を含む、本発明の「遺伝子発現用カセット」によれば、長期間、目的のタンパク質を安定的に産生可能であることが確認された。またHEK293T細胞では、「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物(X)」の上流及び下流に「トランスポゾン配列(T)」を含む、本発明の「遺伝子発現用カセット」によれば、長期間、目的のタンパク質を安定的に産生可能であることが確認された。

20

#### 【0052】

(実施例3) ヒト・ヒスチジンリッチ糖タンパク質(HRG)の産生

本実施例では、遺伝子組換えヒトHRGは、以下のように作製した。実施例1に示すCHO細胞において最も有効な高効率遺伝子発現用カセットであるNo.4遺伝子発現用カセットを用い、発現させようとする遺伝子として、配列番号10に示すヒトHRGのコーディング領域をコードするDNA(GenBank Accession No.NM000412で特定される塩基配列からなるDNA)を用い、No.4-HRG発現ベクターを作製した(図11参照)。具体的には、10% FCS含有GIBCO(R) Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) で培養を行ったCHO細胞(Chinese Hamster Ovary cells)にFuGENE(商標)-HD(遺伝子導入試薬)を用いて、上記No.4-HRG発現ベクター、トランスポゼース発現ベクター、薬剤耐性遺伝子発現ベクターとして実施例1に示すNo.4遺伝子発現ベクターをDNA量5:4:1でコトランスフェクトした。遺伝子導入し、48時間培養後から、Puromycin(抗生物質)10 µg/mLを添加して、3日に1回培地交換を行いながら3週間薬剤選択培養を行った。

30

#### 【0053】

成熟HRGのアミノ酸配列(配列番号10)

VSP TDCSAVEPEAEKALDLINKRRRDGYLFQLLR IADAHLD RVENTTVYYLVLDVQESDCSVLSRKYWNDCEPPDSRRPS  
EIVIGQCKV IATRHSHE SQDLRV IDFNCTTSSVSSALANTKDSPVLI DFFEDTERYRKQANKALEKYKEENDDFASFVRV  
RIERVARVRGGEGTGYFVDFSVRNCPRHHFPRHPNVFGFCRADLFYDVEALDLESPKNLVINCEVFDPQEHEININGVPPH  
LGHPFHWGGHERSSTTKPPFKPHGSRDHHHPKHEHGPPPPPPDERDHSHPPLPQGPPPLLPMSCSSCQHATFGTNGAQ  
RHSHNNSSDLHPKHHSHEQHPHGHHPHAHHPHEHDTHRQHPHGHHPHGHHHPHGHHHPHGHHHPHCHDFQDYGPCD  
PPPHNQGHCCGHGPPPGHLRRRGPKGPRPFHCRQIGSVYRLPPLRKGEVLP LPEANFPSFPLPHHKHPLKPDNQPFQ  
SVSESCPGKFKSGFPQVSMFFTHTFPK

40

#### 【0054】

組換えヒトHRGを含む培養上清を回収した。1×PBS(-)30 mLで予め洗浄したQIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲル(Sepharose CL-6B支持体にNi-NTAを結合したゲル)を前記培養上清に加え、4で回転インキュベーションを2時間行ない、組換えヒトHRGをQIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲルに結合させた。QIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲルを精製用カラムに移した後、洗浄液1(30 mM Imidazoleを含むPBS(pH7.4))、洗浄液2(1M NaCl +10 mM PB(pH7.4))、洗浄液3(1×PBS(pH7.4))で順次カラムを洗浄した。組換えヒトHRGは、

50

500 mM Imidazoleを含むPBS (pH7.4)で、4 で溶出を行なった。精製品は、ウエスタンブロットとSDS-PAGE 後のタンパク染色でHRGを確認した。

【 0 0 5 5 】

上記本発明の遺伝子組換え手法により作製したHRG (以下、「遺伝子組換えHRG」) と国際公開WO2013/183494号公報の実施例 1 で作製したヒト血漿由来のHRG (以下、「血漿由来HRG」) について、各々好中球の正球化活性、CLP敗血症モデルマウスの生存率及び活性酸素分子種の産生抑制活性に及ぼす効果を確認した。

【 0 0 5 6 】

( 実験例 3 - 1 ) 好中球の形態

国際公開WO2013/183494号公報の図 5 に示すフローチャートに従いHRG:2  $\mu$ M、最終濃度1  $\mu$ M) 50  $\mu$ lを好中球浮遊液 (5  $\times$  10<sup>5</sup> cell/mL) 50  $\mu$ lに加えた系での好中球の形態をCalceinで細胞を蛍光標識して、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、遺伝子組換えHRG及び血漿由来HRGのいずれも同じ効力で正球状形態を誘導することが観察された (図 1 2 )。 10

