

(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2018-148865

(P2018-148865A)

(43) 公開日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(51) 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 0 6 5
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2017-49247 (P2017-49247)
 (22) 出願日 平成29年3月14日 (2017.3.14)

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業、「RNA i型医薬品を標的組織ならびに多能性幹細胞で持続的に発現させるウイルスベクター技術の開発」に係る委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 (74) 代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍
 (72) 発明者 朝長 啓造
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 国立大学法人京都大学内
 (72) 発明者 牧野 晶子
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA02 CA44
 4C084 AA13 MA13 MA17 MA28 MA32
 MA56 MA63 MA66 NA13 NA14
 ZA021 ZA022

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボルナウイルスベクター及びその利用

(57) 【要約】

【課題】細胞内での安定性及び持続性が良好であり、しかも目的細胞に選択的に外来性遺伝子を導入することができ、かつ病原性が低い組換えウイルスを効率よく産生できるウイルスベクターを提供すること。

【解決手段】(a)ボルナ病ウイルスゲノムにおける少なくともN遺伝子、X遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する配列に、外来性遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNA、(b)リボザイムをコードするDNA及び(c)プロモーター配列を含み、該(a)の上流及び下流に(b)が配置され、かつ(a)及び(b)が(c)の下流に配置されているウイルスベクターであって、前記(a)がボルナ病ウイルスゲノムにおけるG遺伝子が破壊され、かつ、鳥ボルナウイルスゲノムにおけるG遺伝子の配列を更に有する組換えウイルスRNAのcDNAであることを特徴とするウイルスベクター。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ボルナ病ウイルスゲノムにおいて、該ボルナ病ウイルスゲノムにおける G 遺伝子が破壊され、かつ、鳥ボルナウイルスゲノムにおける G 遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルス RNA の cDNA を含むことを特徴とするウイルスベクター。

【請求項 2】

(a) ボルナ病ウイルスゲノムにおける少なくとも N 遺伝子、X 遺伝子、P 遺伝子及び L 遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する配列に、外来性遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルス RNA の cDNA、(b) リボザイムをコードする DNA 及び (c) プロモーター配列を含み、該 (a) の上流及び下流に (b) が配置され、かつ (a) 及び (b) が (c) の下流に配置されているウイルスベクターであって、前記 (a) がボルナ病ウイルスゲノムにおける G 遺伝子が破壊され、かつ、鳥ボルナウイルスゲノムにおける G 遺伝子の配列を更に有する組換えウイルス RNA の cDNA であることを特徴とする、請求項 1 記載のウイルスベクター。

10

【請求項 3】

(a) 組換えウイルス RNA の cDNA が、ボルナ病ウイルスゲノムにおける M 遺伝子が更に破壊された配列を有する組換えウイルス RNA の cDNA である請求項 2 に記載のウイルスベクター。

【請求項 4】

(a) 組換えウイルス RNA の cDNA が、ボルナ病ウイルスゲノムをコードする cDNA の P 遺伝子の翻訳領域と M 遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に外来性遺伝子を挿入した組換えウイルスの cDNA である請求項 2 に記載のウイルスベクター。

20

【請求項 5】

(c) プロモーター配列が、RNA ポリメラーゼ II 系のプロモーター配列であることを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載のウイルスベクター。

【請求項 6】

(a) 組換えウイルス RNA の cDNA の上流に (b1) ハンマーヘッドリボザイムをコードする cDNA が配置され、かつ、該 (a) の下流に (b2) 型肝炎ウイルスリボザイムをコードする cDNA 配列が配置されていることを特徴とする請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載のウイルスベクター。

30

【請求項 7】

(a) 組換えウイルス RNA の cDNA が、外来性遺伝子の 3' 末端側及び 5' 末端側にそれぞれ制限酵素サイトを含み、外来性遺伝子の 3' 末端側の制限酵素サイトと P 遺伝子の翻訳領域との間、及び前記外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと L 遺伝子の翻訳領域との間又はボルナ病ウイルスゲノムにおける M 遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する場合には前記外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと M 遺伝子の翻訳領域との間にそれぞれ、配列番号 9 に示す配列を含み、該外来性遺伝子の 3' 末端側の制限酵素サイトと配列番号 9 に示す配列との間に少なくとも塩基配列 cc が挿入され、かつ該外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと配列番号 9 に示す配列との間に少なくとも塩基配列 cca が挿入されている配列に基づくことを特徴とする請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載のウイルスベクター。

40

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターにコードされる RNA を含むことを特徴とする組換えウイルス。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、ボルナ病ウイルスゲノムの N 遺伝子、P 遺伝子、L 遺伝子及び鳥ボルナウイルスゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群を *in vitro* の細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含むことを特徴とする組換えウイルスの作製方法。

50

【請求項 10】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、ボルナ病ウイルスゲノムの N 遺伝子、P 遺伝子及び L 遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群と鳥ボルナウイルスゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミドとを *in vitro* の細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含むことを特徴とする組換えウイルスの作製方法。

【請求項 11】

ヘルパープラスミドとして、さらに、ボルナ病ウイルスゲノムの M 遺伝子を発現するプラスミドを *in vitro* の細胞に導入する請求項 9 又は 10 に記載の組換えウイルスの作製方法。

10

【請求項 12】

請求項 8 に記載の組換えウイルス、又は請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを細胞又は動物に感染させる工程を含むことを特徴とする外来性遺伝子の導入方法。

【請求項 13】

請求項 8 に記載の組換えウイルス、又は請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを含有することを特徴とする外来性遺伝子導入剤。

【請求項 14】

請求項 8 に記載の組換えウイルス、又は請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを含有することを特徴とする脳神経系細胞への外来性遺伝子導入剤。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターを含有することを特徴とする外来性遺伝子導入用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、外来性遺伝子を細胞に導入するためのウイルスベクター、組換えウイルス及びその利用に関する。

30

【背景技術】**【0002】**

外来性遺伝子を生体又は細胞に運搬する手段として、ウイルスベクターを利用する方法が知られている。これまでに、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、センダイウイルスを利用するベクターが開発されている。

【0003】

しかしながら、これらの既存のウイルスベクターでは、例えば DNA ウイルスの場合には宿主染色体にウイルス遺伝子が組み込まれることにより宿主（例えば、ヒト）への病原性が発現するという問題点があった。また、ウイルスによっては感染可能な宿主域が狭く、特定の生物にしか適用できないという問題点や、外来性遺伝子のウイルスゲノムへの組込み部位により遺伝子導入効率に差があり、遺伝子導入効率が悪いという問題点があった。また、生体内での免疫応答によりウイルスが排除されたり、ウイルス遺伝子の変異やプロモーター効率の変化が生じたりすることから、安定性及び持続性が悪いという問題点もあった。

40

【0004】

さらに、遺伝子治療等においては、目的とする細胞のみに遺伝子を導入することができる遺伝子導入技術が期待されている。特に、神経系疾患の治療には遺伝子治療が有効であると考えられるため、神経細胞に選択的に遺伝子を導入でき、しかも安全性、安定性、持続性及び遺伝子導入効率が高いウイルスベクターの開発が望まれている。

【0005】

50

ボルナウイルスは、非分節の一本鎖マイナス鎖のRNAをゲノムとして持つモノネガウイルス目 (Mononegavirales) に属するウイルスであり、神経細胞に感染指向性があるという特徴を有する。現在、ボルナウイルス科 (Bornaviridae) ボルナウイルス属 (Bornavirus) には、哺乳類に感染するボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) の他、鳥類に感染する鳥ボルナウイルス (Avian Bornavirus: ABV) 等が同定されている。

【0006】

BDVは細胞核で複製するウイルスであるが、その感染は非細胞障害性であり長期に持続感染するという特徴や、感染可能な宿主域が極めて広いという特徴も有する (非特許文献1及び2等)。

【0007】

BDVを利用する外来性遺伝子の細胞への導入技術として、緑色蛍光蛋白質 (GFP) の発現カセットをBDVゲノムの5'末端側の非翻訳領域に挿入し、この組換えウイルスを高活性のポリメラーゼと共にラットに感染させると、ラットの神経細胞においてGFP遺伝子が発現したことが報告されている (非特許文献3)。

【0008】

特許文献1には、(a)ボルナ病ウイルスゲノムをコードするcDNAのG遺伝子の翻訳領域に任意の外来性遺伝子を挿入した組換えウイルスのcDNA、(b)リボザイムをコードするcDNA及び(c)プロモーター配列を含み、該(a)の上流及び下流に(b)が配置され、かつ(a)及び(b)が(c)の下流に配置されているウイルスベクターが開示されている。

【0009】

また、特許文献2には、(a)ボルナ病ウイルスゲノムにおける少なくともN遺伝子、X遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を、ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有し、前記P遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内に外来性遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNA、(b)リボザイムをコードするDNA及び(c)プロモーター配列を含み、該(a)の上流及び下流に(b)が配置され、かつ(a)及び(b)が(c)の下流に配置されていることを特徴とするウイルスベクターが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2010-22338号公報

【特許文献2】WO2010/113647号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】蛋白質 核酸 酵素、Vol. 52、No. 10、p. 1168-1174 (2007)

【非特許文献2】朝長啓造、「ボルナ病ウイルス感染と中枢神経系疾患」、最新医学・第60巻・第2号(2005年2月号別刷)、79-85頁

【非特許文献3】U. Schneider et al., Journal of Virology (2007) p.7293-7296

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

BDVを利用する上記技術によれば、中枢神経系の細胞に選択的に外来性遺伝子を挿入することができると考えられる。しかしながら、上記BDVを用いる技術においては、組換えウイルスの回収効率が高くないことや遺伝子の導入効率が未だ十分ではないなどの課題があり、遺伝子の導入効率をより高くするための改良の余地があった。従って、組換えウイルスの複製効率が高く、感染可能な宿主域が広く、安全性及び外来性遺伝子の導入効率が高く、安定性及び持続性が良好であり、しかも中枢神経系に選択的に外来性遺伝子を導入することができるウイルスベクターとして、更に優れるものが望まれていた。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明は、感染可能な宿主域が広く、外来性遺伝子導入効率が高く、ウイルスゲノムが宿主染色体に挿入されないため安全であり、細胞核で非細胞障害的に外来性遺伝子を発現することができるため細胞内での安定性及び持続性が良好であり、しかも目的細胞（例えば、脳神経系等の中枢神経系の細胞等）に選択的に外来性遺伝子を導入することができ、かつ目的細胞以外の細胞に伝播しないため病原性が低い（安全性が高い）組換えウイルスを効率よく産生できるウイルスベクター、組換えウイルス及び該組換えウイルスを利用する外来性遺伝子の導入方法、外来性遺伝子導入剤等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】

【 0 0 1 4 】

上記課題を解決するため、本発明者らはBDVゲノム（RNAウイルスゲノム）における外来性遺伝子の挿入について鋭意研究を行った。その結果、BDVゲノムにおいて外来性遺伝子を導入する際に、BDVゲノムにおけるG遺伝子とは遺伝子型が異なるG遺伝子を挿入する、即ち、BDVゲノムに外来性遺伝子と共に鳥ポルナウイルス（ABV）のG遺伝子を導入したベクターを作製することで、得られる組換えウイルスの産生能及び回収率がより高い（該ベクターから産生される組換えウイルスの複製効率がより高い）ことを見出し、ひいては外来性遺伝子が効率よく発現されること、すなわち細胞に外来性遺伝子を非常に効率よく導入することができることを見出した。

【 0 0 1 5 】

これまで、既存の組換えBDVベクターにおいては、外来性遺伝子をG遺伝子領域（特許文献1）又はゲノムの5'末端領域（非特許文献3）に挿入して該遺伝子を発現させていた。しかしながら、外来性遺伝子をG遺伝子領域に挿入したベクターは、組換えウイルス産生能が低く、また、該ベクターから産生される組換えウイルスの細胞への感染は一過性であり、持続的に外来性遺伝子を発現できなかった。ゲノムの5'末端領域に外来性遺伝子を挿入した組換えBDVベクターは、遺伝子の導入効率が低かった。また、P遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に外来性遺伝子を挿入した組換えBDVベクターも検討されていた（特許文献2）が、該ベクターは組換えウイルス産生能が未だ十分ではなく、また、当該組換えウイルスの回収量も少ないことから、実用化には未だ問題があった。本発明者らは、BDVゲノムの配列に着目し、元来有するG遺伝子を破壊して、該G遺伝子とは遺伝子型が異なる別個なG遺伝子と共に外来性遺伝子を挿入すること、得られたBDVベクターは、既存の組換えBDVベクターよりウイルス産生能及びその回収効率も高いものであること、該ベクターから産生される組換えウイルスは、脳神経系細胞においても高効率に感染することを見出し、長期間目的遺伝子を発現することができることから、これらを用いると様々な外来性遺伝子を目的細胞に効率よく導入することができることに想到した。

【 0 0 1 6 】

なお、BDVゲノムには、少なくとも6つの蛋白質、すなわち核蛋白質（N蛋白質）、X蛋白質、リン酸化蛋白質（P蛋白質）、マトリックス蛋白質（M蛋白質）、表面糖蛋白質（G蛋白質）及びRNA依存性RNAポリメラーゼ（L蛋白質）がコードされている。図1は、BDVゲノムの構造を模式的に示す図である。図1において、N、X、P、M、G及びLは、それぞれの遺伝子のORFを模式的に示している。BDVゲノムは、図1に示すように、N、X、P、M、G及びLの各遺伝子を、3'末端からこの順に有する。本明細書中、G蛋白質、M蛋白質、N蛋白質、P蛋白質及びL蛋白質をコードするウイルスRNAを、それぞれG遺伝子、M遺伝子、N遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子という。また、例えば、「G遺伝子のcDNA」とは、G遺伝子をコードするcDNAを意味する。

