

201432020A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

高性能の新規RNAベクターによる血友病遺伝子治療の開発
に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 須磨崎 亮

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人筑波大学が実施した平成26年度「高性能の新規RNAベクターによる血友病遺伝子治療の開発」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書
目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
高性能の新規RNAベクターによる血友病遺伝子治療の開発 -----	1
須磨崎 亮	
(資料1, 2)	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. プロジェクトの総合推進 -----	38
須磨崎 亮 他	
2. 遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発（生体イメージング） -----	41
三輪 佳宏	
(資料)	
3. 遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発（血友病マウスに対する治療） -----	45
福島 敬 他	
(資料1, 2)	
4. 遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発（ヒト脂肪細胞の培養実験） -----	50
長谷川 雄一 他	
(資料1 - 6)	
5. 研究進捗検討会の実施 -----	71
柳 健一 他	
6. 新規RNAベクターに関わる研究開発およびGMP生産の検討 -----	73
中西 真人	
7. 血液凝固因子抗原性および活性評価系の開発およびベクターの性能評価 -----	79
伊藤 昌史 他	
(資料1 - 3)	
8. 遺伝子導入脂肪細胞を開発対象としたGMP生産・非臨床試験計画 （予備的毒性試験）の構築に向けた規制対応研究の計画の共同立案 -----	83
麻生 雅是	
III. 学会等発表実績 -----	85
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	87

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（総括）

高性能の新規 RNA ベクターによる血友病遺伝子治療の開発

業務主任者 須磨崎 亮（筑波大学医療系）

研究要旨

血友病の新規治療開発研究の世界的動向、および各種バイオ医薬品開発実用化の状況を踏まえると、血友病に対する遺伝子治療技術の国産開発は非常に意義のあるテーマであると考えられる。脂肪細胞を用いたデリバリーシステムは、血液凝固因子においても利用可能である。平成 27 年 4 月に日本医療研究開発機構の発足する予定であることを追い風として、筑波大学、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社のそれぞれが保有する特許技術の合体によって、効率的に実用化研究を実施することが可能である。

○プロジェクトの総合推進

須磨崎亮（筑波大学医学医療系教授）

千葉滋（筑波大学医学医療系教授）

○遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（生体イメージング）

三輪佳宏（筑波大学医学医療系講師）

○遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（血友病マウスに対する治療）

福島敬（筑波大学医学医療系准教授）

久武幸司（筑波大学医学医療系教授）

西村健（筑波大学医学医療系助教）

○遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（ヒト脂肪細胞の培養実験）

長谷川雄一（筑波大学医学医療系准教授）

橋本幸一（筑波大学医学医療系教授）

柳健一（筑波大学医学医療系教授）

○研究進捗検討会の実施

福島 敬（筑波大学医学医療系教授）

○新規 RNA ベクターに関わる研究開発およ

び GMP 生産の検討

中西 真人（産業技術総合研究所幹細胞
工学研究センター副センター長）

○血液凝固因子抗原性および活性評価系の
開発およびベクターの性能評価

伊藤昌史（エーザイ株式会社ネクストジ
ェネレーションシステムズ機能ユニット細
胞研究グループ統括課長）

○遺伝子導入脂肪細胞を開発対象とした G
MP 生産・非臨床試験計画（予備的毒性試験）
の構築に向けた規制対応研究の計画の共同
立案

麻生雅是（セルジェンテック株式会社代
表取締役社長）

A. 研究目的

血友病 A に対する根治療法を実現し、患
者の QOL 向上のために、遺伝子治療臨床応用

を目指し、過去には成功例のない天然型(完全型)第Ⅷ血液凝固因子遺伝子を搭載可能な新規国産RNAベクター(研究分担者の中西らが特許取得、資料1)を利用して、自家脂肪細胞に目的遺伝子を導入して欠損蛋白を分泌させる技術(研究分担者の麻生、伊藤らが特許を保有、資料2)と合体させた治療技術を開発する。同時に、血友病B(第Ⅸ血液凝固因子欠乏症)について、比較検討する。従来の遺伝子治療技術では実現されなかった大きいサイズの蛋白分子欠損症に対する応用可否について検討する。このうち、筑波大学ではプロジェクトの総合的推進、体外実験、動物を用いた遺伝子導入脂肪細胞の性能評価を担当し、産業技術総合研究所では、新規RNAベクターの開発とGMP製造の検討、目的遺伝子cDNAの選択とベクターへの搭載を担当する。エーザイ株式会社筑波研究所は、第Ⅷ凝固因子等の定量システムの開発の検討、およびベクターの性能評価、セルジェンテック株式会社は、遺伝子改変脂肪細胞のGMP生産・非臨床試験計画の構築に向けた規制対応研究の計画の共同立案(既に得たPMDA対面助言による)等を行う。