【 0 0 5 7 】

( 実験例 3 - 2 ) CLP敗血症モデルマウスに及ぼすHRGの効果

本実験例では、盲腸結紮腹膜炎 (cecal ligation and puncture: CLP) 敗血症モデルでカプランマイヤー法による生存率を調べた。マウスの腹腔内より盲腸を取り出して、盲腸根部を縫合糸により結紮し、18ゲージ注射針を用いて盲腸壁層に穿刺してCLP敗血症モデルを作製した。単開腹 (sham) マウスをコントロールとした。術後5分、24時間及び48時間目に、遺伝子組換えHRG (HRG : 400  $\mu$ g/マウス) を尾静脈内投与した (n=10)。HSA及びPBSをコントロールとした (n=10)。その結果、カプランマイヤー法で解析した結果、遺伝子組換えHRG投与グループは有意に高い累積生存率が確認された (図 1 3 )。 20

【 0 0 5 8 】

( 実験例 3 - 3 ) 活性酸素分子種の産生抑制活性

単離したヒト好中球を、イソルミノール (最終濃度 50 mM) とHorse radish peroxidase type IV (最終濃度 4 U/mL) を添加してインキュベートし、細胞外放出活性酸素分子種レベルを反応開始15分後に化学発光で測定した。HRG非存在下のレベルを100%とし、0.01 ~ 1.0  $\mu$ M濃度のHRG存在下での値を%表示で算出した (図 1 4 )。その結果、遺伝子組換えHRGはヒト血漿から精製したHRGと略等しい活性酸素分子種の産生抑制活性を示した。

【 産業上の利用可能性 】

30

【 0 0 5 9 】

以上詳述したように、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X) が、プロモーター (P) とエンハンサー (P') で挟まれる構造を有する遺伝子発現用カセットにおいて、さらにプロモーター (P) の上流及びエンハンサー (P') の下流にトランスポゾン配列 (T) を含むことを特徴とする、遺伝子発現用カセットによれば、従来遺伝子組み換えによる作製が困難であったタンパク質も大量に産生させることができる。さらに、上記において、トランスポゾン配列 (T) とともに、複製開始配列 (S) の上流に核マトリックス結合配列 (M) を組み合わせることで、より効果的に目的タンパク質を安定的かつ大量に産生することができる。

【 0 0 6 0 】

40

本発明は、一過性発現に適した遺伝子発現用カセット (例えば、特許文献 4 に示すpCMV iR-TSCベクター) を「トランスポゾン配列 (T)」で挟むことにより、染色体に高効率に高コピー数の遺伝子発現用カセットを挿入することを可能にする。さらに「複製開始配列 (S)」、「核マトリックス結合配列 (M)」を遺伝子発現用カセットの上流又は下流、もしくは上流と下流に連結させることにより、遺伝子発現用カセットのコピー数を高効率に増幅させることが可能となる。具体的には、「プロモーター (P)」の上流に「トランスポゾン配列 (T)」、「プロモーター (P)」の下流に「発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物 (X)」の下流に「エンハンサー (P')」、「さらにその下流に「核マトリックス結合配列 (M)」、「複製開始配列 (S)」、「トランスポゾン配列 (T)」を連結させることにより、目的タンパク質を安定かつ高産生する細胞が 50

得られる。本発明の遺伝子発現用ベクターによれば、薬剤選択後の安定発現細胞株にも関わらず、従来の発現ベクターと比較して数倍から数十倍の高発現を達成したpCMViR-TSCベクターの一過性発現量を更に凌駕する発現量を達成した。

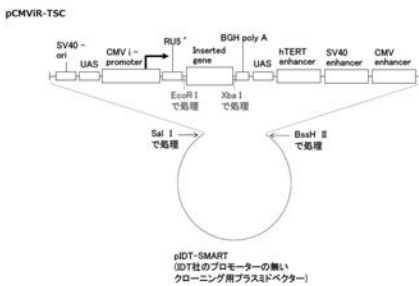
【0061】

例えば、細胞の種類、遺伝子の種類、トランスフェクション試薬の種類を問わず、遺伝子発現させようとする目的タンパク質を超高発現により、安定かつ大量に産生することができる。バイオテクノロジーの分野での試薬としての適用のみならず、治療用のタンパク質医薬としての適用や臨床での遺伝子を用いた治療・検査・診断のために幅広い応用が可能である。