【 0 0 1 7 】

すなわち、本発明は、以下の項1～項15に関する。

項1. ポルナ病ウイルスゲノムにおいて、該ポルナ病ウイルスゲノムにおけるG遺伝子が破壊され、かつ、鳥ポルナウイルスゲノムにおけるG遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNAを含むことを特徴とするウイルスベクター。

10

20

30

40

50

項 2 . (a) ボルナ病ウイルスゲノムにおける少なくとも N 遺伝子、 X 遺伝子、 P 遺伝子及び L 遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する配列に、外来性遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルス RNA の c DNA、 (b) リボザイムをコードする DNA 及び (c) プロモーター配列を含み、該 (a) の上流及び下流に (b) が配置され、かつ (a) 及び (b) が (c) の下流に配置されているウイルスベクターであって、前記 (a) がボルナ病ウイルスゲノムにおける G 遺伝子が破壊され、かつ、鳥ボルナウイルスゲノムにおける G 遺伝子の配列を更に有する組換えウイルス RNA の c DNA であることを特徴とする、項 1 に記載のウイルスベクター。

項 3 . (a) 組換えウイルス RNA の c DNA が、ボルナ病ウイルスゲノムにおける M 遺伝子が更に破壊された配列を有する組換えウイルス RNA の c DNA である項 2 に記載のウイルスベクター。

項 4 . (a) 組換えウイルス RNA の c DNA が、ボルナ病ウイルスゲノムをコードする c DNA の P 遺伝子の翻訳領域と M 遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に外来性遺伝子を挿入した組換えウイルスの c DNA である項 2 に記載のウイルスベクター。

項 5 . (c) プロモーター配列が、RNA ポリメラーゼ II 系のプロモーター配列であることを特徴とする項 2 ~ 4 のいずれかに記載のウイルスベクター。

項 6 . (a) 組換えウイルス RNA の c DNA の上流に (b 1) ハンマーヘッドリボザイムをコードする c DNA が配置され、かつ、該 (a) の下流に (b 2) 型肝炎ウイルスリボザイムをコードする c DNA 配列が配置されていることを特徴とする項 2 ~ 5 のいずれかに記載のウイルスベクター。

項 7 . (a) 組換えウイルス RNA の c DNA が、外来性遺伝子の 3' 末端側及び 5' 末端側にそれぞれ制限酵素サイトを含み、外来性遺伝子の 3' 末端側の制限酵素サイトと P 遺伝子の翻訳領域との間、及び前記外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと L 遺伝子の翻訳領域との間又はボルナ病ウイルスゲノムにおける M 遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する場合には前記外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと M 遺伝子の翻訳領域との間にそれぞれ、配列番号 9 に示す配列を含み、該外来性遺伝子の 3' 末端側の制限酵素サイトと配列番号 9 に示す配列との間に少なくとも塩基配列 cc が挿入され、かつ該外来性遺伝子の 5' 末端側の制限酵素サイトと配列番号 9 に示す配列との間に少なくとも塩基配列 cca が挿入されている配列に基づくことを特徴とする項 2 ~ 6 のいずれかに記載のウイルスベクター。

【 0 0 1 8 】

項 8 . 項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターにコードされる RNA を含むことを特徴とする組換えウイルス。

項 9 . 項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、ボルナ病ウイルスゲノムの N 遺伝子、 P 遺伝子、 L 遺伝子及び鳥ボルナウイルスゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群を *in vitro* の細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含むことを特徴とする組換えウイルスの作製方法。

項 1 0 . 項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、ボルナ病ウイルスゲノムの N 遺伝子、 P 遺伝子及び L 遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群と鳥ボルナウイルスゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミドとを *in vitro* の細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含むことを特徴とする組換えウイルスの作製方法。

項 1 1 . ヘルパープラスミドとして、さらに、ボルナ病ウイルスゲノムの M 遺伝子を発現するプラスミドを *in vitro* の細胞に導入する項 9 又は 1 0 に記載の組換えウイルスの作製方法。

【 0 0 1 9 】

項 1 2 . 項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを細胞又は動物に感染させる工程を含むことを特徴とする外来

10

20

30

40

50

性遺伝子の導入方法。

項 1 3 . 項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを含有することを特徴とする外来性遺伝子導入剤。

項 1 4 . 項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを含有することを特徴とする脳神経系細胞への外来性遺伝子導入剤。

項 1 5 . 項 1 ~ 7 のいずれかに記載のウイルスベクターを含有することを特徴とする外来性遺伝子導入用キット。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、以下の方法、使用等も包含する。

項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスを動物に投与する脳神経系細胞への外来性遺伝子の導入方法。

項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスの、外来性遺伝子導入剤製造のための使用。

項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルスの、脳神経系細胞への外来性遺伝子導入剤製造のための使用。

*in vitro*の細胞又は動物に外来性遺伝子を導入するための、項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルス。

脳神経系細胞に外来性遺伝子を導入するための、項 8 に記載の組換えウイルス、又は項 9 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法により作製された組換えウイルス。

【発明の効果】

【 0 0 2 1 】

本発明によれば、感染可能な宿主域が広く、外来性遺伝子導入効率が高く、ウイルスゲノムが宿主染色体に挿入されないため安全であり、細胞核で非細胞障害的に外来性遺伝子を発現することができるため宿主細胞内での安定性及び持続性が良好であり、しかも脳神経系の細胞等の目的細胞に選択的に外来性遺伝子を導入することができ、かつ目的細胞以外の細胞には伝播しないため病原性が低い（安全性が高い）組換えウイルスを高い生産性で産生できるウイルスベクター及び組換えウイルスを作製することができる。また、本発明によれば、外来性遺伝子を脳神経系の細胞等の目的細胞に選択的にかつ効率よく導入することができ、該細胞において外来性遺伝子を持続的に発現させることができる。さらに、本発明のウイルスベクターから産生される組換えウイルスは、脳神経系細胞等の細胞の核内で持続感染を起こすため、宿主免疫の攻撃を受け難く、排除が起こりにくい。また、本発明の組換えウイルスが持つ P 蛋白質には、宿主免疫の応答経路を阻害するという働きがあり、ウイルス感染細胞では自然免疫の活性化も起こらない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 2 】

【図 1】図 1 は、ボルナ病ウイルスのゲノム（野生型）の構造を模式的に示す図である。

【図 2】図 2（a）は、野生型の BDV ゲノムの cDNA における P 遺伝子の ORF と M 遺伝子の ORF との間の非翻訳領域（BDV ゲノムの塩基の番号で 1875 ~ 1895）を模式的に示した図であり、（b）は、本発明のウイルスベクターにおける外来性遺伝子挿入部位の一例を模式的に示した図である。

【図 3】図 3（a）及び（b）は、本発明のウイルスベクターの元になる RNA 配列構造の一例を模式的に示す図である。

【図 4】図 4（a）及び（b）は、本発明のウイルスベクターの元になる RNA 配列構造の一例を模式的に示す図である。

【図 5】図 5（a）及び（b）は、本発明のウイルスベクターの元になる RNA 配列構造の一例を模式的に示す図である。

【図 6】図 6 は、プラスミド p / m G F P G の作製手順の概略を示す図である。

【図 7】図 7 は、プラスミド p / m G F P G L L の作製手順の概略を示す図である。

【図8】図8は、野生型BDV、組換えウイルスをそれぞれ感染させた細胞における蛋白質の発現を示す顕微鏡写真の代表例を示す図（左図）及びその時のGFP陽性数を示す図（右図）である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、ボルナウイルスベクターに関するものであり、ボルナ病ウイルスゲノムにおいて、該ボルナ病ウイルスゲノムにおけるG遺伝子が破壊され、かつ、鳥ボルナウイルスゲノムにおけるG遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNAを含むことを特徴とする。かかるウイルスベクターがあれば外来性遺伝子を効率よく導入することができるため、本発明のウイルスベクターとしては、後で公知技術に従って外来性遺伝子を導入することもできることから該遺伝子の導入有無は問わない。また、一般に、ボルナ病ウイルスには各種遺伝子が様々なアライメントで配置されたものが含まれるため、以下に便宜的に、本発明のボルナウイルスベクターに好適なボルナ病ウイルスを用いて本発明を説明する。ただし、本発明はこれに限定されるものではない。

10

【0024】

1. ウイルスベクター

本発明の好適なウイルスベクターは、(a)ボルナ病ウイルスゲノムにおける少なくともN遺伝子、X遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を該ボルナ病ウイルスゲノムにおける順序と同じ順序で有する配列に、外来性遺伝子が挿入された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNA、(b)リボザイムをコードするDNA及び(c)プロモーター配列を含み、該(a)の上流及び下流に(b)が配置され、かつ(a)及び(b)が(c)の下流に配置されているものであって、前記(a)がボルナ病ウイルスゲノムにおけるG遺伝子が破壊される一方で、鳥ボルナウイルスゲノムにおけるG遺伝子の配列が挿入されるものであることに一つの特徴を有する。かかるウイルスベクターのことを、態様Aのウイルスベクターと記載する。

20

以下、上記(a)の組換えウイルスRNAのcDNAを、単に「(a)組換えBDVゲノムのcDNA」ともいう。態様Aのウイルスベクターは、本発明の効果を奏する限り、上記(a)、(b)及び(c)以外の配列を含んでもよい。

【0025】

(a)組換えBDVゲノムのcDNA

態様Aにおける(a)組換えBDVゲノムのcDNAは、ボルナ病ウイルスゲノム(BDVゲノム)における少なくともN遺伝子、X遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子が、該BDVゲノムにおける順序と同じ順序で配置され、かつ、該BDVゲノムにおけるG遺伝子が破壊された配列において、外来性遺伝子と前記G遺伝子とは異なる遺伝子型を有する鳥ボルナウイルスゲノム(ABVゲノム)のG遺伝子(以降、G'遺伝子と記載することもある)が挿入された配列を有する。

30

ここで、遺伝子が破壊されたとは、通常、該遺伝子が蛋白質(例えばG遺伝子であればG蛋白質)をコードすることができる形態では存在しないことを意味する。遺伝子の破壊は、その遺伝子全体を削除することの他、該遺伝子の一部の削除、該遺伝子に他の配列を挿入する、該遺伝子中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換する等により行うことができる。

40

【0026】

本発明におけるBDVゲノムとしては、態様Aにおける場合も含めて、ボルナウイルス科(Bornaviridae)ボルナウイルス属(Bornavirus)哺乳類1ボルナウイルス(Mammalian 1 bornavirus)に属するボルナウイルス又はその変異株の遺伝子であればよい。哺乳類1ボルナウイルス(Mammalian 1 bornavirus)には、ボルナ病ウイルス1(Borna disease virus 1:BoDV-1)、ボルナ病ウイルス2(Borna disease virus 2:BoDV-2)等が含まれる。具体的には、例えば、He80、H1766、StrainV、huP2br等のウイルス株や、No/98、Bo/04w、HOT6の変異株を用いることができる。これらのゲノム配列は、例えば、以下から入手可能である。

He80; GenBank Accession# L27077, Cubitt, B., Oldstone, C. and de la Torre, J.C.

50

Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* 68 (3), 1382-1396 (1994).

H 1 7 6 6 ; GenBank Accession# AJ311523, Pleschka, S., Staeheli, P., Kolodziejek, J., Richt, J.A., Nowotny, N. and Schwemmler, M. Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 82 (PT 11), 2681-2690 (2001).

S t r a i n V ; GenBank Accession# U04608, Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A.J., Park, Y.S., Kim, S., Ludwig, H. and Lipkin, W.I. Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (10), 4362-4366 (1994).

h u P 2 b r ; GenBank Accession# AB258389, Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torre, J.C., Ikuta, K. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue, *J. Virol.* 74 (2000) 4601-4611.

N o / 9 8 ; GenBank Accession# AJ311524, Nowotny, N. and Kolodziejek, J. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 74, 5655-5658 (2000).

B o / 0 4 w ; GenBank Accession# AB246670, Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Hagiwara, K., Okamoto, M., Kamitani, W., Yanai, H., Ohtaki, N., Hayashi, Y., Taniyama, H., Ikuta, K. and Tomonaga, K. Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility. *Microbes and Infection* 9 (2007) 417-427.