B. 研究方法

筑波大学、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社の四者間で、「ステルス型RNAベクターを用いた遺伝子導入脂肪細胞の移植治療に関する前臨床研究」について平成26年3月24日付で共同研究計画を締結して役割分担に沿って作業を進めて来たものである。

平成26年12月3日から平成27年3月31日の期間内において、本課題「高性能の

新規RNAベクターによる血友病遺伝子治療の開発」の委託契約書に基づいて実施した。

特に、この委託業務成果報告書(総括)においては、本遺伝子治療技術の対象疾患を選ぶ際に検討した社会的背景を検証した。次に脂肪細胞の臨床応用の現状と、本遺伝子治療に利用する妥当性について検討した。上記を踏まえて、本実用化研究を四者共同研究として継続発展させるため、本共同研究体制によるメリットを確認した。

(倫理的側面)

ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等を踏まえて研究計画を立案した。研究計画について、筑波大学臨床研究倫理審査承認、筑波大学遺伝子組み換え実験計画承認を得て実施した。

C. 研究成果

【新規血友病治療法の必要性】

血友病は最も頻度の高い遺伝性の血液凝固異常症であり、乳幼児期に発症することが多く、生涯にわたって症状と付き合い、注射によって凝固因子を補充するという痛みの伴う治療の継続が必要となる。血友病患者では、出血症状の反復や関節症による歩行障害、凝固因子補充のための自己注射や保護者による注射が必要であり、日常生活上の負担増大・QOL低下が問題となっていた。近年では重症者に対する凝固因子定期補充療法が一般的となり、出血症状の反復は回避できるようになってきているが、

自己注射や保護者による注射の負担は依然として存在し、患者負担を軽減する根治療法の開発が望まれている。同時に、大災害等によって流通が遮断された際にも影響を受けないという観点からも、根治療法の開発は非常に有用である。

本邦の重症血友病患者数は血友病 A が約 2,800 人、血友病 B が約 500 人である。血友病の主な治療である凝固因子製剤の定期補充療法は、血友病 A では主に週 3 回、血友病 B では主に週 2 回の自己注射を行う必要がある。これを薬価で換算すると、血友病 A で 1,050 万円/人・年、294 億円/総数・年、8 億円/人・75 年、血友病 B で 2,000 万円/人・年、100 億円/総数・年、15 億円/人・75 年と極めて高額であり、これらはすべて公的負担により支払われている。

【血友病根治療法実用化の動向】

現在、世界中で血友病 A・血友病 B の根治療法の開発・実用化研究が推進され、血友病 B では遺伝子治療臨床成功例が報告され、根治療法の普及に期待がもたれている。一方、血友病 A では、欠損している第 VIII 血液凝固因子の分子量が大きいことが制約条件となり、遺伝子治療を含め、根治療法が存在しない。

米国のバクスターインターナショナル社はチャタム・セラピューティクス社と同社の遺伝子治療技術を活用した血友病 B の治療法の実用化と製品化について、独占契約を締結したことを 2012 年に発表している。また、ドイツのバイエルヘルスケア社とディメンションセラピューティクス社は、血友病 A に対する新規遺伝子治療の実用化と商業化のための契約を締結したことを 2014

年に発表しており、大手製薬会社も血友病遺伝子治療開発に乗り出している。

本研究では日本製の高性能 RNA ベクターを用いて自家脂肪細胞に第 VIII 血液凝固因子遺伝子を導入し、その脂肪細胞を移植することにより血友病 A の根治療法を世界で初めて開発することを目指している。本研究が成功し根治療法が開発されたならば、患者の QOL が飛躍的に改善し、一方で医療経済的にも大きな貢献が可能である。

【本事業による波及効果】

バイオ医薬品は、遺伝子組み換え技術や細胞融合などのバイオテクノロジーを活用して製造される医薬品であり、ターゲットが明確な分子標的薬で創薬の成功率が高く、バイオ医薬品が医薬品開発の主流である。2012 年の世界販売額上位 10 医薬品のうち、7 つがバイオ医薬品である。実用化されているバイオ医薬品の中心は体外で合成した組換えタンパク質であるが、注射によって継続的に体内に薬品を注入する必要があり、いずれも極めて高額な医薬品であり、しかも日本はそのほとんどを輸入に頼っている。医療経済のみならず国際収支にも及ぶ課題を解決するためには、次世代バイオ医薬品システムの開発が必要である。