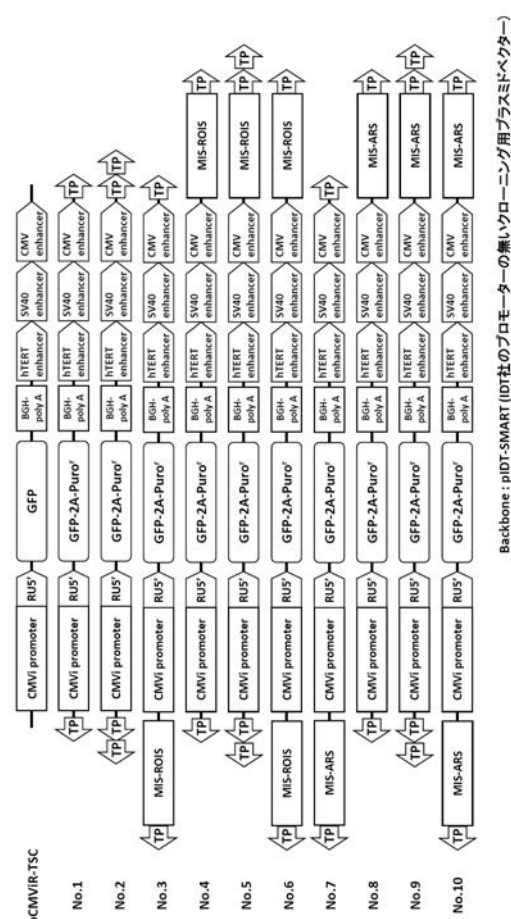
【0062】

疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質として、具体的には「ヒスチジンリッチ糖タンパク質（HRG）」や「抗体」が挙げられる。

【図1】



【図2】





【 図 3 】

(配列番号 2) MluI-AflII-SpeI-BamHI-Sall

(配列番号 1)

(配列番号 2)

```

AGCGGTAACTTTTAAATCGGTTTATTTCAGCGTTTTGAAAGCGTTGGAGAGCGGACAGCTCGGCGTCAAAATG
TTTTACAGCGTGTAGGAGCAGATGAAGTGTGACAGCGTGCAGACAGCGGAGCTAGATTAACCGCTAGAAGGATAATG
ATATGTGACGTACCGTTAAAGATAATCATGTGAATAATGAACGATGTGTTTATCGGCTGTATATCGAGGTTTATTT
ATTAATTTGAATAGATATTAAGTTTATTAATTAATTTACACCTACATATAATAAATTTCAACAACAATTTATTATG
TTTTTTTTTTAAAAAAAACAAAACCTCAAAATTTCTTATATAAGTAAACAAAATTTTATGGAGACAGCGCCCG
CCCAAGCCCGCAGGATGTAATACGTCCCTCCCGCGTAGGGGCGAGCAGCGGCGCCGCGGCTCGCTCGCGT
GGCGCTCCCGCCGATCCCGAGCGGCGAGCTGGGGGACAGCCCGGGCAGCGGAAAGTGGCAGCGATCGGTTTG
CTCGAACGCTTCGCGTCTCTTTAGCCGTCAGAGACCTGGGGGATACGGGGAAGAGCCCTCCAGGGCAATCTCG

```

【 図 4 】

(配列番号 4) KpnI-SpeI-BssHII-NotI

(配列番号 3)

(配列番号 4)

```

GTCGCTCCCGTCACAGGAAAGTCCCTAAAGAACAGTGGCAGCCAGTTTAGCCCGAAATGACTGG
ATCTTTTITAGGGCCATTGTGTGGCTTTTCCCGGATCCCGCCAGGCTGTGCGGCTCAAGAGCAGCGAGAA
GGCTCAGAGAAAGCGATCCCGTCCACCTTCCCGTCCCGGGTGTCCCGCAGCTGCGCGCTCGGGGATGGGG
GGGAGCCCGGACCGGAGCGCCCGGGGCTGCTGCTGCTGCCCTTAGCGGGGAGGAGCTAATTAATCCCTCG
GGCTTTGGGGGGGGCTCCCTGATATCTATAACAGAAATATATATAAATTTATCACGTAAGTAGAACATG
AAATAAATAAATAATATGATGAGTAAATCTAAAGAGCAAGTAAAGATAATCATGCGCTCATTTTACTACAGGG
GGCTTATAGTCAAAAACAGTGAACCTTAGCGATTAGCAGAGCGGCTCACGGAGCTCAAGCGGCGACTAGAGTG
TCTAAATGACAGCGCAGGATTCCGCTTTTAGAAGAGGAGCAATATTTCAAGAAATGATGCGTCAATTTTACG
AGACTCTTTTAGGTTAATCTAGCTGATCAGGATCATATGCTGGGCTTTTTCGCGCTCAGTATCGCCGCAAG
GTGCGCTATCTGGGATCGAGGAGAAAGCGCCGCTTTTCCCGGAGGTGAAGCGCATGSAAGATTGGC
GAGGATGACTGCTGCTGATGACGTTGAGCGAAAGCGCACTTTACATGATGATTCGGGAAGGTGGGCTAGCG
CCTTTAAAGTGAATGCTGCTGAGGCACTCGGGATACCGTGTGCTGGGCTTTCCGCGCAGCAGTTCGGATGGT
CAGCCGAAAGCGCATAGCAGCCGCAATCAATCCGGGACAGCGGAACTGCGCTGGGCTGTCAGGATTAATGACGC
GGTGGGCGCTGGGATATACGTGAGCGAGGAGGGTATCCGCTGGTGGTGGCGGAAATGACATGGATATCTCGC