【 0 0 2 7 】

また、本発明における A B V ゲノムとしては、態様 A における場合も含めて、ボルナウイルス科 (Bornaviridae) ボルナウイルス属 (Bornavirus) に属する鳥類に感染するボルナウイルス又はその変異株の遺伝子であればよい。鳥ボルナウイルスは遺伝的多様性に富んでおり、例えば、オウム目 1 ボルナウイルス (Psittaciform 1 bornavirus) としてオウムボルナウイルス 1 (Parrot bornavirus 1:PaBV-1)、オウムボルナウイルス 2 (Parrot bornavirus 2:PaBV-2)、オウムボルナウイルス 3 (Parrot bornavirus 3:PaBV-3)、オウムボルナウイルス 4 (Parrot bornavirus 4:PaBV-4)、オウムボルナウイルス 7 (Parrot bornavirus 7:PaBV-7) 等；オウム目 2 ボルナウイルス (Psittaciform 2 bornavirus) としてオウムボルナウイルス 5 (Parrot bornavirus 5:PaBV-5) 等；スズメ目 1 ボルナウイルス (Passeriform 1 bornavirus) としてカナリアボルナウイルス 1 (Canary bornavirus 1:CnBV-1)、カナリアボルナウイルス 2 (Canary bornavirus 2:CnBV-2)、カナリアボルナウイルス 3 (Canary bornavirus 3:CnBV-3) 等；スズメ目 2 ボルナウイルス (Passeriform 2 bornavirus) としてカエデチヨウボルナウイルス 1 (Estrildid finch bornavirus 1:EsBV-1) 等；水鳥 1 ボルナウイルス (Waterbird 1 bornavirus) として水鳥ボルナウイルス 1 (Aquatic bird bornavirus 1:ABBV-1)、水鳥ボルナウイルス 2 (Aquatic bird bornavirus 2:ABBV-2) 等が含まれる。また、前記以外に、オウムボルナウイルス 6 (Parrot bornavirus 6:PaBV-6)、オウムボルナウイルス 8 (Parrot bornavirus 8:PaBV-8)、キンバラボルナウイルス 1 (Munia bornavirus 1:MuBV-1) 等を挙げる事ができる。前記した A B V は、系統的には、オウム目 2 ボルナウイルス、スズメ目 1 ボルナウイルス、スズメ目 2 ボルナウイルス、水鳥 1 ボルナウイルス、水鳥 2 ボルナウイルスは Clade2 に、オウム目 1 ボルナウイルスは Clade3 に分類することもできる (Komorizono R. *Microbiol Immunol* 60:437-441 (2016) 参照)。これらの A B V としては、具体的には、例えば、PaBV-1, PaBV-2, PaBV-3, PaBV-4, PaBV-5, CnBV-1, CnBV-2, EsBV-1, ABBV-1, ABBV-2, MuBV-1 等のウイルス株や、これらの変異株を用いることができる。これらのゲノム配列は、例えば、国際塩基配列データベースから以下のアクセッション番号で入手可能である。PaBV-1 : GU249595、PaBV-2 : EU781967、PaBV-3 : FJ169440、PaBV-4 : JN014948、PaBV-7 : JX065210、PaBV-5 : KR612223、CnBV-1 : KC464471、CnBV-2 : KC464478、CnBV-3 : KC595273、EsBV-1 : KF680099、ABBV-1 : KF680099、ABBV-2 : KJ756399、PaBV-6 : FJ7947

10

20

30

40

50

43、PaBV-8 : KJ950625。

【 0 0 2 8 】

なお、B D Vゲノム及びA B Vゲノムは、ボルナウイルスとしての機能が保持されている限り、これらのゲノム配列の一部が他の塩基と置換、削除又は新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されていてもよい。これら誘導体のいずれも本発明に用いることができる。上記一部とは、例えばアミノ酸残基換算で、1乃至数個（通常1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個）であってよい。

【 0 0 2 9 】

態様Aにおける組換えB D Vゲノムは、前記したB D Vゲノムにおいて、少なくともN遺伝子、X遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子が該B D Vゲノムにおける順序と同じ順序で配置され、かつ、G遺伝子が破壊された配列に、A B VゲノムのG遺伝子と任意の外来性遺伝子が挿入されているのであれば、B D VゲノムにおけるM遺伝子が更に配置されたものであってもよい。その場合、前記M遺伝子はB D Vゲノムにおける順序と同じ順序で配置される。

【 0 0 3 0 】

また、本発明におけるA B VゲノムのG遺伝子としては、態様Aにおける場合も含めて、組換え前のB D VゲノムにおけるG遺伝子と遺伝子型が異なるものであればよく、組換え前のB D Vゲノムの種類に応じて適宜設定することができる。具体的には、例えば、組換え前のB D Vゲノムとしてボルナ病ウイルス1 (BoDV-1)のゲノムを用いる場合には、A B VゲノムのG遺伝子としては、Clade2およびClade3のボルナウイルス属に属するA B VのG遺伝子を使用できる。具体的には、オウムボルナウイルス2 (PaBV-2)のG遺伝子、オウムボルナウイルス4 (PaBV-4)のG遺伝子、オウムボルナウイルス5 (PaBV-5)のG遺伝子、キンバラボルナウイルス1 (MuBV-1)のG遺伝子などを1種単独で又は2種以上組み合わせ用いることができる。また、A B VゲノムのG遺伝子が本来の機能を保持しているのであれば、該G遺伝子にB D VゲノムにおけるG遺伝子の一部が融合したもの（キメラ遺伝子）も用いることができる。

【 0 0 3 1 】

A B VゲノムのG遺伝子の挿入箇所としては、特に限定されず、例えば、態様Aの場合、B D VゲノムにおけるP遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内、組換えB D VゲノムがB D VゲノムにおけるM遺伝子を該B D Vゲノムにおける順序と同じ順序で有する場合には、M遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内、B D VゲノムにおけるL遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内などが挙げられる。

【 0 0 3 2 】

本発明における外来性遺伝子は、その種類や長さは特に限定されず、目的に応じて所望の遺伝子を用いることができる。例えば、蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子のc D N A、s i R N A、short hairpin RNA (shRNA)、microRNA (miRNA)をコードするc D N A、R N Aアプタマーをコードするc D N A等を用いることができる。本発明のウイルスベクターにおいては、1又は2以上の外来性遺伝子を使用することができる。

【 0 0 3 3 】

外来性遺伝子の挿入箇所としては、特に限定されないが、例えば、態様Aの場合、B D VゲノムにおけるP遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内に挿入されることが好ましい。また、組換えB D VゲノムがB D VゲノムにおけるM遺伝子を該ゲノムにおける順序と同じ順序で有する場合には、P遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域内に挿入されることが好ましい。外来性遺伝子がこのような箇所に挿入されていることにより、ウイルスベクターの組換えウイルス生産性、すなわち該ウイルスベクターから産生される組換えウイルスの複製効率をより高くすることができるため、効率よく組換えウイルスを産生することができる。また、該ウイルスベクターから産生（複製）される組換えウイルスは、細胞に導入した場合に外来性遺伝子を効率よく発現できるものとなる。従って、本発明のウイルスベクターを細胞に導入した際、又は該ウイルスベクターから産生される組換えB D V粒子を細胞に感染させた際に、任意の外来性遺伝子が効率よ

10

20

30

40

50

く細胞に導入される。すなわち、外来性遺伝子が細胞内において効率よく発現されることになる。図2(a)に示すように、野生型のBDVゲノムのcDNAにおいて、P遺伝子のORFの下流に連結する非翻訳領域(すなわちBDVゲノムにおけるP遺伝子とM遺伝子との間の非翻訳領域)(例えば、配列番号1にそのcDNA配列が示されるBDVゲノムの塩基の番号で1875~1895(すなわち配列番号1の1875~1895番の塩基))には、P遺伝子の停止シグナル配列(配列番号1の塩基の番号で1875~1882)及びM遺伝子の開始シグナル配列(配列番号1の塩基の番号で1875~1890)が存在する。P遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域(例えば、配列番号1の塩基の番号で1878~1892の間)における外来性遺伝子の挿入部位としては、P遺伝子の停止シグナル配列及び/又はM遺伝子の開始シグナル配列を含まない領域が好ましく、P遺伝子の停止シグナル配列及びM遺伝子の開始シグナル配列を含まない領域がより好ましく、例えば、配列番号1にそのcDNA配列が示されるBDVゲノムであれば、配列番号1の塩基の番号で1890と1891の間等が更に好ましい。なお、ABVゲノムのG遺伝子の挿入箇所と外来性遺伝子の挿入箇所が同じ範囲内となる場合には、ABVゲノムのG遺伝子と外来性遺伝子のいずれが上流にあってもよく、ABVゲノムのG遺伝子、外来性遺伝子の順に、あるいは、外来性遺伝子、ABVゲノムのG遺伝子の順に挿入されることができる。外来性遺伝子が2以上ある場合は、別々に挿入されても、同一箇所に挿入されてもよい。

10

20

30

40

50

【0034】

また、外来性遺伝子の挿入においては、その両側又は片側(好ましくは、両側)に制限酵素サイトを含むことができる。制限酵素サイトを有すると、外来性遺伝子をBDVゲノムの配列中に容易に組み込みやすくなると共に、外来性遺伝子の蛋白質への翻訳効率が上昇するため好ましい。本発明において、外来性遺伝子の両側又は片側に配置することができる制限酵素サイトとしては、例えば、外来性遺伝子の3'末端側については、BstBIサイト、PacIサイト、Sse8387Iサイト、SwaIサイト、KpnIサイト等が挙げられ、BstBIサイトが好ましい。外来性遺伝子の5'末端側については、PacIサイト、BstBIサイト、Sse8387Iサイト、SwaIサイト、KpnIサイト等が挙げられ、PacIサイトが好ましい。

【0035】

また、態様Aにおける組換えBDVゲノムがM遺伝子を含む場合には、該組換えBDVゲノムのcDNAは、外来性遺伝子(及び必要に応じてその両側又は片側に配置される制限酵素サイト)とP遺伝子のORFとの間、及び外来性遺伝子(及び必要に応じてその両側又は片側に配置される制限酵素サイト)とM遺伝子のORFとの間にそれぞれ、P遺伝子の停止シグナル配列及びM遺伝子の開始シグナル配列(taaaaaatcgatca(配列番号9))を含む配列が存在することが好ましい。本発明における組換えBDVゲノムのcDNAにおいては、例えば、図2(b)にあるような配列で任意の外来性遺伝子が挿入されていることがより好ましい。図2(b)には、一例としてM遺伝子を含む組換えBDVゲノムのcDNAが示されている。M遺伝子が削除されている場合にも、図2(b)に示されるように、外来性遺伝子の下流にP遺伝子の停止シグナル配列及びM遺伝子の開始シグナル配列(配列番号9)を含む配列を有することが好ましい。M遺伝子が削除されている場合、図2(b)に示される外来性遺伝子の下流のP遺伝子の停止シグナル配列及びM遺伝子の開始シグナル配列は、外来性遺伝子の停止シグナル及びL遺伝子の開始シグナルとして機能する。なお、図2(b)では、一例として外来性遺伝子の3'末端側にBstBIサイト、外来性遺伝子の5'末端側にPacIサイトをそれぞれ挿入した場合を示しているが、外来性遺伝子の両側に配置する制限酵素サイトは、これらに限定されるものではない。

【0036】

かくして、態様Aの組換えBDVゲノムにおける各遺伝子の配置を設定することができる。

【0037】

このような組換えBDVゲノムのcDNAとしては、前記したように各遺伝子が配置された配列をコードするcDNAの他、前記したように各遺伝子が配置された配列を有するRNAのcDNA、前記したように各遺伝子が配置された配列を有する組換えウイルスRNAのcDNAを用いることができる。以下に、態様Aの(a)組換えBDVゲノムのcDNAの好適態様を図3～5に模式的に示す。

【0038】

図3(a)は、BDVゲノムにおいてG遺伝子が破壊(削除)された配列を有し、かつP遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域にG'遺伝子、外来性遺伝子(図3中ではGFP)がこの順に挿入された配列を有する組換えBDVゲノムのcDNAである(態様1-1)。図3(b)は、態様1-1においてM遺伝子が破壊(削除)された態様を示す(態様1-2)。

10

【0039】

図4(a)は、BDVゲノムにおいてG遺伝子が破壊(削除)された配列を有し、かつP遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に外来性遺伝子(図4中ではGFP)が、M遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内にG'遺伝子が挿入された配列を有する組換えBDVゲノムのcDNAである(態様2-1)。図4(b)は、態様2-1においてM遺伝子が破壊(削除)された態様であり、この場合、P遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域に外来性遺伝子、G'遺伝子がこの順に挿入された配列を示す(態様2-2)。

20

【0040】

図5(a)は、BDVゲノムにおいてG遺伝子が破壊(削除)された配列を有し、かつP遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に外来性遺伝子(図5中ではGFP)が、L遺伝子の翻訳領域の下流に連結する非翻訳領域内にG'遺伝子が挿入された配列を有する組換えBDVゲノムのcDNAである(態様3-1)。図5(b)は、態様3-1においてM遺伝子が破壊(削除)された態様を示す(態様3-2)。

【0041】

なお、天然型BDVゲノムにおいては、L遺伝子はG遺伝子により分断されているが、態様Aにおける組換えBDVゲノムにおいてはG遺伝子が削除されることもあるため、L遺伝子のイントロンも削除されて、L遺伝子の翻訳領域(ORF)が連結されていてもよい。これにより、組換えウイルスの複製能力、すなわち細胞内での外来性遺伝子の発現効率がより向上する。また、L遺伝子のイントロンを削除することにより、より大きな外来性遺伝子を挿入することが可能となる。L遺伝子のイントロンの除去は、公知の方法により行うことができる。

30

【0042】

また、態様Aの組換えBDVゲノムにおいてM遺伝子が削除されている場合には、天然型BDVゲノムからG遺伝子とM遺伝子が削除されることになるため、ウイルスベクターから産生される組換えウイルスの病原性がより低減され、安定性がより高いものとなる。

【0043】

組換えBDVゲノムのcDNAは、当該ウイルスゲノム情報に基づいて調製することができる。例えば、RNAゲノムから、逆転写酵素を使用してcDNAを調製することができる。また、所望の配列に基づいて、DNA合成機を用いて化学合成することもできる。あるいは、公知のPCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。PCR、プライマーの調製等の操作は、公知の遺伝子工学的的手法(遺伝子操作技術)により行うことができる。

40

【0044】

(b)リボザイムをコードするDNA

リボザイムとしては、(a)組換えウイルスのcDNAから転写された任意の外来性遺伝子を切断することができる配列のものであればよい。(b)としては、例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HamRz)、型肝炎ウイルスリボザイム(HDV Rz)、ヘアピンリボザイム、人工リボザイム等のリボザイムをコードするcDNA等のDNAが挙げ