本研究では次世代バイオ医薬システム、すなわち体内で持続的に組換えタンパク質を作らせる方法を開発し、患者ニード・医療経済的ニードに応え、技術的困難度の高い重症型血友病 A の根治療法の実現を目標としている。更に、本研究が成功すれば、他の難治性疾患のオーダーメイドバイオ医薬品創出の開発プラットフォームとなり、患者体内で産生させる遺伝子治療法として、

①機能分子の欠乏する希少難治性疾患、②抗体医薬の対象となる自己免疫性疾患・がん、③インターフェロンによるウイルス肝炎治療などへの広範囲の応用が可能である。

【脂肪細胞・間葉系幹細胞の臨床応用】

骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などへの分化能をもつ間葉系幹細胞は、脂肪組織、歯根組織または骨髄組織中に存在し、細胞治療・再生医療への応用が検討されている。間葉系幹細胞は免疫抑制作用を有することも判明し、治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞療法剤としても注目されている。脂肪組織は、エネルギー貯蔵庫としての役割のみならず、さまざまな生理活性物質を産生・放出する内分泌器官であることや、多能性幹細胞（脂肪由来間葉系幹細胞）が存在することが報告されている。脂肪組織 1 グラムから約 5×10^3 個の脂肪由来間葉系幹細胞が採取できるとされ、同量の骨髄組織よりも 500 倍も多く、皮下脂肪組織の採取が比較的容易であることは、自己の細胞を使った治療を考える上で大きな利点である。

脂肪細胞移植あるいは間葉系幹細胞移植は、現在、様々な分野で臨床応用のための研究が進んでいる。心血管領域では間葉系幹細胞を用いた心筋梗塞治療や下肢虚血治療の前臨床試験が進行中である。脂肪組織由来間葉系幹細胞を併用した脂肪細胞移植の臨床的有効性が徐々に確認され、形成外科領域での顔面脂肪萎縮、美容目的の豊胸術や乳房切除後の乳房再建にも応用されている。整形外科領域では、治療抵抗性の関節リウマチ患者に免疫抑制効果を期待して脂肪組織由来間葉系幹細胞を全身投与する

という臨床試験も欧米で行われている。

本邦では Ogata らが 2004 年にレンチウイルスベクターを用いて培養ヒト脂肪細胞に B ドメイン欠損ヒト血液凝固第 VIII 因子遺伝子を導入し、培養上清中に巨大分子である血液凝固第 VIII 因子が分泌されることを報告 (Gene Therapy (2004):11; pp. 253-259) しており、デリバリーシステムとして脂肪細胞を利用した遺伝子発現系による血友病治療の実現可能性が示唆されている。

【四者共同研究のメリット】

当院では、Mo1Med 社（イタリア）との協力による「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対する HSV-TK 遺伝子導入ドナーリンパ球輸注の臨床研究」を実施し、セルジェンテック株式会社およびエーザイ株式会社との共同研究として、「LCAT（レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症に対する LCAT 遺伝子導入脂肪細胞自家移植療法の前臨床研究」の実績・経験を有することを利点として、本遺伝子治療の開発／実用化研究を、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社との共同研究契約の下で、迅速に進めることが可能である。

本研究で共同研究を行うエーザイ株式会社はレトロウイルスベクターと脂肪細胞天井培養技術を用いた遺伝子治療用培養脂肪細胞に関する特許を取得しており、その技術を用いて培養マウス脂肪細胞に胎盤型アルカリホスファターゼ (PLAP) 遺伝子を導入し、それをヌードマウスに皮下移植することにより、マウス体内で PLAP の発現が 300 日以上維持されていることが既に確認されている。

D. 考察

本研究では、【脂肪細胞・間葉系幹細胞の臨床応用】の項で述べた遺伝子発現脂肪細胞を用いた治療技術に加え、業務項目 II-2、II-6 において述べる、それぞれの特許技術を合体させて、血友病に対する根治的な遺伝子治療の効率的な実用化研究を実施することが可能であると考えられた。

E. 結論

1. 血友病の新規治療開発研究の世界的動向、および各種バイオ医薬品開発実用化の状況を踏まえると、血友病に対する遺伝子治療技術の国産開発は、時宜を得たものであり、非常に意義のあるテーマであると考えられる。
2. 脂肪細胞を用いたデリバリーシステムは、血液凝固因子においても利用可能である。
3. 四者間の共同研究によって、効率的に実用化を目指すことが可能である。

F. 健康危険情報 該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各委託業務成果報告書（業務項目）を参照。

2. 学会発表

各委託業務成果報告書（業務項目）を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

各委託業務成果報告書（業務項目）を参照。

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

TOP > 技術 > 改良された持続感染型センダイウ...