```

【 図 5 - 2 】

```

TGGGCGGAGCAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCTCTGGGGATGGGTGGCTCTATGCGGGG
AGTGTCTCCGCTTCCACGTGGGCGAGGAGTGGGAGCCGGGACCGGCTGCGGCTTCACTTCCAGCTCCGCG
TCTCCGCGCGGAGCCCGCGCTCCGACCCCTCCCGGGTCCCGCGGCGAGCCCGTCCGCGGCGCTCCAGCCCTG
CCCTCTTTCCGGGCCCCCGCTCTCCCTCGCGGGCGGATTTGGAAATGCCAGGCTCCCGCAGGCGAAGT
ATCCAAAGCATCCATCAATTTAGTCAGCAACAGGTTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGCAGGCGAGAATGTTCCA
AGCATCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCGCGGCGCTTACTCCGCGCATCCCGCCCTAATCCCGCCAGTTCC
GGCCATCTCCGCGCCATGCTGATTAATTTTTTATTAATAGAGGCGGAGGCGCGCTGTGCTGAGCATTC
CAGAAGTATGAGGAGGCTTTTTGGAGCCCAAGGCTTTGCCAAAAGCTCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC
GGCTGGGTGAGCCGCAAGCGACCCCGGCTATTGAGTCAATAAATGAGTATGTCCCATAGTAAAGCGCAATAGGGAG
TTCCATTTGACGTCAATGGGTGAGTATTTAGGTAATGCGCCATGCGGAGTACATCAAGTGTATCATATGCGAAG
TAGCGCCCTATTAGGCTCAATGAGCGTAATGGCGCGCTGAGCATATGCCAGTACATGACTTATGGACTTTCC
TAGTGGCAGTACATCTAGCTATTAGTATCGCTATTACCAGTGGTGTGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGG
ATAGCGGTTTACTCAGGGGATTTCCAGGTCGCCACCCATTGACGTCATGGGATTGGTTTGGCACCAAAATCA
AGGAGACTTCCAAAATGTCTAACACTCCCGGCTATTAGCAGAAATGGCGGATGGGCTGTTACTAGTAGATG
ACTAAGCTGGGGCGCGCGCGCTCTCGAGCAGATGATAAGATACATTTGATAGTTTGGACAAACCAACATAGAA
TGCAGTAAAAAAATGCTTTATTTGAAATTTGATGCTATTGCTTTATTTGAACCTATAAGTGCATAAAC
AAGTAAACAAACAATTCATTCATTTATGTTAGCTAGCGGGGAGGTGGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAA
AGCTTACAAGTGGTAAATCATCTGAGCAGTATTGCTCCAGGATATCTTCCGCTGAGTGGTACATACAGCA
GCTTACGTAAGTCTCTCGTTTAAAGCTTACACACAGCTTAAAGTGAACCTGGTTGGTTAACTTGAATAATGAGA
TATAGAGGGTAAAGAGTCTGGCTTGAATCAGGGAACAAGGCAACAACAAATTAACAGCATAAACCTTTGAAGA
ACAGAGGTGATGATATGAGTATGGGCTTATAGATAAGGATGCGAGGAATGTTGTTACAGGGCTGGGGGGA
TATAGAGGGTAAAGAGTCTGGCTTGAATCAGGGAACAAGGCAACAACAAATTAACAGCATAAACCTTTGAAGA
AGAATTTCTTACTGTAGTACGCGATCTATTATGTAACCTATGACAGTTCTTTCAAAATATTTTTCAGACTGTGAC

```

【 図 5 - 1 】

(配列番号 8)

(配列番号 1) MluI-AflII-SpeI-BamHI-Sall-CMV1-RUS-

(配列番号 2) EcoRI-SpeI-BamHI-HindIII-KhoI-XbaI-

(配列番号 3) pA-TSC(3xstop-BGHpA-UAS-hTERT\_enh-SV40\_enh-CMV\_enh)-

(配列番号 4) NheI-3xstop-SV40 pA-PacI-MIS-HOIS-FacI-KpnI-SpeI-BssHII-NotI

(配列番号 5)