50

られる。また、リボザイム活性を有する限り、上記リボザイムの改変型リボザイムをコードする cDNA 等の DNA も使用することができる。改変型リボザイムとしては、共通配列を有し、1～数个（数个とは、例えば、10個、好ましくは5個、より好ましくは3個、更に好ましくは2個である）の塩基が置換、欠損又は付加された塩基配列からなり、かつリボザイムとして機能するポリヌクレオチド等が挙げられる。中でも、本発明におけるリボザイムとしては、ハンマーヘッドリボザイム（HamRz）、型肝炎ウイルスリボザイム（HDVRz）が好ましい。また、(a)組換えBDVゲノムのcDNAの上流、すなわち3'末端側に(b1)HamRzをコードするDNA（好ましくはcDNA）が配置され、かつ、該(a)の下流、すなわち5'末端側に(b2)HDVRzをコードするDNA（好ましくはcDNA）配列が配置されていることがより好ましい。これにより、細胞における外来性遺伝子の発現効率が向上する。

10

【0045】

HamRzの塩基配列は、Yanai et al., *Microbes and Infections* 8 (2006) 1522-1529、Mercier et al., *J. Virol.* 76 (2002) 2024-2027及びInoue et al., *J. Virol. Methods* 107 (2003) 229-236等に記載されている。

HDVRzの塩基配列は、Ferre-D'Amare, A.R., Zhou, K. and Doudna, J.A. *Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme.* *Nature* 395 (6702), 567-574 (1998)等に記載されている。

本発明においては、これらの文献に記載されているHamRzの塩基配列をコードするcDNA及びHDVRzの塩基配列をコードするcDNAを用いることができる。本発明における好ましいHamRzの塩基配列及びHDVRzの塩基配列を以下に示す。

20

HamRz:

5' -UUGUAGCCGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACUAUAGGAAAGGAAUCCUAUAGUCAGCGCUACAACAAA-3'
(配列番号2)

HDVRz:

5' -GGCCGGCAUGGUCCAGCCUCCUCGUGGCGCCGGCUGGGCAACACCAUUGCACUCCGGUGGCGAAUGGGAC-3'
(配列番号3)

【0046】

(c) プロモーター配列

本発明における(c)プロモーター配列としては、RNAポリメラーゼII系のプロモーター配列、RNAポリメラーゼI系のプロモーター配列、T7ポリメラーゼ系のプロモーター配列が挙げられる。中でもRNAポリメラーゼII系のプロモーター配列が好ましい。RNAポリメラーゼII系のプロモーターとしては、CMVプロモーター、CAGGSプロモーターが挙げられる。中でも、CAGGSプロモーターが好ましい。このようなプロモーター配列は、例えば、J.A. Sawicki, R.J. Morris, B. Monks, K. Sakai, J. Miyazaki, *A composite CMV-IE enhancer/b-actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium,* *Exp. Cell Res.* 244 (1998) 367-369に記載されている。

30

【0047】

態様Aのウイルスベクターにおける(a)、(b)及び(c)の配置としては、(a)の上流及び下流に(b)が配置され、かつ(a)及び(b)が(c)の下流に配置されていれば特に限定はないが、好ましい態様としては、(a)の上流に(b1)ハンマーヘッドリボザイムをコードするcDNAが配置され、(a)の下流に(b2)型肝炎ウイルスリボザイムをコードするcDNA配列が配置されている態様が挙げられる。また、(a)及び(b)が(c)RNAポリメラーゼII系のプロモーターの下流に配置されている態様が挙げられる。またさらに、(a)の上流に(b1)ハンマーヘッドリボザイムをコードするcDNAが配置され、(a)の下流に(b2)型肝炎ウイルスリボザイムをコードするcDNA配列が配置され、かつ、(a)及び(b1)が(c)RNAポリメラーゼII系のプロモーターの下流に配置されている態様が挙げられる。

40

【0048】

50

(d) その他の塩基配列

本発明のウイルスベクターは、態様Aの場合も含めて、前記(a)、(b)及び(c)以外に、その他の塩基配列として、SV40ウイルス複製開始点/プロモーター領域配列の一部又は全部の配列を含むことができる。また、ウイルスベクターがSV40ウイルス複製開始点/プロモーター領域配列の一部又は全部の配列を含む場合には、該配列は(a)及び(b)の下流に配置されていることが好ましい。SV40ウイルスDNAの複製開始点/プロモーター領域配列の一部としては、SV40複製開始点/プロモーター領域内の5'側の113塩基からなる断片が好適である。

SV40ウイルス複製開始点/プロモーター領域配列(配列番号4)は、例えば、D.A. Dean, B.S. Dean, S. Muller, L.C. Smith, Sequence requirements for plasmid nuclear import, Exp. Cell. Res. 253 (1999) 713-722等に記載されている。

【0049】

本発明のウイルスベクターは、本発明の効果を奏する限り、さらに、蛋白質の発現に有利である1又は複数の因子、例えば、エンハンサー、アクティベーター(例えばトランス作用因子)、シャペロン、プロセッシングプロテアーゼをコードする1又は複数の核酸配列も含み得る。また、本発明のウイルスベクターは、選択された細胞内で機能的であるいずれかの因子を有していてもよい。

【0050】

本発明のウイルスベクターは、線状DNAであっても環状DNAであってもよいが、細胞に導入する際には環状であることが好ましい。環状のウイルスベクターとしては、例えば、態様Aのウイルスベクターの必須の配列である上記(a)、(b)及び(c)のDNA、並びに必要に応じて含まれる上記(d)のDNAが、上述した所定の順番で、市販のプラスミドベクター中に配置されているもの等が挙げられる。市販のプラスミドベクターとしては、ウイルスベクターを導入する細胞内で自己複製可能なものであればよく、例えば、pBluescript SKII(-)、pCAGGS、pCXN2、pCDNA3.1等が挙げられる。

【0051】

2. ウイルスベクターの作製方法

本発明のウイルスベクターの作製方法としては特に限定されず、自体公知の遺伝子工学的手法を用いればよい。具体的には、例えば、態様Aのウイルスベクターの場合、Yanai et al., Microbes and Infection 8 (2006), 1522-1529の“Materials and methods”の2.2 Plasmid constructionに記載されている方法において、CAT遺伝子をBDVのゲノム配列に置き換え、さらにP遺伝子の下流に連結する非翻訳領域(P遺伝子とM遺伝子との間の非翻訳領域)内に目的とする外来性遺伝子を挿入して得られたウイルスベクターを鋳型にして、PCR等によりG遺伝子に欠損変異等を挿入することで、G遺伝子が欠損したウイルスベクター(G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターともいう)を作製する。ついで、得られたG遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターの所望の領域に、ABVゲノムのG遺伝子を挿入することによって、本発明の自己複製型(持続感染型)のウイルスベクターを作製することができる。上記方法により作製されるウイルスベクターとしては、例えば、ABVゲノムのG遺伝子を外来性遺伝子の下流に挿入した場合、(a)組換えウイルスRNAのcDNAとして、BDVゲノムをコードするcDNAのP遺伝子の翻訳領域とM遺伝子の翻訳領域との間の非翻訳領域に、ABVゲノムのG遺伝子と外来性遺伝子をこの順に挿入した組換えBDVゲノムのcDNA(例えば、図3(a)に模式的に示される構造を有する組換えウイルスのcDNA)を有するものである。なお、G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターの作製において、好ましくは、L遺伝子のイントロン部分も同様にPCRにより削りとることができる。また、M遺伝子についても、同様に、G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを鋳型にPCR等により欠損させて作製することができる(G遺伝子及びM遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターともいう)。

【0052】

ウイルスベクターが線状の場合には、上記環状のウイルスベクターを、(a)組換えBDVゲノムのcDNA領域、(c)プロモーター配列の領域、及びその他蛋白質発現に必

10

20

30

40

50

要なシグナル配列領域以外の領域で1箇所切断する制限酵素を該ベクターの種類にあわせて適宜選択し、該制限酵素により環状のウイルスベクターを切断することにより線状のウイルスベクターを作製することができる。

【0053】

本発明のウイルスベクターに含まれる外来性遺伝子を目的細胞に導入する方法としては、該ウイルスベクターを後述するヘルパープラスミドと共に目的細胞に導入する方法、該ウイルスベクターから産生される組換えウイルスを目的細胞に感染させる方法があるが、ウイルスベクターから産生される組換えウイルスを用いる方法が好ましい。本発明のウイルスベクターから産生される組換えウイルスは、野生型BDVゲノムの代わりに上記ウイルスベクターにコードされるRNAを有する組換え型BDVである。

10

【0054】

3. 組換えウイルス

上記ウイルスベクターにコードされるRNAを含む組換えウイルスも、本発明の1つである。好ましくは、ウイルスベクターにコードされるRNA、並びに態様Aのウイルスベクターを用いた場合はBDVのN蛋白質、BDVのP蛋白質、BDVのL蛋白質及びABVのG蛋白質を含む組換えウイルスである。本発明の組換えウイルスは、上記組換えBDVゲノムを含むことにより、細胞に感染後、持続的に外来性遺伝子を発現することができる持続感染型の組換えウイルスである。組換えウイルスは、所望によりBDVのM蛋白質を有していてもよい。

20

【0055】

本発明の組換えウイルスは、例えば、上記ウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、例えば、BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子、L遺伝子及びABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群をin vitroの細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含む方法により作製することができる。また、本発明においては、例えば、態様Aのウイルスベクターを用いて組換えウイルスとして上記した組換えBDVゲノムを含むものが産生されるのであれば、組換えBDVゲノムにおける各遺伝子を個別にヘルパープラスミドにより導入して産生してもよい。例えば、ヘルパープラスミドとして、BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群と共に、ABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミドを用いることができる。すなわち、上記ウイルスベクターとして、ABVゲノムのG遺伝子を組み入れる前のG遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターと共に、ヘルパープラスミドとして、BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群とABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミドとをin vitroの細胞に導入する工程、ならびに該ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる工程を含む方法により作製することができる。このような組換えウイルスの作製方法も、本発明の1つである。このような方法により、in vitroで組換えウイルスを産生することができる。ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを導入するin vitroの細胞は、通常、培養細胞である。

30

【0056】

また、態様AのウイルスベクターにおいてG遺伝子及びM遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いる場合には、ヘルパープラスミドとして、更に、BDVゲノムのM遺伝子を発現するプラスミドを細胞に導入することが好ましい。すなわち、G遺伝子及びM遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いる場合には、上記BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子、L遺伝子及びABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群と共に、あるいは、BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子を発現するプラスミド又はプラスミド群とABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミドと共に、BDVゲノムのM遺伝子を発現するプラスミドをin vitroの細胞に導入することができる。

40

【0057】

ヘルパープラスミドは、BDVゲノムのN遺伝子、P遺伝子、L遺伝子及びM遺伝子、

50

並びに A B V ゲノムの G 遺伝子それぞれを発現することができるものであればよく、これらの遺伝子の 2 つ以上が 1 つのプラスミドに含まれていてもよく、これらの遺伝子がそれぞれ別のプラスミドに含まれていてもよい。例えば、B D V ゲノムの N 遺伝子、P 遺伝子及び L 遺伝子を発現するプラスミドとしては、下記 (1) ~ (4) のいずれかのプラスミド又はプラスミド群等が好適に用いられる。また、A B V ゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミドとしては、下記 (1) ~ (4) において各項の 1 又は 2 以上のプラスミドに A B V ゲノムの G 遺伝子が適宜組み込まれたものであっても、A B V ゲノムの G 遺伝子を個別に発現するプラスミドであってもよい。本発明で用いられるヘルパープラスミドとしては、(1) ~ (3) のいずれかのプラスミド (群) と A B V ゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミドのセット、あるいは (1) ~ (3) に記載のいずれかのプラスミドに A B V ゲノムの G 遺伝子が組み込まれたプラスミドを含む (1) ~ (3) のいずれかのプラスミド (群) が好ましい。

(1) B D V ゲノムの N 遺伝子を発現するプラスミド、B D V ゲノムの P 遺伝子を発現するプラスミド及び B D V ゲノムの L 遺伝子を発現するプラスミド

(2) B D V ゲノムの N 遺伝子及び P 遺伝子を発現するプラスミド、並びに B D V ゲノムの L 遺伝子を発現するプラスミド

(3) B D V ゲノムの N 遺伝子及び L 遺伝子を発現するプラスミド、並びに B D V ゲノムの P 遺伝子を発現するプラスミド

(4) B D V ゲノムの N 遺伝子、L 遺伝子及び P 遺伝子を発現するプラスミド

【 0 0 5 8 】

また、B D V ゲノムの M 遺伝子を発現するヘルパープラスミドとしては、B D V ゲノムの M 遺伝子を発現するプラスミドの他、B D V ゲノムの N 遺伝子、L 遺伝子、P 遺伝子及び A B V ゲノムの G 遺伝子からなる群より選択される 1 種以上の遺伝子と B D V ゲノムの M 遺伝子を発現するプラスミドを用いることもできる。

【 0 0 5 9 】

ヘルパープラスミドは、組換え B D V ゲノムの複製に必要なウイルス蛋白質を提供するものであり、ウイルスベクターと共にヘルパープラスミドを細胞に導入することにより、感染性のある組換えウイルスを産生することができる。また、本発明の組換えウイルスの作製方法に用いられるウイルスベクター及びその好ましい態様としては、上述したのと同様である。