カテゴリー：日本 - 生活必需品 ([世界での技術分布を見る](#))

改良された持続感染型センダイウイルスベクター

[この技術が特許化される前の公開公報はこちら](#)

特許権者	独立行政法人産業技術総合研究所		
発明者	西村 健、 蒲川 宏知、 中西 真人		
出願日	2008年04月11日 (5年6ヶ月経過)	出願番号	2009-510838
公開日	2010年07月22日 (3年3ヶ月経過)	公開番号	WO2008-129971
登録日	2012年03月02日 (1年7ヶ月経過)	登録番号	4936482
特許期限	2028年04月11日 (残14年5ヶ月)		
技術分野	突然変異または遺伝子工学、 微生物による化合物の製造、 微生物、その培養処理、 蛋白質酵素含有; その他の医薬、 他の有機化合物及び無機化合物含有医薬、 動物、微生物物質含有医薬、 化合物または医薬の治療活性		

[その他の情報を見る](#)

技術分野 (分野番号表示 ON) ※整理標準化データをもとに当社作成

突然変異または遺伝子工学

利用分野 医薬 (治療、予防)

又クレオチド断片の種類 DNA 構造遺伝子 cDNA

その他

ベクターの種類 動物ウイルス

[技術分野の全体図を見る](#)

概要 ※この項目は機械的に抽出しているため、正しく解析できていない場合があります

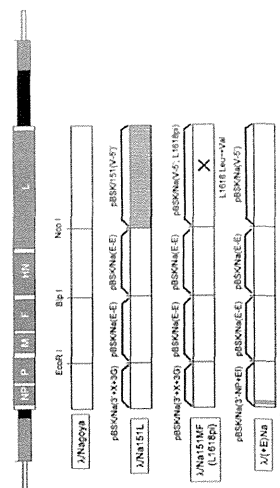
背景

遺伝性代謝疾患等の遺伝子治療においては、導入した外来遺伝子の発現が長期間持続することが望まれている。これまでは、レトロウイルスベクターを用いて宿主の染色体に遺伝情報を組み込むことによってこの目標を達成してきたが、組み込んだ遺伝子の影響で細胞がガン化した臨床例が報告され、安全性が問題視されている。このため、染色体とは独立にかつ安定に存在できる遺伝情報発現系の開発が提唱されているが、未だに実現していない。センダイウイルスはパラミクソウイルス科に属するマイナス本鎖RNAウイルスで、ヒトに対する病原性がない点、転写や複製は細胞質内で行われ宿主の遺伝情報に影響を与えない点、および遺伝子発現活性が高くして種特異性が低い点等の特徴を持っているため、遺伝子治療用のベクターの素材として注目されている。

現在のところ、フクシニアウイルスベクター、もしくはプラスミドベクターを用いてT7 RNA polymeraseを強制発現した培養細胞に、T7 RNA polymeraseによってセンダイウイルスの全長ゲノムRNAの相補鎖が発現する発現ベクターと、センダイウイルスの転写複製に関与するNP、P、Lの各遺伝子の発現ベクターをトランスフェクションすることによって組換え体センダイウイルスを作製する方法が確立されている。この方法を用いて、外来遺伝子を挿入したセンダイウイルス作製用ベクターから組換え体センダイウイルスが作製されており、またその応用として、センダイウイルスのF、M、HNの各遺伝子を欠損させた組換え体センダイウイルスも作製されている。また、目的のタンパク質をこれらの組換え体センダイウイルスに発現させることによって、タンパク質生産系としての応用も検討されている。

これらのセンダイウイルス作製用ベクターから作製された組換え体センダイウイルスを用いて、染色体とは独立に存在できる遺伝情報発現系として、遺伝子治療への応用が多くの研究グループによって試行されている。しかし、これらのセンダイウイルスベクターは細胞障害性のある2株をベースにしたものであり、その細胞障害性を抑制させるために該ウイルスの遺伝子を欠損させたものであり、一代で死滅するため、安全性は向上しているものの遺伝子発現の持続する期間は限られている。