(配列番号 6)

```

AGCGGTAACTTTTAAATCGGTTTATTTCAGCGTTTTGAAAGCGTTGGAGAGCGGACAGCTCGGCGTCAAAATG
TTTTACAGCGTGTAGGAGCAGATGAAGTGTGACAGCGTGCAGACAGCGGAGCTAGATTAACCGCTAGAAGGATA
ATCATATGTGACGTACCGTTAAAGATAATCATGTGAATAATGAACGATGTGTTTATCGGCTGTATATCGAGGTT
ATTTATTAATTTGAATAGATATTAAGTTTATTAATTTACACCTACATATAATAAATTTCAACAACAATTTATTATG
TTATGTTTATTTTATTTAAAAAAAACAAAACCTCAAAATTTCTTATATAAGTAAACAAAATTTTATGGAGACAG
CCCCCCCCCAAGGCCCGCAGGATGTAATACGTCCCTCCCGCGTAGGGGCGAGCAGCGGCGCCGCGGCTCGCTCGCGT
TCCGCTCCGGGCTCCCGCCGATCCCGAGCGGCGAGCTGGGGGACAGCCCGGGCAGCGGAAAGTGGCAGCGATCGGTTTG
TGCGTTTCTCTGAAAGCTTCTGCGTCTCTTTAGGCTGAGCAGCTGGGGGATGAGCGGGAAGAGCCCTCCAGGG
GAAATCTCGATCTGGGCTAATAATTTTTTGCAAAAGCCTGGGCTCCAAAAGAGCCCTCCTACTACTCTGGAAATAG
CTCAGAGCCGAGGGGCGCTCGGCTCTGCATAAATAAAAAAATTTAGTACGCTTTGGGGGAGAAATATCTGTGCT
TGACTAATTTGAGATCCGAGTCTGCTCCCGCTTACATAACTTACGTAATAGCCGCGGCTGGCTGACGCCCAAGC
ACCCCGGCGCATGACGTCATAATGACGTATGTCCCATAGTAAAGCAATAGGGACTTTTCATGAGCTCAATGG
TGGAGATTTTACGGTAACTGCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATCCAAAGCTCCGCGCTTATGAGCTCA
ATGACGTAATAGCCCGGCTGGCATATGCGGAGTACATGACTTATGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAGC
TATTAGTCACTGATTTACATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCTGGATAGCGGTTTGAATCAGGG
GATTTCCAGGCTCCCGCCATTGACCTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTC
GTAACTCCCGCCATTGAGCAAAATGGGGGATGGGCTGATCGGTTAGGAGGCTATATAAGCAGAGCTCGTTTATG
TGACCGTACAGTCCCGTGGAGCGCCATCCAGCTGTTTTGACCTCATAGAAAGCAGCGGGGCGGCTCAGCGCTCC
GGGCGCGGAGCGTGCATTGGAAGCGGATTTCCCGCTGCAAGAGTCAAGTCAATGAGTCACTGAGACTTATAGGCT
ACACCCCTTGGCTTATCATCAATTAACGACTACTATAGGAGCAGAGCTGCTCCTTCTGGGCTTTTCTT
GTCTCGAGGGCTCGCATCTCTCCAGCGCGCGCGCGCTCTAGGAGGGCGCCTCAGGCTTGAATGCTCGG
TCTCGGCGCTCCCGGCTGTGGTGGCTCGACTGAGTGGCTCGCGCTGTAAAGCTGAGTCCCGCTGAGCAGCGG
GGCTTTGCGGGGCTCCCTTAGGCTACTGACTGAGCGGCTCCAGGCTTTGGCTGACCGCTTGCTGCTCAAC
TCTACGCTTTGTTGGTTTCTGCTCGCGCGTTACAGTCCAGCCAGCCCGGAAATTCGGGACTAGTGGTCCCGG
GGACTCCCGCGCTGAGTGGAGCAGCATCTGTTTTGGCCCTGAGGCTCCGCTGTTGAGCTCCGCTGAGCGGCGGCTC
GCACTGCTCTTCTAATAAATGAGGAAATGATCCGCTGCTGAGTGGTCTTCTTCTTCTGGGCGTGGG