【 0 0 6 0 】

本発明におけるヘルパープラスミド (群) は、上記ウイルスベクターと共に細胞に導入された際に、該細胞内で B D V ゲノムの N 遺伝子、P 遺伝子、L 遺伝子及び A B V ゲノムの G 遺伝子を発現することができるものであればよい。例えば、B D V ゲノムの N 遺伝子を発現するプラスミドとしては、プロモーター配列の下流に B D V ゲノムの N 遺伝子の c D N A が配置されたプラスミドが好ましい。B D V ゲノムの P 遺伝子を発現するプラスミドとしては、プロモーター配列の下流に B D V ゲノムの P 遺伝子の c D N A が配置されたプラスミドが好ましい。B D V ゲノムの L 遺伝子を発現するプラスミドとしては、プロモーター配列の下流に B D V ゲノムの L 遺伝子の c D N A が配置されたプラスミドを用いることが好ましい。A B V ゲノムの G 遺伝子を発現するプラスミドとしては、プロモーター配列の下流に A B V ゲノムの G 遺伝子の c D N A が配置されたプラスミドを用いることが好ましい。B D V ゲノムの M 遺伝子を発現するプラスミドとしては、プロモーター配列の下流に B D V ゲノムの M 遺伝子の c D N A が配置されたプラスミドを用いることが好ましい。また、2 以上の遺伝子を発現するプラスミドは、プロモーター配列の下流に所望の遺伝子の c D N A を所望の順で配置されたプラスミドを用いることができる。

【 0 0 6 1 】

また、外殻遺伝子にコードされる外殻蛋白質は、通常膜貫通型蛋白質であり、そのアミノ酸配列中に、細胞外に位置する領域 (細胞外配列)、細胞膜貫通領域 (細胞膜貫通配列)、及び細胞内に位置する領域 (細胞内配列) を含む。本発明においては、A B V ゲノムの G 遺伝子としては、A B V ゲノムの G 蛋白質の細胞内配列、細胞膜貫通配列及び細胞外

10

20

30

40

50

配列を有するものが好ましいが、少なくとも、A B VゲノムのG蛋白質の細胞内配列を含むものであればよい。細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードする外殻遺伝子をヘルパープラスミドに用いると、遺伝子が由来するウイルスの種類により、産生されるウイルスの細胞指向性を変化させることができる。よって、本発明においては、A B VゲノムのG遺伝子を発現するヘルパープラスミドは、本発明の効果を損なわない範囲内で、その他の外殻遺伝子を発現するものであってもよい。具体的には、例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、レトロウイルス等の宿主細胞膜を外殻として利用する全てのエンベロープウイルスの外殻遺伝子他、B D Vもしくはカワリリスボルナウイルス(VSBV-1)のG遺伝子の一部が含まれていてもよい。また、例えば、上皮系、呼吸器系細胞等に組換えウイルスを感染させる場合には、上皮系、呼吸器系細胞等への指向性が高いウイルス(例えば麻疹ウイルス、センダイウイルス、水疱性口内炎ウイルス等)の外殻蛋白質の細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードし、かつA B VのG蛋白質の細胞内配列をコードする、外殻遺伝子を発現するヘルパープラスミドを用いることが好ましい。

10

【0062】

B D VゲノムのN遺伝子のc D N A、P遺伝子のc D N A及びL遺伝子のc D N Aは、B D VゲノムのN遺伝子、P遺伝子及びL遺伝子それぞれの配列情報に基づいて調製することができる。A B VゲノムのG遺伝子のc D N Aは、A B VゲノムのG遺伝子の配列情報他、公知の外殻遺伝子の配列情報に基づいて調製することができる。B D VゲノムのM遺伝子のc D N Aは、B D VゲノムのM遺伝子の配列情報に基づいて調製することができる。例えば、R N Aから、配列逆転写酵素を使用してc D N Aを調製することができる。また、R N Aの配列に基づき、D N A合成機を用いて化学合成することができる。

20

【0063】

B D VゲノムのN遺伝子、P遺伝子、L遺伝子及びM遺伝子としては、例えば、上述したCubitt, B., Oldstone, C. and de la Torre, J.C. Sequence and genome organization of Borna disease virus. J. Virol. 68 (3), 1382-1396 (1994)に記載されている配列の遺伝子を、A B VゲノムのG遺伝子としては、例えば、上述した国際塩基配列データベースから以下のアクセッション番号：PaBV-1：GU249595、PaBV-2：EU781967、PaBV-3：FJ169440、PaBV-4：JN014948、PaBV-7：JX065210、PaBV-5：KR612223、CnBV-1：KC464471、CnBV-2：KC464478、CnBV-3：KC595273、EsBV-1：KF680099、ABBV-1：KF680099、ABBV-2：KJ756399、PaBV-6：FJ794743、PaBV-8：KJ950625に記載されている配列の遺伝子をそれぞれ用いることができる。また、これらの遺伝子として、上記の配列に従って合成したR N Aを使用することもできる。さらに、B D VゲノムのN、P、L及びM蛋白質、あるいはA B VゲノムのG蛋白質それぞれで保存されているアミノ酸配列をもとにハイブリダイゼーション、P C R法により断片を取得することが可能である。さらに他の既知の各遺伝子の配列を基に設計したミックスプライマーを用い、ディジェネレートR T - P C Rによって断片を取得することが可能である。取得した断片は通常的手法により塩基配列を決定することができる。さらに、本発明における各遺伝子は該遺伝子にコードされる蛋白質が、それぞれ該当する蛋白質が元来有する機能を保持している限り、塩基配列の一部が他の塩基と置換、削除又は新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されていてもよい。これら誘導体のいずれも本発明に用いることができる。上記一部とは、例えばアミノ酸残基換算で、1乃至数個(1~5個、好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個)であってよい。

30

40

【0064】

このようなN遺伝子として、例えば、B D VゲノムのN遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつN蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするR N Aも、本発明におけるB D VゲノムのN遺伝子として使用できる。また、B D VゲノムのP遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつP蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするR N Aも、本発明におけるB D VゲノムのP遺伝子として使用できる。B D VゲノムのL遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%

50

以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつL蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするRNAも、本発明におけるBDVゲノムのL遺伝子として使用できる。ABVゲノムのG遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつG蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするRNAも、本発明におけるABVゲノムのG遺伝子として使用できる。BDVゲノムのM遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつM蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするRNAも、本発明におけるBDVゲノムのM遺伝子として使用できる。配列同一性は、CLUSTAL W, GCG program, GENETYX, BLAST searchにより決定される。

【0065】

水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、レトロウイルス等のBDV以外のウイルスの外殻遺伝子として、例えば、水疱性口内炎ウイルスはGeneBank, No: J02428.1、狂犬病ウイルスはGeneBank, No: AB044824.1に記載されている配列の遺伝子等を用いることができる。好ましくは、これらの外殻遺伝子中の外殻蛋白質の細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードする配列を用いる。外殻遺伝子中の外殻蛋白質の細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードする配列は、Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (penetrene). Virol J. 145(6), Sep-18 (2009)等に記載されている。また、これらの遺伝子として、上記の配列に従って合成したRNAを使用することもできる。さらに、このような外殻遺伝子と少なくとも約90%、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の配列同一性を有し、かつ外殻蛋白質の機能を有するポリペプチドをコードするRNAも、本発明におけるウイルスの外殻遺伝子として使用できる。

【0066】

ヘルパープラスミドは、細胞に導入する際には線状であっても問題はないが、環状であることが好ましい。環状のヘルパープラスミドは、例えば、本発明におけるヘルパープラスミドの必須の配列であるプロモーター配列及び蛋白質のcDNAが配置された形態で、蛋白質の発現に有利である1又は複数の因子、例えば、エンハンサー、アクティベーター(例えばトランス作用因子)、シャペロン、プロセッシングプロテアーゼをコードする1又は複数の核酸配列も含み得る。また、選択された細胞内で機能的であるいずれかの因子を有していてもよい。ヘルパープラスミドは、該ヘルパープラスミドを導入する細胞内で自己複製可能な市販のプラスミドベクターを使用して構築するのが好ましく、市販のプラスミドベクターとしては、例えば、pCAGGS、pCXN2、pCDNA3.1等が挙げられる。ヘルパープラスミドにおけるプロモーター配列は、RNAポリメラーゼII系のプロモーターが好ましい。

【0067】

これらのヘルパープラスミドは、自体公知の遺伝子工学的手法により作製することができる。例えば、BDVゲノムのN遺伝子を発現するプラスミド、BDVゲノムのP遺伝子を発現するプラスミド及びBDVゲノムのL遺伝子を発現するプラスミドは、Yanai et al., Microbes and Infection 8 (2006), 1522-1529の“Materials and methods”の2.2 Plasmid constructionに記載されている方法により作製することができる。

【0068】

2以上の遺伝子を発現するプラスミドとして、例えば、BDVゲノムのN遺伝子及びP遺伝子を発現するプラスミドとしては、具体的には、BDVゲノムのN遺伝子を発現するプラスミドのN遺伝子のcDNAの下流のユニークな制限酵素配列領域から、N遺伝子のcDNAやプロモーターなどのシグナル配列を切断しない制限酵素を適宜選択し、その制限酵素サイトにBDVゲノムのP遺伝子のcDNAを挿入することで作製することができる。BDVゲノムのN遺伝子及びL遺伝子を発現するプラスミドとしては、例えば、BDVゲノムのN遺伝子を発現するプラスミドのN遺伝子のcDNAの下流のユニークな制限酵素配列領域から、N遺伝子のcDNAやプロモーターなどのシグナル配列を切断しない

10

20

30

40

50

制限酵素を適宜選択し、その制限酵素サイトにBDVゲノムのL遺伝子のcDNAを挿入することで作製することができる。ただし、N遺伝子のcDNA領域とL遺伝子又はP遺伝子のcDNAが挿入された領域との間の領域にL遺伝子又はP遺伝子の発現を促進するようなプロモーター配列や配列内部リボソーム進入部位などの配列を挿入することも可能である。

【0069】

ABVゲノムのG遺伝子を発現するプラスミドは、BDVゲノムのN遺伝子、L遺伝子又はP遺伝子を発現するヘルパープラスミドの作製において、例えば、BDVゲノムのN遺伝子のcDNAの代わりにABVゲノムのG遺伝子のcDNAを用いることによって作製することができる。また、BDVのM遺伝子を発現するプラスミドにABVゲノムのG

10

【0070】

ABV以外のウイルスの外殻蛋白質の細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードし、かつABVゲノムのG蛋白質の細胞内配列をコードする外殻遺伝子を発現するヘルパープラスミドは、例えば、ABV以外のウイルスの外殻遺伝子を発現するプラスミドを鋳型に、適当なプライマーを用いてPCRを行なって、任意のウイルス外殻遺伝子の細胞内配列をコードする配列をABVゲノムのG蛋白質の細胞内配列をコードする配列で置換することにより作製することができる。このようなヘルパープラスミドは、例えば、BDVのG蛋白質の細胞内配列をコードする遺伝子配列をABVゲノムのG蛋白質の細胞内配列をコードする配列で置換してもよく、BDVのG蛋白質の細胞内配列をコードする遺伝子配列としては、例えば配列番号1にそのcDNA配列が示されるBDVゲノムでは3712~3747番目の配列(配列番号1の3712~3747番目の塩基)である。

20

【0071】

上記のウイルスベクターを細胞に導入する際は、例えば、該ウイルスベクターを含むベクター組成物を用いることができる。ベクター組成物は、ウイルスベクター以外にヘルパープラスミドを含んでいてもよい。ベクター組成物は、ウイルスベクター及びヘルパープラスミド以外にも、導入方法及び導入対象等に応じて、その他の成分、例えば、適当な緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、細胞培養標準液等を含んでいてもよい。

30

【0072】

ベクター組成物中の上記ウイルスベクターの含有量としては、感染方法及び感染対象等に応じて適宜選択すればよいが、例えば、DNA濃度として約0.25~2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のウイルスベクターを含むことが好ましい。

【0073】

ベクター組成物中の例えば、各ヘルパープラスミドの含有量としては、上記ウイルスベクター1 μg に対して約0.0125~0.125 μg とすることが好ましい。

【0074】

上記ウイルスベクター及びヘルパープラスミドをin vitroで細胞に導入する方法としては特に限定されず、例えば、市販のトランスフェクション試薬を用いる自体公知の方法を採用することができる。市販のトランスフェクション試薬としては、例えば、FuGENE 6 transfection reagent (Roche Molecular Diagnostics (登録商標)、Pleasanton, CA)等が挙げられるが特に限定されない。具体的には、例えば、上記量のウイルスベクター及びヘルパープラスミド、並びに緩衝液等を含むベクター組成物に、市販のトランスフェクション試薬を適量加え、これをウイルスベクター1 μg に対して通常約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ 個、好ましくは約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個の細胞に加えることによりウイルスベクター及びヘルパープラスミドを該細胞に導入することができる。なお、ウイルスベクター及びヘルパープラスミドは、同時に細胞に導入してもよく、別々に導入してもよい。別々に導入する際の導入順序は、特に限定されない。

40

【0075】

50

ウイルスベクターを導入する細胞としては、ウイルスベクターの導入により本発明における組換えウイルスを産生することができる哺乳類の培養細胞等であればよいが、例えば、ヒト腎臓由来の293T細胞、BHK細胞が挙げられる。

【0076】

G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いる場合には、ABVゲノムのG遺伝子を恒常的に発現する細胞を使用することが好ましい。このような細胞は、例えば、293T細胞、BHK細胞等の細胞に、所望の外殻遺伝子を発現する各種プラスミドを用いて、該外殻遺伝子を導入することにより作製することができる。外殻遺伝子を発現するプラスミドは、通常、各種発現プラスミドに添付の説明書に記載された方法に従って、該プラスミド内に該外殻遺伝子を導入することにより製造される。このような外殻遺伝子を発現するプラスミドとして、上述したABVゲノムのG遺伝子を発現するヘルパープラスミドも好適に用いることができる。また、G遺伝子及びM遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いる場合には、BDVゲノムのM遺伝子及びABVゲノムのG遺伝子を恒常的に発現する細胞を使用することが好ましい。このような細胞は、例えば、293T細胞、BHK細胞等の細胞に同様の方法で前記遺伝子を導入することにより製造される。