一方、センダイウイルスには種々の性質を有する株が知られており、この中で、温度感受性株として、38℃で殆どウイルス粒子を産生せず、32℃では複製サイクルが働きウイルス粒子を産生する、温度感受性変異株Cl.151株が、現・広島大学の吉田哲也教授らによって1979年に報告されている。



総括報告書(須磨崎)資料1

本発明者らは上記 センダイウイルス 温度感受性変異体Cl.151株が38℃で殆ど ウイルス粒子を産生せず 持続感染を起こす点に着目し、長期間持続する 遺伝子発現を実現する センダイウイルスベクターを構築するために、上記Cl.151株とその 親株である名古屋株の全長ゲノムcDNAを クローニングした。上記の2株の全長遺伝子(+)鎖cDNAを各 制限酵素で切り出した断片を種々組み合わせて、ウイルスを再構成し、各組み合わせにおいて温度感受性を示すか、及び 持続感染能を有するか否かを調べた結果、Cl.151株のM遺伝子とF遺伝子に存在する、Mタンパク質の69、116及び183番目の アミノ酸残基が、それぞれ、グルタミン酸(E)、アラニン(A)及びセリン(S)に、また、Fタンパク質の6、115及び137番目 アミノ酸残基が、それぞれアルギニン(R)、ロイシン(L)及びスレオニン(T)になる 変異のうちの複数の変異が 持続感染能に必要であるということを明らかにした。

さらに、この全長ゲノムcDNAに 外来 遺伝子発現カセットを挿入し、そこから得られる、組換え体 センダイウイルスによる 外来 遺伝子発現の持続性を検討した。その結果、培養細胞における発現は、Z株由来 センダイウイルスベクターを用いた場合、感染細胞が 死滅するために 短期間であるのに対し、Cl.151株由来 センダイウイルスベクターを用いた場合、4か月以上発現が持続した。また、ラットの大腿に感染させた場合、Z株由来 センダイウイルスベクターでは約2週間で発現が確認されなくなるのに対し、Cl.151株由来 センダイウイルスベクターを用いた場合、大 腿上皮細胞において2か月以上発現が持続した。以上の知見から、Cl.151株由来 センダイウイルスベクターは 生体内を含めて、持続的に導入遺伝子を発現させることができるベクターとして非常に有用であることは明らかになったが、持続感染機構については明らかになっておらず、また、ベクターの安全性を向上させるために、持続性を維持したまま、感染性粒子を放出しない非 伝播性のベクターに改良することが望まれている。

WO97/16359 WO00/70070 特開2002-272465号公報 特開2006-32531号公報 特開2006-18780号公報 T. Yoshida et al. (1979) Virology 92,139-154.

概要

目的

そこで、本発明の課題は、細胞障害性がなく、長期間持続する遺伝子発現を実現でき、さらに安全性を高めるために非伝播性に改良した、遺伝子治療用ベクター等の用途において極めて有用な新規ウイルスベクターを提供することにある。

効果

本発明によれば、外来遺伝子を持続的に発現し、さらに、非伝播性の組換えセンダイウイルスベクターを提供できる。これにより、従来の遺伝子治療用ベクターでは不可能であった、染色体とは独立に存在可能で、かつ安全性の高い遺伝情報発現系を実現することが可能となり、遺伝子治療用薬剤を導入するためのベクターとして有用である。また、本発明の組換えウイルスベクターの作成に用いた手法は、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子やベクター遺伝子の遺伝子配列を変えることによって、様々なウイルスベクターに応用可能である。さらに、本発明に記載の持続感染関連変異(Lタンパク質の1618番目のアミノ酸の変異)は、他の持続感染能を持たない組換えベクター、ウイルスに導入置換すれば、細胞障害性を減弱させ、発現持続性を付与することができると考えられることから、有用な遺伝子材料になりうる。

目次

要約・請求項
詳細

※ 以下の情報は、登録日時点(2012年03月02日)のものであります。

要約・請求項

課題・解決手段

請求項1

非持続 感染型 センダイウイルスの遺伝子が、Lタンパク質の1618番目の アミノ酸残基がバリンに置換されたタンパク質をコードするように変換されており、M、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上を欠損させたことを特徴とする、センダイ ウイルス遺伝子。