```

【 図 5 - 3 】

```

CGCTGTAAATCTGAGCCAGTAGAGGCTTTTCCCGCTTCCCGCTACTTCTTAAAGTACAGAGGCTTTTGGTCCC
CGAGCAGCTCTGAGATGAGTCCAGGCGAAGCAGTAGATGCTCCCGAGTAACTCCCTTTTGAACAGCATGATTA
CCCCATGATGACACACTTTGGTTGTAAGTACTTTTTTATTTATGATTTTGGACGATTAAGAGGCTCTAG
TTTTTACTGTTTCCAAAACCTAATAAGTAACTAATGACAGAGCAGATGATTTGTATTTATCTATTATT
GACATAATTTATGACATGATGAGCAAAATGAAAGAAACACACAAATGAATGCATATATATATATATGAT
GTACATATACACATATATATATATTTTTTTCTTTCTTACAGAGGTTTTAATCCAAATAGGAGAGAGATAG
TTAGACTGAGGTAGATTTTACCTCTGCTGTAAGTATTTGCTATATTGAGAGCGAGGAGAGATCCAT
CTACATATCCAAAGCGAATTTAGTAGAAGAAGCTTCCACTTTTAGTGGCTCAATTTTATTTGATTAATAG
AAAATGGGAAACGATCTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATCCAAATATACGTAATAACACTGCAAGGAGGA
TGTTTTTAGTACAAATTTTACTGATGGTATGGGCGAAGAGATATCTTAGAGGGAGGCGAGGGTTTGAAGTCC
AAGCTTAAGCCAGTGGCAGAGGCGCAAGGACAGTACGGCTGTACTACTTAGACCTCAGCTGAGGCGCACCC
CTAGGTTGGCCAACTACTCCAGGAGGAGGGGAGGAGGAGCGGCTGGGCAAAAAGTCCAGGCGAGGCGCATC
TATGCTTACATTTGCTTTCAGCAAGCTGCTACTAGCAAGCTCAGACAGCAGCAGCAGGCTGAGTCCGCTG
GGAGAGTGTCCGCTTACTGCGCTGTGGGCAAGGTGAAGGCTTTAATTAAGCGGCTGACTCTCTCTGCTCT
CAGAGGAGGAGTCCCTAARGAAGCAGTGGCAGCGGTTTTAGCCCGGAAATTGACTGGATTCCTTTTTAGGGCGC
ATTGGTATGGCTTTTCCCGTATCCCGCAGGCTGTGCTGAGCTCAAGAGCAGCAGAGAGCGTTCAGAGAAAGCG
ATCCGCTGCACTTCCCGCTGCCCGGCTGTCGCCGAGCTGCGCGCTCGGGGATGCGGGGGAGCGCGGCGAGCGG
AGGAGAGCCCGGGGCGCTGCTGCTGCGGCTGAGCGGAGGAGGAAATTAACATCCCTGGGCGTTGGGGGGGG
GCTGCGCTGATATCTATAACAGAAAATATATATAAAGTATCACGTAGTAGAAGTAAATTAACATAA
TTATGATAGTTAAATCTTAAAGTCAAGTAAAGATAATCATGCGTATTTTCTCAGCGGCTGATATAGTTC
AAATCAGTACACTTACCGCATTGACAGCAGCGCTCAGGGAGCTCCAGGGGAGCTAGAGTCTCTAATAGCAC
AGCAGGAGTTCGGCTATTAAAGAGAGGAAATTTTCAGAAATGATGCGTCAATTTTACAGAGATCTTCT
CTAGGTTAATCTAGTGCATCAGGATCATATGCTGGGCTTTTTTCCCGCTCAGTCACTCGCCAGCGGCTAT
CTGGCATCGGGAGGAGAGCGGCTGCTTTTCCCGGAGTTGAGGAGGCTTGGGAAAGTCTTGGCGAGGATGAC
TGCTGCTGATGACTTTGAGGAAAGGCGGTTTACATGATGATTTGGGAAAGTGTGGCATGCGCGCTTTAAG
GGGAACTGTTCTGAGGCACTGGGATACAGTCTGCGCGGCTTTTCCGAGCAGTTCGGGATGCTCAGCGCG
AAGCCCATCAGCAACCGGAAATACCGGAGCAGCGGAACTCCGCTGCGGCTGCGAGATTAATGACAGCGTGGG
GCGCTGGATATTAAGTCCAGGAGGAGGATCCTGGCTGGATGGCGGAAATGAGATGGATGATTTCCCGCTCA
ACTGCGGCGG

```

【 図 6 - 1 】

(配列番号 9)

(配列番号 1)

K1U1-R1I1-S1F1-S1I1-CM1-RU5'-EcoRI-SpeI-SamHI-HindIII-XhoI-XbaI-

PA-TSC(3xstop-BGH-A-UAS-hTERT enh-SV40 enh-CMV enh)-EpnI-

3'UTR-BssHI-NotI

(配列番号 3)