10

【0077】

次いで、ウイルスベクターを導入した細胞を培養して組換えウイルスを産生させる。組換えウイルスを産生させるための培地、培養温度及び培養時間等の培養条件は、細胞の種類により適宜設定すればよい。培養温度は、293T細胞又はBHK細胞を用いる場合は、通常約36～37とする。培地は、ダルベッコ変法イーグル培地を用いることが好ましい。培養時間は、通常約24～96時間、好ましくは約36～48時間とする。

20

【0078】

上記培養により、ウイルスベクターを導入した細胞においてウイルスベクターにコードされるRNA、並びにBDVゲノムのN蛋白質、P蛋白質、L蛋白質及びABVゲノムのG蛋白質を含む組換えウイルスが産生される。ウイルスベクターの導入において、さらにBDVゲノムのM遺伝子を発現するヘルパープラスミドを用いた場合には、ウイルスベクターにコードされるRNA、並びにBDVゲノムのN蛋白質、P蛋白質、L蛋白質及びABVゲノムのG蛋白質に加えて、BDVゲノムのM蛋白質を含む組換えウイルスが産生される。

30

【0079】

ウイルスベクターを導入した細胞において組換えウイルスが産生されたことは、例えば、細胞を培養した培地の上澄みを遠心分離などにより回収し、該上澄みを用いてBDVゲノムが感染性を有する細胞、例えば、サル腎由来Verocell細胞、ラットグリア由来C6細胞、ヒトグリア由来OL細胞などに感染をさせることで確認される。組換えウイルスが産生されたことの確認は、後述する組換えウイルスを産生した細胞を増殖速度が速い細胞と混合培養する工程を行なった後行ってもよい。

例えば、組換えウイルスであることは、感染した細胞内での外来性遺伝子（例えばGFPなど）の発現を定量解析することで確認できる。産生されたウイルスが持続性感染型であることは、感染した細胞内での外来性遺伝子（例えばGFPなど）の発現を定量解析すると共に、その培養上清中に次の世代の組換えウイルスの粒子が産生されることを調べることにより確認される。培養上清中に次の世代の組換えウイルスの粒子が産生されることは、例えば、その上清を遠心分離などにより回収し、これをさらに他の細胞へ感染させ、該細胞において組換えウイルスに由来する外来性遺伝子が発現することを調べることで確認できる。

40

【0080】

本発明の作製方法においては、上記のように細胞にウイルスベクター等を導入して組換えウイルスを産生させた後、効率よく組換えウイルスを増殖させるために、該組換えウイルスを産生した細胞（例えば、293T細胞、BHK細胞）を増殖速度が速い細胞と混合培養する工程を行なうことが好ましい。組換えウイルスを産生した細胞を増殖速度が速い細胞と混合培養することにより、感染性を持つ組換えウイルスは増殖速度が速い細胞に感

50

染する。該増殖速度が速い細胞を培養すると、細胞の増殖と共に感染したウイルスも増殖するため、組換えウイルスを効率よく増殖させることができる。増殖速度が速い細胞としては、例えば、V e r o細胞等が好適である。組換えウイルスを産生した細胞と、増殖速度の速い細胞との混合比率としては、例えば、組換えウイルスを産生した細胞1個に対して増殖速度の速い細胞を通常0.1~10個程度、好ましくは0.2~2個程度とする。混合培養後、増殖速度が速い細胞を培養させる条件としては特に限定されず、例えば、V e r o細胞を用いる場合には、培養温度を通常約36~37とし、ダルベッコ変法イーグル培地で通常3日~5週間程度、好ましくは3日~3週間程度培養を行なう。

【0081】

G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いた場合には、増殖速度が速い細胞として、ABVゲノムのG遺伝子を発現するヘルパープラスミドにより外殻遺伝子を恒常的に発現する細胞を使用することが好ましい。このような細胞は、例えば、V e r o細胞等の細胞に、外殻遺伝子を発現するプラスミドを用いて、該遺伝子を導入することにより作製することができる。さらに、G遺伝子及びM遺伝子欠損型BDVのウイルスベクターを用いた場合には、増殖速度が速い細胞として、ABVゲノムのG遺伝子とBDVゲノムのM遺伝子を恒常的に発現する細胞を使用することが好ましい。このような細胞は、例えば、V e r o細胞等に、前記遺伝子を発現するプラスミドを用いて該遺伝子を導入することにより作製することができる。前記遺伝子を発現するプラスミドは、通常、各種発現プラスミドに添付の説明書に従って、該プラスミド内に所望の遺伝子をそれぞれ導入することにより容易に製造される。このようなプラスミドとしては、上述したABVゲノムのG遺伝子を発現するヘルパープラスミド、BDVゲノムのM遺伝子を発現するヘルパープラスミド等も好適に用いることができる。

【0082】

本発明の作製方法においては、細胞に組換えウイルスを産生（及び増殖）させた後、該組換えウイルスを精製する工程を行うことが好ましい。精製方法としては特に限定されず、自体公知の方法によって行うことができ、組換えウイルスの感染対象に応じて精製方法を適宜選択すればよい。

【0083】

例えば、組換えウイルスを培養細胞に感染させる場合には、上記のように組換えウイルスを産生（及び増殖）させた後、該組換えウイルスを産生させた培養細胞上清を回収し、細胞を破碎する。細胞の破碎は、例えば、凍結及び融解、又は超音波破碎機を用いて行うことができる。次いで、細胞破碎液から細胞の破碎成分を取り除く。細胞破碎液から細胞の破碎成分を取り除く方法としては、遠心分離（例えば、4、800gで10分間程度）等が挙げられる。細胞の破碎成分を取り除いた後に、0.22 μ m又は0.45 μ mのポアサイズを有する濾過膜を通すことにより組換えウイルスを含む上澄みを得ることができる。培養細胞に組換えウイルスを感染させる際は、この上澄みを用いることができる。また、この組換えウイルスを含む上澄みを公知の手法により濃縮して用いることもできる。

生体細胞（動物個体中の細胞）に組換えウイルスを感染させる場合には、この組換えウイルスを含む上清を、超遠心機を用いて濃度勾配による超遠心を行なうことによりウイルス粒子へと高度の精製を行うことが好ましい。精製を行ったウイルス粒子を、例えばリン酸緩衝生理食塩水に浮遊させ、希釈を行った後に適量を動物へ感染させる。

【0084】

4. 外来性遺伝子の導入方法

上記組換えウイルスを細胞に感染させることにより、該ウイルスに組み込まれた外来性遺伝子を細胞や生体に導入することができる。このような、上記組換えウイルス、又は上記方法により作製された組換えウイルスをin vitroの細胞又は動物に感染させる工程を含む外来性遺伝子の導入方法も本発明の1つである。

【0085】

組換えウイルスを感染させる動物としては特に限定されず、例えば、哺乳類、鳥類、爬

10

20

30

40

50

虫類、両生類等が挙げられる。中でも、ヒト、サル、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラット、ネズミ、ウサギ、ウシ等の哺乳類が好ましく、ラット、マウス又はヒトがより好ましく、マウス又はヒトが更に好ましい。組換えウイルスを感染させる細胞としては、このような動物の細胞が好ましい。また、BDVは神経系細胞に感染指向性があることから、哺乳類の神経系細胞が好ましく、中でも、脳神経系細胞がより好ましい。中でも、ラット、マウス又はヒトの神経系細胞が好ましい。細胞は、培養細胞であってもよく、生体細胞であってもよい。哺乳類の脳神経系細胞としては、グリア細胞、大脳皮質の神経細胞、海馬神経細胞、小脳神経細胞、中脳神経細胞等が挙げられる。哺乳類の脳神経細胞の培養細胞としては、OL、C6、U373、N2a、N18、PC12、SK-N-SH細胞等が好適である。

10

【0086】

G遺伝子欠損型BDVのウイルスベクター及びABVゲノムのG遺伝子を発現するヘルパープラスミドとして他のウイルスの外殻遺伝子を発現するプラスミドを用いて産生された組換えウイルスは、該外殻遺伝子が由来するウイルスの種類に応じた感染指向性を示す。例えば、ヘルパープラスミドにおいてABV以外のウイルスの外殻遺伝子（好ましくは、ABV以外のウイルスの外殻蛋白質の細胞外配列及び細胞膜貫通配列をコードし、かつABVゲノムのG蛋白質の細胞内配列をコードする外殻遺伝子）を使用した場合、得られる組換えウイルスは、該ウイルスが感染指向性を示す細胞に好適に感染させることができるものである。

20

【0087】

組換えウイルスをin vitroで細胞に感染させる方法としては、例えば、培養細胞に感染させる場合には、上記精製方法により得られた組換えウイルスを含む上清をダルベッコ変法イーグル培地等の培養培地又はリン酸緩衝生理食塩水等により段階希釈して希釈液を調製することが好ましい。希釈液中の組換えウイルスの濃度としては、ウイルスを感染させる細胞の種類等により適宜選択すればよいが、例えば、哺乳類の神経細胞等であれば、通常MOI (multiplicity of infection、感染価) 約0.01~10 (細胞1個に対してウイルス粒子0.01から10個が感染する量)、好ましくはMOI約1~10となるようにする。この希釈液を用いて、組換えウイルスを細胞に感染させる。

【0088】

組換えウイルスを生体細胞（動物）に感染させる際には、上記のように高度に精製されたウイルス粒子を、例えばリン酸緩衝生理食塩水に浮遊させ、該リン酸緩衝生理食塩水により希釈を行った後に適量を動物へ感染させることが好ましい。希釈液中の組換えウイルスの濃度は、感染対象により適宜選択すればよい。例えば、感染対象が哺乳類の神経細胞であれば、組換えウイルスを含む希釈液のウイルス力価 (focus-forming unit (FFU)) を約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^9$ FFUとして個体に接種することが好ましい。また、組換えウイルスを含む希釈液は、マウス又はラットに接種する際には、ウイルス力価を通常約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^7$ FFUとすることが好ましい。イヌ又はネコ、ヒトに接種する際には、ウイルス力価を通常約 $10 \sim 1 \times 10^8$ FFUとすることが好ましく、ウシ又はウマに接種する際には、ウイルス力価を通常 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ FFUとすることが好ましい。ヒトに接種する際には、ウイルス力価を通常約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ FFUとすることが好ましい。また、組換えウイルスを生体細胞に感染させる際には、後述する外来性遺伝子導入剤も好適に用いることができる。

30

40

【0089】

例えば、哺乳類の脳神経系細胞に組換えウイルスを感染させる場合には、上記組換えウイルスを含む希釈液を哺乳類の鼻腔に接種する方法が好適である。また、マウスやラット等の動物実験において脳神経系細胞に感染させる場合には、動物の脳内に組換えウイルスを含む希釈液を直接接種することもできる。

組換えウイルスの接種量としては、上記濃度の組換えウイルスを含む希釈液を、鼻腔内接種では1回につき通常約5 μ L ~ 1 mL、脳内接種では1回につき通常約1 ~ 50 μ L接種する。組換えウイルスの動物への接種量は、動物の体重等に応じて適宜選択すればよ

50

く、例えば、上記濃度の組換えウイルスを含む希釈液をマウス又はラットに鼻腔内接種する場合には、1回につき通常約5～200 μ L、好ましくは約10～100 μ L接種する。

【0090】

脳神経細胞以外の生体細胞に組換えウイルスを感染させる場合には、上記組換えウイルスを含む希釈液を非経口投与することが好ましい。例えば、哺乳類の腹腔内、血管内、筋肉内等に接種する方法等が好適である。

組換えウイルスの接種量としては、接種部位等により適宜選択すればよく、特に限定されない。例えば、通常、組換えウイルスを含む希釈液のウイルス力価を約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^9$ FFUとして、この組換えウイルスを含む希釈液を、マウスであれば1回につき通常約5～500 μ L、好ましくは約20～200 μ L接種する。

10

【0091】

5. 外来性遺伝子導入剤

(1) 上記ウイルスベクター、(3) 上記組換えウイルス又は上記方法により作製された組換えウイルスを含有する外来性遺伝子導入剤も、本発明の1つである。好ましい態様としては、上記組換えウイルス、又は上記方法により作製された組換えウイルスを含有する外来性遺伝子導入剤である。このような外来性遺伝子導入剤は、上述した外来性遺伝子の導入方法において、組換えウイルスを*in vitro*の細胞又は生体細胞(動物)に感染させる際に好適に用いることができるものである。本発明は、動物の神経系細胞等に外来性遺伝子を導入するのに好適に用いることができる。中でも、脳神経系細胞に外来性遺伝子を導入するのにより好適に用いられる。

20

【0092】

本発明の外来性遺伝子導入剤の好ましい態様の1つは、上記組換えウイルス、又は上記方法により作製された組換えウイルスを含有する脳神経系細胞への外来性遺伝子導入剤である。脳神経系細胞としては、哺乳類の脳神経系細胞が好ましく、例えば、グリア細胞、大脳皮質の神経細胞、海馬神経細胞、小脳神経細胞、中脳神経細胞等が挙げられる。本発明の外来性遺伝子導入剤は、さらに、神経疾患治療剤等の他の薬剤等を含んでいてもよく、剤型に応じて医薬上許容される成分を含んでいてもよい。本発明の外来性遺伝子導入剤の剤型としては、非経口投与のための剤型が好ましく、例えば、注射剤、点滴剤、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、貼付剤、噴霧剤、スプレー剤等が挙げられるが、注射剤が好ましい。