請求項2

さらに、非持続 感染型センダイ ウイルス遺伝子が、少なくとも以下のアミノ酸変異を有するタンパク質をコードするように変換されていることを特徴とする、請求項1に記載のセンダイ ウイルス遺伝子。1) 69E、2) 116A、3) 183S、4) 6R、5) 115L、6) 137T (但し、上記1)～3)中の数字は、センダイウイルスMタンパク質のアミノ酸配列における位置番号を、4)～6)中の数字は、同Fタンパク質のアミノ酸配列における位置番号をそれぞれ表し、1)～6)中、アルファベットは該位置における変異したアミノ酸残基を表す。)

請求項3

M、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上の欠損が、これら各遺伝子に対する マーカー遺伝子の挿入によるものである、請求項1に記載のセンダイ ウイルス遺伝子。

総括報告書(須磨崎)資料1

請求項4

さらに、センダイウイルスゲノムRNAの3'末端領域と、センダイウイルス上に存在している遺伝子のうちゲノムRNAの3'末端に最も近い遺伝子の転写開始配列との間に、転写 終結配列が挿入されていることを、特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載のセンダイウイルス遺伝子。

請求項5

(1) 非 持続感染性 センダイウイルスのLタンパク質の1618番目のアミノ酸残基がバリンに置換されたタンパク質をコードするように変換された変異L遺伝子と、NP及びP遺伝子とからなるウイルス由来の遺伝子、並びに(2) 2つの制限酵素認識部位に挟まれている3つ以上の外来性の領域からなることを特徴とする、センダイウイルス遺伝子。

請求項6

(1) 非 持続感染性 センダイウイルスのLタンパク質の1618番目のアミノ酸残基がバリンに置換されたタンパク質をコードするように変換された変異L遺伝子と、NP及びP遺伝子とからなるウイルス由来の遺伝子、(2) 2つの制限酵素認識部位を有している3つ以上の外来性の領域、並びに(3) センダイウイルスゲノムRNAの3'末端領域と、センダイウイルス上に存在している遺伝子のうちゲノムRNAの3'末端に最も近い遺伝子の転写開始配列との間に、転写 終結配列が挿入されているセンダイウイルスのリーダーRNA配列からなることを特徴とする、センダイウイルス遺伝子。

請求項7

プラス鎖cDNAからなることを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載のセンダイウイルス遺伝子。

請求項8

請求項1～6のいずれかに記載のセンダイウイルス遺伝子cDNAからなることを特徴とする、非伝播性持続感染型ウイルス作成用遺伝子材料。

請求項9

ベクターに、請求項8に記載の組換えウイルス作成用遺伝子材料が導入されていることを特徴とする、非伝播性持続感染型組換えウイルス作成用ベクター。

請求項10

外来遺伝子DNAが導入されていることを特徴とする、請求項9に記載の非伝播性持続感染型組換えウイルス作成用ベクター。

請求項11

M、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上が欠損している請求項10に記載の非伝播性持続感染型ウイルスベクターであって、外来遺伝子がM、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上に挿入されていることを特徴とする、請求項10に記載の非伝播性持続感染型組換えウイルス作成用ベクター。

請求項12

外来遺伝子が、生理活性ペプチドあるいはタンパク質をコードするものである、請求項10または11に記載の組換えウイルス作成用ベクター。

請求項13

請求項10～12のいずれかに記載の組換えウイルス作成用ベクターが導入されていることを特徴とする細胞。

請求項14

請求項10～12のいずれかに記載の組換えウイルス作成用ベクターを複数導入した細胞であって、該ベクターはそれぞれ異なる外来遺伝子を担持し、複数の外来遺伝子が同時に発現していることを特徴とする細胞。

請求項15

請求項10～12のいずれかに記載の組換えウイルス作成用ベクターと、ウイルス粒子形成のために不足する遺伝子を有する他の組換えベクターとが導入されていることを特徴とする細胞。

請求項16

ウイルス粒子形成のために不足する遺伝子がF遺伝子であって、該F遺伝子が、Fタンパク質の112～116番目のアミノ酸配列において、アルギニン-アルギニン-X-リジン又はアルギニン-アルギニンで表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に変換されていることを特徴とする、請求項15に記載の細胞(但し上記アミノ酸配列中Xは、任意のアミノ酸残基を表す)。

請求項17

ヒト型コドンに変換したT7RNAポリメラーゼ遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項13～16のいずれかに記載の細胞