(配列番号 9)

```

ACCCGTAAGCTTTTAAAGAACTCGTTCATTCACGTTTTTGAACCCGTGGAGACGGGACAGACTCGGGTGCAGAT
GTGTTTACAGCGTGATGGAGCAGATGAAGATGCTCGACACGCTGCAGAACACCGCAGCTAGATTACCCTAGAAG
ATAATCATATGTGACGTACGTTAAGATAATCATGTGAAATATGACGCATGTGTTTTATCGGCTGTATATCGA
GGTTTATTTAATTTGAATAGATATTAAGTTTTATATATTTACACTTACATACTAATAAATAATTCAGCAAC
AATTTATTTATGTTTATTTATTTAAARAAACAAAACTCAAAATTTCTCTATAAAGTAAACAAAATTTTAT
GAGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCAGGGATGTAATACGTCCTCCCGCCTAGGGGGCAGCAGCGAGCGCC
CGGGGCTCCGCTCGGTCGGGGCTCCCGCCGATCCCGAGCGGGAGCGTGGGGACAGCGGGGACAGCGGGG
AGGTGGCACGGGATCGCTTTCTCTGAACCGTCTCGCTCTTTGAGCGCTGCAGACACTGGGGGGATCGGGG
AAAGGGCTCCACGGGCAATGTCGATGTCGGCCATAAATTTTTGCAAAAGCCTTGGCCCTCAAAAAGCTCCTC
ACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCGAGGCGGCTCGGCTCTGCATAAATAAAAAAATTAATGTCAGCCTTGGGG
CGAGAACTATCGTTCGACTAATTGAGATGGAGTACTGCTCCGCGTACATACTTACGTAATAATGCGCC
GCTGCTGACGCCAACAGCCCCCGCCATTGACGCTCAATAAGCGTATGTTCCATAGAACGCCAATAGGG
ACTTTCCATTGACGCTCAATGGTGGAGTATTACCGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC
CAGTACGCCCCCTATTGACGCTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGCGCATTAGCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAGCTATTAGTCTGCTATTACCATGGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT
GGCGTGTATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAACTCCACCCCATTTGACGCTCAATGGGATTTGTTTTGGC
ACCATAATCAACGGGACTTTCCAAATGCTGTAACAACCTCCCGCCATTAGCCAAATGGCGGTAGCGGTGACG
GTGGAGGCTTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGCTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGC
CTCATAGAGACACCGGACCGATCCAGCCTCCCGGGCGGGAAACGGTGCATTTGGAAGCGGATTCGCCCTGCCA
AGAGTACGCTAAGTACCGCTATAGACTTATAGGCACACCCCTTTGGCTCTATCCATCAATTAACGACTCAC
TATAGGGAGACAGACTGTTCCCTTTCTGGGCTTTTCTGGCTCGAGGGGCTGCTCCTCCCTCACGGCGCCG
CGCCCTACTGAGGGCGCATCCACCGGTTGAGTGGCTTCTGCGCCCTCCCGGCTGTTGGCTCCTGACTAG
CTCCGCGCTAGTAAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACGGGCTTTGTCGGGCTCCCTTGGAGGCTACTAG
ACTCAGCGGCTCCACGCTTTGCTGACCGCTGCTGCTCAACTACGCTTTGTTGCTTTCTGCTGCGC
CGTTACAGATCCAGCCACCCGAAATTCGGGACTAGTCCCGGATCTCCCGCCAGCTTGGCGCTGCGAG
CGGGCTTAGA)CTAGATGACTAAGCTTTAAACCGGCTGATCAGCTCGAGTGTGCTTAGTGGCAGCCATCT
TGTGTTGGCCCTCCCGGCTGCTTGCACCGTGAAGGTGCACCTCCCACTGCTCCTCTAATAAATAGGG
AAATGGCATCGATTGCTGAGTGTGCTATCTATCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGGAAGACAATAGAGCATGCTGGGGTGGGGTGGGGCTATGGGGAGGATGCTGCTCCGCTTCCACGCTGG

```

(配列番号 9)

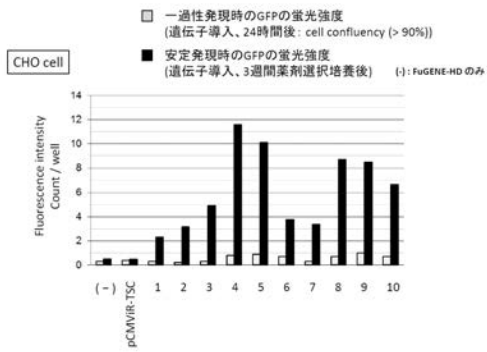
【 図 6 - 2 】

```

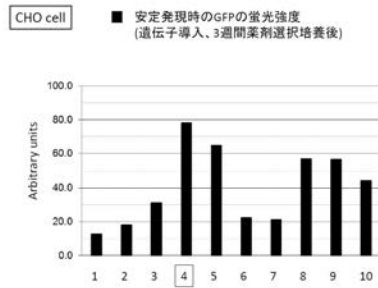
GGGAGGACTGGGGACCCGGGACCCGCTGCTGCCCTTCACTTCCAGCTCCGCTCCCGCGGGACCCCGCC
CGCTCCGACCCCTCCGGGTCGGGGCCAGCCCGCTCCGGGCTCCCGAGCCCTCCCTTCCGCGGGCC
GGCCCTCCCTCGGGGGGAGTTTTGAAAGTCCCGAGCTCCCGAGGACGAGAGATCCAAAGCATCCATCT
CAATAGCTAGCAACCGAGGTGGAAAGTCCCGAGCTCCCGAGCAGGAGAGATCCAAAGATCCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCCGCCATCCCGCCCTAATCCCGCCATTCGCGCATCTCCG
CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGCCGCTCGCTCGCTGAGCTATTCCGAAAGTAGT
AGGAGGCTTTTTTGGAGCCAGGCTTTGCAAAAAGCTCCGTTACATACTTACGGTAATAGCCCGCTGGCTG
ACCGCCCAAGCCCGCCCGCCATTGACGCTCAATAATGATGATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCAT
TGCCTCATGTTGGTGGATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCTATTGACGCTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTAGCCCATACATGACCTATATGGACTTCTCTAC
TTGGCAGTACATCTAGCTATTAGTCTGCTATTACCATGGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGG
TAGCGTTTACTCACGGGATTTCCAGTCTCCACCCCATGAGCTCAATGGGATTTGTTTTGGCACAAATC
AACGGACTTCCAAATGCTCAACAATCCCGCCCATTTGACGCAATGGCGGCTAGCGCTGCTGCTGCTGCTG
TCCTGCTCCACAGCAAGTCCCTAAAGAAACAGTGGCAGCCAGTTTTAGCCCGGAAATGATGGATTCCTT
TTTTAGGCGCCATTGGTATGGCTTTTCCCGGTATCCCGCCAGGCTGCTGAGGCTCAAGAGCAGCGAAGGCT
TCAGAGAAAGCATCCCGTCCACCTTCCCGGTCCCGGGCTGCTCCCGCAGCTCCCGGCTGGGGATGGGGG
GGAGGCGGGAACGGAGCGGGCCCGGGCGGCTCGCTGCTGCCCTTACGGGGGAGGAGCAATTAACATCCCT
GGGGCTTTGGGGGGGGGCTGCTCCCTGATATCTAACAAGAAATATATATAATAAGTATCATCGCTAAGTAGA
ACATGAATAACAATAAATATCGTATGATTAATCTTAAAGTACGCTAAAGATAATCATGGCTCATTTTGA
CTCAGCGGCTGTATAGTCAAATGACGACTTACCGCATTGACAGCAAGCCCTCAAGGGAGTCCCAAGGGG
CGACTGATGCTCTAAATGACAGCGCAGGATTCGGCTATTAGAAAGAGAGAGCAATATTTCAAGATGATG
CGCAATTTTACGAGACTTCTTTAGGGTAAATCTAGCTGCTCAGGATCATATGCTGGGTTTTTTTTGGG
CTCAGTATCGCCCAAGTGGCTATCTGGGCTCGGGGAGGAGAGCCCGCTTTCCCGGAGGTTGAG
GGCATGGAAAGTTTGGGAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TCGGAAAGGTGGGCTGACCGCTTTAAGGTTAACTGTTGTTGCTGAGCCACTGGGATACAGTGTGCTGGG
CTTTTCGGACACAGTTCGGATGTCAGCCCGGAGCGCATCAGCAACCCGCAATACCCGGCAGACCGGAACT
GGCTGCGGGTGTGAGATTAATGACAGCGGTGGGGCTGGGATTAATGCTGAGCGAGGAGGAGGATTCCTGGCTG
GATGGCCAGAAATGGACATGGATTTCCGGCCAACTCCGGCCG (配列番号 9)