30

【0093】

非経口投与のための注射剤としては、水性注射剤又は油性注射剤のいずれでもよい。水性注射剤とする場合、公知の方法に従って、例えば、水性溶媒(注射用水、精製水等)に、医薬上許容される添加剤を適宜添加した溶液に、組換えウイルスを混合した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。医薬上許容される添加剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等の等張化剤；リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等の緩衝剤；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等の保存剤；ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等の増粘剤；亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシルエン等の安定化剤；塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等のpH調整剤等が挙げられる。また注射剤には、適当な溶解補助剤、例えば、エタノール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のポリアルコール；ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50、リソレシチン、ブルロニックポリオール等の非イオン界面活性剤

40

50

等をさらに配合してもよい。また、例えば、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の蛋白質；アミノデキストラン等のポリサッカライド等を含いてもよい。油性注射剤とする場合、油性溶媒としては、例えば、ゴマ油又は大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル又はベンジルアルコール等を配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル又はバイアル等に充填される。注射剤等の液状製剤は、凍結保存又は凍結乾燥等により水分を除去して保存することもできる。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

【0094】

本発明の外來性遺伝子導入剤に含まれる組換えウイルスの量は、外來性遺伝子導入剤の製剤形態又は投与経路によって異なるが、通常、最終製剤中に約0.0001～100w/v%の範囲から適宜選択して決定することができる。外來性遺伝子導入剤の投与方法及び投与量は、上述した外來性遺伝子の導入方法における方法及び組換えウイルスの投与量と同様である。本発明の外來性遺伝子導入剤は、例えば、動物の脳神経系疾患治療、C型肝炎等の慢性肝疾患、抗腫瘍薬及びワクチン等のための遺伝子デリバリー用組成物として有用である。本発明の外來性遺伝子導入剤の投与対象は、上述した哺乳動物が好適である。

10

【0095】

6. ウイルスベクターの利用

本発明のウイルスベクター、組換えウイルス及び外來性遺伝子の導入方法、並びに外來性遺伝子導入剤は、宿主染色体に影響を及ぼさない遺伝子導入技術として種々の分野に応用することができるものである。

20

例えば、本発明のウイルスベクター及び組換えウイルスは、ヒトを含む動物の脳神経系疾患治療のための遺伝子デリバリーベクターとして使用することができる。また、慢性肝疾患、腫瘍、感染症等に対するワクチン等にも好適に使用することができる。

脳神経系疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、統合失調症、自閉症、その他の機能性精神疾患等が挙げられる。本発明の組換えウイルスは、このような疾患の治療又は予防に有用である。例えば、本発明のウイルスベクターにおける外來性遺伝子として、脳神経系疾患の原因となる蛋白質を分解する酵素の遺伝子、該蛋白質の発現を抑制する機能を有する核酸配列等を使用すると、該ウイルスベクターから産生される組換えウイルスを脳神経細胞に感染させることにより、該原因蛋白質を分解又は該原因蛋白質の発現を抑制して該疾患を予防又は治療することができる。また、脳内物質（例えば、セロトニン、ドーパミン、ソマトスタチン、ネプリライシン等）の分泌低下により発症する疾患においては、該脳内物質をコードする遺伝子をウイルスベクターに挿入し、該ウイルスベクターから産生される組換えウイルスを脳神経細胞に感染させることにより、該脳内物質が産生されるため、該疾患を予防又は治療することができる。

30

なお、「治療」とは、病態を完全に治癒させることその他、完全に治癒しなくても症状の進展及び/又は悪化を抑制し、病態の進行をとどめること、又は病態の一部若しくは全部を改善して治癒の方向へ導くことを、「予防」とは病態の発症を防ぐこと、抑制すること又は遅延させることを、それぞれ意味するものとする。

【0096】

本発明のウイルスベクター及び組換えウイルスは、日本脳炎等のウイルス性脳炎の治療又は予防にも使用できる。また、実験動物、伴侶動物又は生産動物の脳神経系疾患、例えば、BSE（牛海綿状脳症）、狂犬病等にも好適に使用できる。実験動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ等が挙げられる。伴侶動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ等が挙げられる。生産動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ等が挙げられる。

40

【0097】

本発明のウイルスベクター及び組換えウイルスは、脳神経科学領域における神経系細胞の可視化技術に使用することができる。さらに、本発明のウイルスベクターは、機能性RNA分子を発現できるRNAウイルスベクターとしても有用であり、siRNA、miR

50

NA、RNAアプタマー等の機能性RNAの安定発現ベクター技術に応用することもできる。例えば、本発明のウイルスベクターにおける外来性遺伝子としてsiRNA、miRNA、RNAアプタマー等の機能性RNAをコードする配列を用いると、所望の細胞においてこれらの機能性RNA分子を発現させることができる。本発明のウイルスベクター及び組換えウイルスを用いると、脳内において一本鎖抗体(scFv)を発現させることもできる。

【0098】

また外殻蛋白質を他のウイルス由来のものにすることで、腫瘍細胞に特異的に感染するウイルスベクター又は組換えウイルスに改良し、腫瘍細胞に薬剤遺伝子や過剰に発現した遺伝子を抑えるsiRNAを導入すること等で、抗腫瘍ウイルスベクターとしても利用可能である。さらに、外来性遺伝子としてHIV、インフルエンザウイルス等に対する中和活性をもつ遺伝子(例えば、HIVのenv、gag等；インフルエンザウイルスのHA、NA遺伝子等)等を導入することで、本発明のウイルスベクター又は組換えウイルスを組換えワクチンに利用することも可能である。そして、HCV等の慢性経過をたどる感染症に対しては、標的となるウイルスのゲノムに対するsiRNAを導入することで、機能性RNAを利用した感染症に対する新たな治療法の開発にも有効である。

10

【0099】

また、本発明のウイルスベクター及び組換えウイルスを、様々な細胞由来の幹細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞、そして癌幹細胞に感染させることにより、前記した疾患の治療に利用可能な安全な細胞集団を取得することができる。

20

【0100】

上記ウイルスベクターを含有する外来性遺伝子導入用キットも、本発明の1つである。

本発明のキットは、ウイルスベクター以外に、ヘルパープラスミド、外来性遺伝子を導入する細胞、緩衝液、培地等を適宜含んでもよい。ウイルスベクターの好ましい態様は、上述した通りである。外来性遺伝子を導入する細胞は、脳神経系細胞等の神経系細胞等が好ましい。本発明のキットは、これまで技術的に困難であった脳神経系細胞等への外来性遺伝子の導入に好適に用いることができるものである。

【実施例】

【0101】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、これらの実施例は本発明の一例であり、本発明はこれらに限定されるものではない。

30

【0102】

<実施例1>

1. プラスミドpCAG-Fctの作製

Yanai et al., *Microbes and Infection* 8 (2006), 1522-1529に記載されているプラスミドpCAG-HR-SV3を基に、その中に挿入されているクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子の領域をボルナ病ウイルスのHe/80株のゲノムの配列(配列番号1)に置き換えたプラスミドを以下のようにして作製した。

【0103】

サイトメガウイルス(CMV)由来のBDVミニゲノムベクター(pCMV-HR)を得るために、ハンマーヘッドリボザイム(HamRz)をコードする化学合成オリゴヌクレオチド(Briese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 11486-11489、及びLe Mercier et al., *J. Virol.*, 76 (2002) 2024-2027)及びBDVの5'非翻訳領域(UTR)配列をコードする化学合成オリゴヌクレオチド(Cubitt, B., Oldstone, C. and de la Torre, J.C., *Sequence and genome organization of Borna disease virus. J. Virol.* 68 (3), 1382-1396 (1994))をアニールし、ベクターpcDNA3 (Invitrogen社、San Diego, CA)のKpnI及びXhoIサイトに連結した。得られたプラスミドをEco47III及びXbaIサイトで切断した。このプラスミドに、型肝炎ウイルスリボザイム(HdRz)と融合させたBDVの3'UTRと、BDV He/80株のゲノムをコードするcDNAクローンを挿入してプラスミドpc-HRを得た。なお、HdRzと融合させたBDV

40

50

の3' UTRは、プラスミド p h u P o l I - M G (Perez et al., J. Gen. Virol. 84 (2003) 3099-3104) から増幅した。最後に、p c - H RのBglIII及びXbaI断片をpBluescript SKII(-) (Stratagene, La Jolla, CA) のBamHI及びXbaIサイトに挿入することによって、p C M V - H Rを作製した。

【0104】

C A G (Chicken -actin promoterとCMV enhancerとの複合体) 由来のB D Vゲノムベクターp C A G - H Rは、C A GプロモーターをpBluescript SKII(-) (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングすることによって得た(p B S - C A G)。C A Gプロモーターは、サイトメガロウイルスI Eエンハンサーにニワトリ - アクチンプロモーターが融合してなるハイブリッドプロモーターであり、Sawichi et al., Exp. Cell Res. 244 (1998) 367-369に記載されている。p C M V - H RのH a m R zとH d R zの配列にまたがる領域をP C Rによって増幅し、p B S - C A GのSalI及びEcoRIサイトの平滑末端に挿入した。

【0105】

次に、S V 4 0開始点/プロモーター内の5'側の113塩基からなる断片(S V 3領域)を、P C R (Clontech Laboratory, Inc., Palo Alto, CA) によってp E G F P - N 1 (Clontech社製) から増幅し、p C A G - H RのN o t Iサイトに挿入した。これにより、プラスミドp C A G - F c tを得た。

【0106】

2. P遺伝子とM遺伝子との間の非翻訳領域にG F Pを挿入したB D Vゲノムプラスミド(p C A G - F c t - P / M - G F P)の作製

P遺伝子とM遺伝子の間の非翻訳領域に外来遺伝子挿入カセットを挿入し、プラスミドp C A G - F c t - P / Mを作製した。

A) 上記1で作製したp C A G - F c t (ボルナウイルスのHe 80株のc D N A (配列番号1) がクローニングされているプラスミド) を鋳型に、E c o T 2 2 IからB s t 1 1 0 7 Iサイトまでの領域をプライマー1及び4、並びにプライマー2及び3を用いてそれぞれP C Rで増幅した。その後、両方のP C R産物を0.5 μLずつ混合し、プライマー1及び2にて再度増幅し、P - M遺伝子間にB s t B Iサイト及びP a c Iサイトを有する外来遺伝子挿入カセットを作製した。

B) A) のP C R産物をE c o T 2 2 I及びB s t 1 1 0 7 Iを用いてp C A G - F c tへと組み込み、p C A G - F c t - P / Mを完成させた。

C) B s t B IとP a c Iを用いてG F Pを挿入し、プラスミドp C A G - F c t - P / M - G F Pを完成させた。

(プライマー)

プライマー1: 5-GGAATGCATTGACCCAACCGGTAGACCAGC-3 (配列番号5)

プライマー2: 5-AACATGTATTTCTAATCGGGTCCTGTATACGG-3 (配列番号6)

プライマー3: 5-ttcgaaGGTTGGttaattaacataaaaaaatcgaatcacc-3 (配列番号7)

プライマー4: 5-ttaattaaCCAACcttcgaaGGTGATTTCGATTTTTTTATGG-3 (配列番号8)

【0107】

3. G遺伝子を欠損させたB D Vゲノムプラスミド(p / m G F P G L L)の作製

上記で作製したp C A G - F c t - P / M - G F Pを元に、ウイルス膜糖蛋白質であるG遺伝子をP C Rを用いた点変異導入により欠損させた。具体的な方法として、G遺伝子に存在する2つのメチオニンをコードする配列(ゲノム番号(すなわち配列番号1の塩基) 2236-2238、及び2248-2250)をスレオニン(ATG ACG)へと置換した。図6に、G遺伝子欠損型B D Vウイルスをコードするプラスミドであるp / m G F P Gの作製手順の概略を示す。先ずp / m G F Pを鋳型に表1に示す配列のプライマーA1及びB1、並びにプライマーC1及びD1を用いてP C R (98 10秒、55 5秒、72 0.5又は1分を25サイクル)を行った(図6(a))。

【0108】

次に双方の増幅産物(1 s t P C R産物)を鋳型に、上記のプライマーA1及びD1を用

いて再びPCR (98 10秒、55 5秒、72 1.5分を25サイクル)を行った(図6 (b))。増幅産物(2nd PCR産物)はG遺伝子のメチオニンがスレオニンへと変異しており、これを制限酵素Bst1107I及びNheIを用いて、ベクターであるp/mGFPと組換えて(図6 (c))、p/mGFP Gを得た。

【0109】

さらに、不要になったL遺伝子イントロン領域(本来この部分はG遺伝子の領域)を削りL遺伝子を直結した(L linearize)。具体的な方法として、制限酵素サイトBst1107I(配列番号1の2166~2171番目の塩基配列)からL遺伝子のエクソン前半部までとL遺伝子のエクソン後半部(NheIサイト(配列番号1の6158~6163番目の塩基配列)まで)をそれぞれ増幅し両者を結合させてp/mGFP Gに組込んだ。この手順の概略を、図7に示す。まず、表1に示すプライマーA1及びE1、並びに及びプライマーF1及びD1を用いてp/mGFP Gを鋳型にPCR(98 10秒、55 5秒、72 0.5分を25サイクル)を行った(図7 (a))。次に双方の増幅産物(1st PCR産物)を鋳型にプライマーA1及びD1を用いてPCR(98 10秒、55 5秒、72 1分を25サイクル)を行った(図7 (b))。増幅産物(2nd PCR産物)は、L遺伝子のイントロン部分が削除されており、これを制限酵素Bst1107I及びNheIを用いて、ベクターであるp/mGFP Gと組換えて、p/mGFP G LLを得た(図7 (c))。