請求項18

請求項13に記載の細胞内で再構成された センダイウイルスRNP複合体。

請求項19

請求項13～16のいずれかに記載の細胞を培地に培養することを特徴とする、外来遺伝子産物の製造方法。

請求項20

請求項13～16のいずれかに記載の細胞を培地に培養することを特徴とする、外来遺伝子を保持したセンダイウイルスの粒子の製造方法。

請求項21

請求項13～16のいずれかに記載の細胞を培地に培養することにより得られた、外来遺伝子を保持したセンダイウイルス粒子。

請求項22

非持続感染型センダイウイルスの全長遺伝子のうち、L遺伝子がLタンパク質の1618番目のアミノ酸残基をバリンになるように置換したタンパク質をコードするように変換されており、M、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上を欠損させたことを特徴とする、ウイルス粒子。

請求項23

非持続感染型センダイウイルスの全長遺伝子のうち、L遺伝子が、Lタンパク質の1618番目のアミノ酸残基をバリンに置換したタンパク質をコードするように変換されるとともに、M、F及びHN遺伝子のいずれか2種以上が欠損している遺伝子をゲノムとして有するウイルス粒子であって、該ウイルス粒子形成において不足するM、F及びHNタンパク質のいずれか2種以上が、上記ゲノム以外の遺伝子発現系により補われていることを特徴とする、ウイルス粒子。

請求項24

非持続感染型センダイウイルスのLタンパク質の1618番目のアミノ酸残基をバリンに置換したタンパク質をコードするように変換された変異L遺伝子、並びにNP遺伝子及びP遺伝子をゲノムとして少なくとも有するとともに、M、F及びHN遺伝子のうちいずれか2種以上をゲノムとして有しないウイルス粒子であって、ウイルス粒子形成において不足する上記M、F、HNタンパク質のいずれか2種以上が、上記ゲノム以外の遺伝子発現系により補われていることを特徴とする、ウイルス粒子。

請求項25

ウイルス粒子形成において不足するタンパク質が少なくともFタンパク質であって、該Fタンパク質の112～116番目のアミノ酸配列がアルギニン-アルギニン-X-リジンまたはアルギニン-アルギニンで表される配列に変換されていることを特徴とする、請求項23または24に記載のウイルス粒子（但し上記アミノ酸配列中Xは、任意のアミノ酸残基を表す）。

請求項26

さらに、センダイウイルスゲノムRNAの3'末端領域と、センダイウイルス上に存在している遺伝子のうちゲノムRNAの3'末端に最も近い遺伝子の転写開始配列との前に、転写終結配列が挿入されていることを、特徴とする、請求項21～25のいずれかに記載のウイルス粒子。

請求項27

請求項21～26のいずれかに記載のウイルス粒子に外来遺伝子が導入されていることを特徴とする、組換えウイルス。

請求項28

請求項27に記載の組換えウイルスを有効成分として含有することを特徴とする、遺伝子治療薬剤。

詳細**この技術を保有する法人**

独立行政法人産業技術総合研究所



実績のある分野
ナノ構造物
突然変異または遺伝子工学
触媒
技術件数 13281 件
技術文献被引用数 8062 件

総括報告書(須磨崎)資料1

牽制数 10187 件
本社所在地 東京都

この技術を保有する人物

西村健



実績のある分野

電池の電極及び活物質
建築環境
珪素及び珪素化合物

技術件数 133 件
技術文献被引用数 2 件
牽制数 153 件

瀬川宏知



実績のある分野

突然変異または遺伝子工学
微生物、その培養処理
蛋白質質酵素含有：その他...

技術件数 3 件
技術文献被引用数 0 件
牽制数 2 件

中西真人



実績のある分野

突然変異または遺伝子工学
微生物、その培養処理
蛋白質質酵素含有：その他...

技術件数 12 件
技術文献被引用数 0 件
牽制数 4 件

キーワードから探す

工作機械 車体 動力機械 自動制御 一般機械 (伝動装置) 燃焼機関 (火力・ガス) 熱機器 (加熱・冷却) 金属加工 防衛機器 電機・精密・半導体
応用工学 (カメラ・写真) 計測機器 ナノ物理 映像システム インターフェイス 電子デバイス 電話通信 電気制御 伝送システム ネット・通信・メディア 情報処理
デジタル通信 電子商取引 FAX 情報記録 原子力発電 風力発電 水力発電 太陽電池・ソーラーシステム ナノテクノロジー 環境化学 燃料電池・二次電池 電気自動車
自然資源

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4879867号

(P4879867)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012. 2. 22)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011. 12. 9)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N	5/00 1 O 2
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027 (2006. 01)	A O 1 K	67/027
A 6 1 K 38/28 (2006. 01)	A 6 1 K	37/26
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K	48/00