```

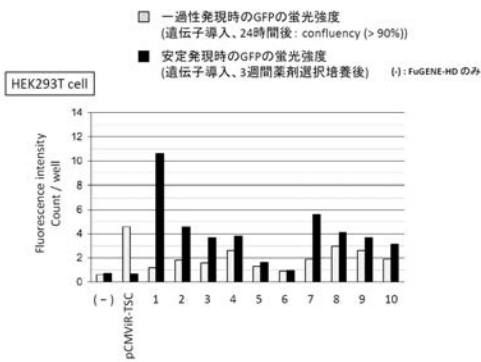
【 図 7 】



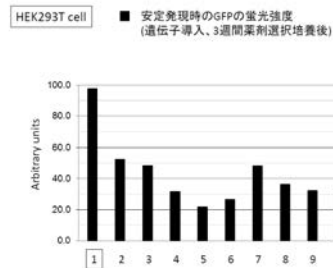
【 図 9 】



【 図 8 】



【 図 10 】

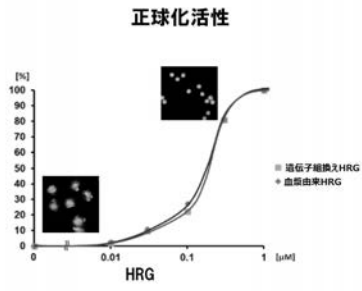


【 図 11 】

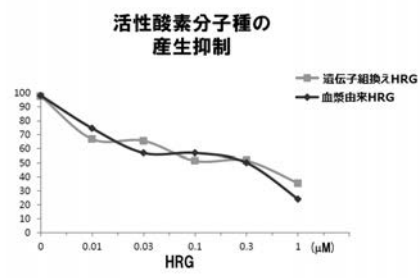
HRG搭載コンストラクトの構造 (No.4-HRG)



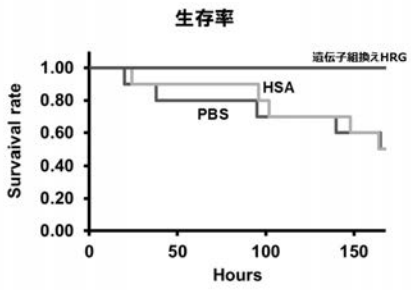
【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

2017070224000001.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 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
	A 6 1 K 39/395	N

(72)発明者 西堀 正洋  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 公文 裕巳  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 村田 等  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 山本 健一  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 木下 理恵  
岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

Fターム(参考) 4B024 AA03 AA20 BA80 DA02 EA04 FA02 FA06 FA10 GA13  
4B064 AG01 CA10 CA19 CC03 CC15 CC24 CD21 CE12 DA01  
4C084 AA01 AA13 BA34 NA20  
4C085 AA13 BB12 CC21 EE01 KA03  
4C086 AA10 EA16 MA01 MA04 NA20