【0110】

【表1】

プライマー番号	配列
A1	CCGTATACAAGGACCCGATTAGGAAATACATGTT (配列番号10)
B1	AAGAGAAGACGTTGAAAGCTGCGTTAATTGCG (配列番号11)
C1	CGCAATTAACGCAGCTTTCAACGTCTTCTCTT (配列番号12)
D1	GGGTCTGCAAGAGTGCTAGCTGAAAGGGC (配列番号13)
E1	GCGAAGGAGGCTCGCATGAAATGACATTTTCCG (配列番号14)
F1	TCATTTTCATGCGAGCCTCCTTCGCGAGGAGGAGAC (配列番号15)

【0111】

4. AVBのG遺伝子を挿入させたBDVゲノムプラスミド(p/m PaBV4G G F P G LL)の作製

上記で作製したp/mGFP G LLを元に、P遺伝子とGFP遺伝子の間に、S3とT2の配列と、外来遺伝子挿入カセットとしてSse8387IとAscl、AsiSI、SwaIサイトを挿入したp/m tandem GFP G LLを作製した。

S3 : 5-TAAAAAATCGAATCA-3 (配列番号16)

T2 : 5-TAAAAAA-3 (配列番号17)

【0112】

次にp/m tandem GFP G LLの挿入カセットに、PaBV-4のG遺伝子のcDNAを挿入したp/m PaBV4G GFP G LLを作製した。PaBV-4のG遺伝子のcDNAを鋳型にプライマー5及び6を用いてPCR(98度 10秒、55度 5秒、72度 10秒、30サイクル)をおこなった。PCR産物をAscl及びAsiSIを用いてp/m tandem GFP G LLと組換えて、p/m PaBV4G GFP G LLを得た(図3 (a))。

プライマー5 : 5'-AAAGGCGCGCCATGCTGCATTCAACGTATTCTCGTT-3' (配列番号18)

プライマー6 : 5'-AAAGCATCGCTTATTCCGACCACCTTCCGAG-3' (配列番号19)

【0113】

5. ヘルパープラスミドの作製

ヘルパープラスミド、すなわちBDVゲノムのN遺伝子発現プラスミド(p c N)、B

D VゲノムのP遺伝子発現プラスミド (p C X N 2 - P) 及び B D VゲノムのL遺伝子発現プラスミド (p c L) を以下の手順で作製した。

p c Nは、p H A - p 4 0 N プラスミド (Kobayashi T, Watanabe M, Kamitani W, Zhang G, Tomonaga K and Ikuta K. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J. Virol.* 75:3404-3412. (2001)) から N 遺伝子領域を P C R で増幅し、p B S - C A G (上述) へと挿入することで作製した。

p C X N 2 - P は、p c D - P (Zhang G, Kobayashi T, Kamitani W, Komoto S, Yamashita M, Baba S, Yanai H, Ikuta K and Tomonaga K. Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *J. Virol.* 77:12243-12251. (2003)) からゲル抽出した断片を p C X N 2 (Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J 1991 Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199) の EcoRI 及び XhoI サイトに挿入することによって作製した。

p c L については、Perez et al., *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 3099-3104 に記載されている方法で作製した。組換えプラスミドのヌクレオチド配列は、D N A シーケンスによって確認した。

【 0 1 1 4 】

6 . 組換えウイルスの作製

p / m P a B V 4 G G F P G L L 及びヘルパープラスミド (N 遺伝子発現プラスミド、P 遺伝子発現プラスミド及び L 遺伝子発現プラスミド ; それぞれ p c N、p C X N 2 - P 及び p c L) を、FuGENE 6 transfection reagent (Roche Molecular Diagnostics (登録商標)、Pleasanton, CA) 又 Lipofectamine (登録商標) 2000 (Invitrogen 社) を用いて 2 9 3 T 細胞に導入した。導入に使用したウイルスベクター等の量としては、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ の細胞 (2 9 3 T 細胞) に対して、p / m P a B V 4 G G F P G L L を $1 \sim 4 \mu\text{g}$ 使用し、p c N ($0.125 \sim 0.5 \mu\text{g}$)、p C X N 2 - P ($0.0125 \sim 0.05 \mu\text{g}$)、p c L ($0.125 \sim 0.5 \mu\text{g}$) の割合でヘルパープラスミドを加えた。

【 0 1 1 5 】

ウイルスベクター及びヘルパープラスミドを Lipofectamine (商標登録) 2000 (Invitrogen 社) を用いて 2 9 3 T 細胞へ導入した。遺伝子導入後、3 7 で培養し、遺伝子導入 3 日後に細胞を継代し、その際に Vero 細胞と共培養を行った後、該 Vero 細胞を PaBV-4G 発現キメラウイルス感染 Vero 細胞として回収した。

【 0 1 1 6 】

培養細胞への感染後、4 8 時間以降における細胞間での感染の広がり、並びに感染細胞上清中へのウイルスベクターの放出を、間接免疫蛍光抗体法又はウェスタンブロット法又は上清中のウイルス力価を Vero 細胞へ継代することにより調べたところ、感染後 2 4 時間後よりウイルスの産生が観察され始めることが確認された。

【 0 1 1 7 】

< 実施例 2 >

シュードタイプウイルスの回収

上記で作製した p / m G F P G L L 及びヘルパープラスミド (N 遺伝子発現プラスミド、P 遺伝子発現プラスミド及び L 遺伝子発現プラスミド ; それぞれ p c N、p C X N 2 - P 及び p c L) を用いて、実施例 1 を参照にして G 遺伝子欠損組換え B D V 細胞を取得した。得られた細胞を 10cm シャーレに播種し (3.0×10^6 cells)、 $10 \mu\text{g}$ の G 蛋白質発現プラスミドを TransIT (登録商標) -293 (TaKaRa) を用いて導入した。G 蛋白質発現プラスミドには、Variegated squirrel bornavirus (VSBV)、Parrot bornavirus 4 (PaBV-4)、Parrot bornavirus 5 (PaBV-5)、Munia bornavirus 1 (MuBV-1) の G 蛋白質を用いた。プラスミドを導入した細胞を、3 7 でウシ胎児血清 (F C S) を 10% 含むダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) で培養した。4 8 時間後に細胞を D M E M で 2 回洗浄し

10

20

30

40

50

た後、1.2 mLのDMEMを加え、シャーレを-80 に一時間静置した。-80 と室温での凍結融解を2度おこない、シャーレ中の培養液を回収した。回収した培養液を3,000 rpm、4 で5分間遠心し、上清をシュードタイプウイルス溶液として用いた。

【0118】

上記の方法で回収したシュードタイプウイルスをVero細胞へ接種した。接種後4日で該Vero細胞を蛍光顕微鏡で観察した像が図8左図である。この時のGFP陽性数(相対値)をグラフにしたのが図8右図である。

【産業上の利用可能性】

【0119】

本発明のウイルスベクターから産生される組換えウイルスは、細胞核で非細胞障害的にかつ効率的に外来性遺伝子を発現できるものであり、また、ウイルスゲノムがRNAであることから宿主染色体に挿入されることがなく安全なベクターである。さらに、本発明のウイルスベクターはボルナ病ウイルスを利用するものであるが、ボルナ病ウイルスは神経細胞に感染指向性があることから外来性遺伝子を脳神経系に選択的に導入することができる特異性に優れたベクターである。このため、本発明は、宿主染色体に影響を及ぼさない遺伝子導入技術として種々の分野、例えば、脳神経系疾患治療及び予防、脳神経化学領域における神経系細胞の可視化技術等に使用することができるため有用である。さらに、siRNA、miRNA、RNAアプタマー等の機能性RNAの安定発現ベクター技術に応用することもできる。従って、本発明は、医療、動物医療、治験、研究等の分野において有用である。

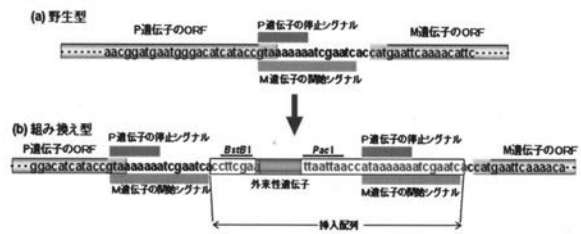
10

20

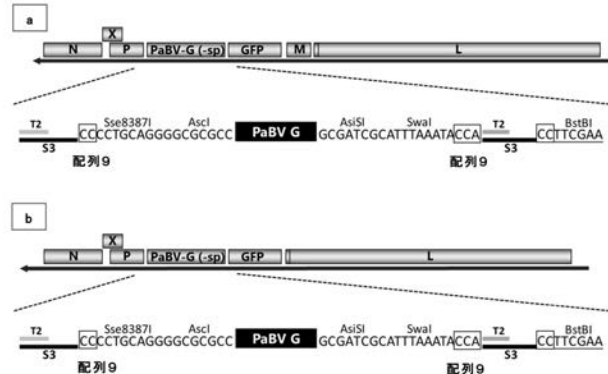
【図1】



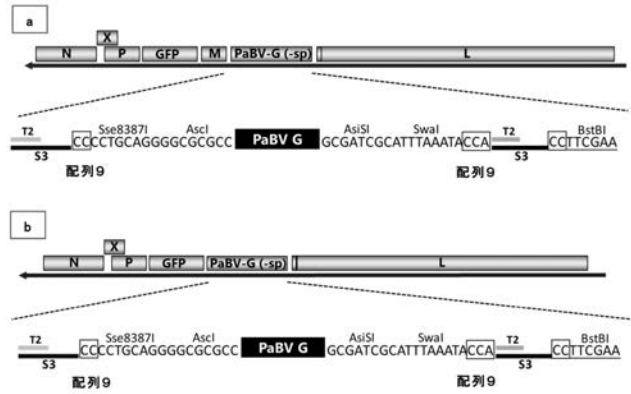
【図2】



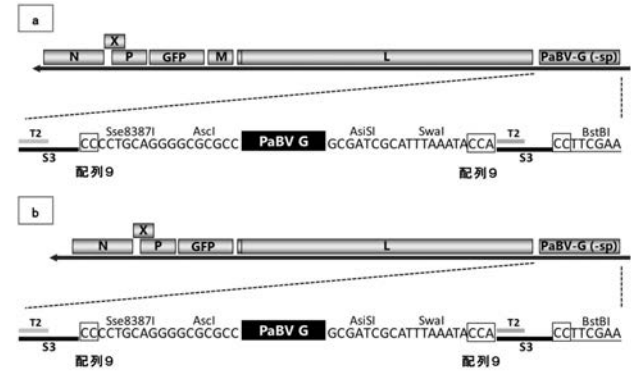
【図3】



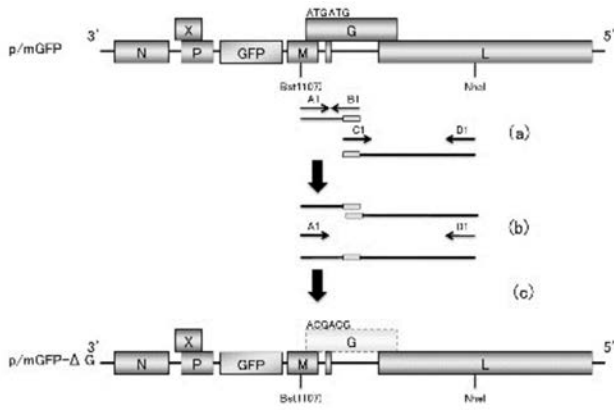
【図4】



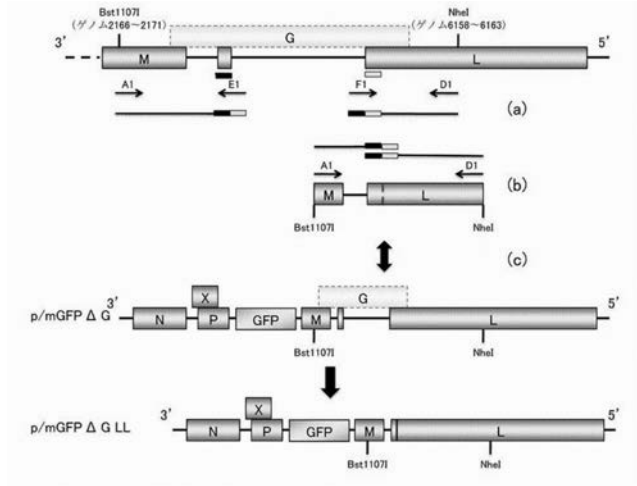
【図5】



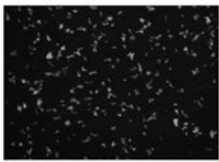
【 図 6 】



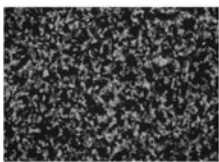
【 図 7 】



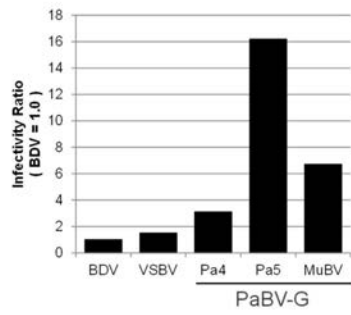
【 図 8 】



BDV-G



PaBV-G



【配列表】

2018148865000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA13 MA17 MA28 MA32 MA56 MA63
MA66 NA13 NA14 ZA02