請求項の数 16 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-299377 (P2007-299377)	(73) 特許権者	506137147
(22) 出願日	平成19年11月19日(2007. 11. 19)		エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
(62) 分割の表示	特願2004-513476 (P2004-513476)		ジメント株式会社
原出願日	平成15年6月18日(2003. 6. 18)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2008-131941 (P2008-131941A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成20年6月12日(2008. 6. 12)	(72) 発明者	伊藤 昌史
審査請求日	平成19年12月19日(2007. 12. 19)		千葉県千葉市中央区千葉寺町883-7
(31) 優先権主張番号	特願2002-177648 (P2002-177648)		エクセル千葉寺103
(32) 優先日	平成14年6月18日(2002. 6. 18)	(72) 発明者	齋藤 康
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		千葉県千葉市中央区葛城2-4-22
(31) 優先権主張番号	特願2002-237974 (P2002-237974)	審査官	山本 匡子
(32) 優先日	平成14年8月19日(2002. 8. 19)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子治療用初代培養脂肪細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子であって、レトロウイルスベクターにより導入された外来遺伝子を染色体中に安定に保持し、移植細胞数を調節することにより該蛋白質の発現量の調節が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定に発現する能力を有する、初代培養のエキスビオ遺伝子治療用前脂肪細胞。

【請求項2】

請求項1記載の遺伝子治療用前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させた、初代培養のエキスビオ遺伝子治療用脂肪細胞。

【請求項3】

細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子であって、レトロウイルスベクターにより導入された外来遺伝子を染色体中に安定に保持し、移植部位から切除することにより該蛋白質の発現の消去が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定に発現する能力を有する、初代培養のエキスビオ遺伝子治療用前脂肪細胞。

【請求項4】

請求項3記載の遺伝子治療用前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させた、初代培養のエキスビオ遺伝子治療用脂肪細胞。

【請求項5】

脂肪組織から分離培養した前脂肪細胞に、レトロウイルスベクターを用いて細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入した前脂肪細胞であって、移植細胞数を調節す

10

20

ることにより該蛋白質の発現量の調節が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用前脂肪細胞。

【請求項6】

請求項5記載の遺伝子治療用前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させた、遺伝子治療用脂肪細胞。

【請求項7】

脂肪組織から分離培養した前脂肪細胞に、レトロウイルスベクターを用いて細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入した前脂肪細胞であって、移植部位から切除することにより該蛋白質の発現の消去が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用前脂肪細胞。

10

【請求項8】

請求項7記載の遺伝子治療用前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させた、遺伝子治療用脂肪細胞。

【請求項9】

分泌する蛋白質が、インスリンまたはGLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) である、請求項1~8のいずれか一項に記載の遺伝子治療用前脂肪細胞または遺伝子治療用脂肪細胞。

【請求項10】

請求項1~9のいずれか一項に記載の遺伝子治療用前脂肪細胞または遺伝子治療用脂肪細胞、および薬学的に許容される担体を含む、遺伝子治療用の移植組成物。

【請求項11】

さらに細胞外基質成分を含む、請求項10に記載の移植用組成物。

20

【請求項12】

さらに血管新生因子を含む、請求項10に記載の移植用組成物。

【請求項13】

以下の工程を含んでなる、移植細胞数を調節することにより該蛋白質の発現量の調節が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用前脂肪細胞を製造する方法。

(1) 脂肪組織から前脂肪細胞を分離培養する工程、

(2) 前脂肪細胞に、レトロウイルスベクターを用いて、細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入する工程。

30

【請求項14】

請求項13記載の工程に加え、更に、前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる工程を含む、移植細胞数を調節することにより該蛋白質の発現量の調節が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用脂肪細胞を製造する方法。

【請求項15】

以下の工程を含んでなる、移植部位から切除することにより該蛋白質の発現の消去が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用前脂肪細胞を製造する方法。

(1) 脂肪組織から前脂肪細胞を分離培養する工程、

(2) 前脂肪細胞に、レトロウイルスベクターを用いて、細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入する工程。

40

【請求項16】

請求項15記載の工程に加え、更に、前脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる工程を含む、移植部位から切除することにより該蛋白質の発現の消去が可能であり、体内に移植後少なくとも2ヶ月以上に亘って該蛋白質を安定して発現する能力を有する遺伝子治療用脂肪細胞を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、外来遺伝子を導入した初代培養の遺伝子治療用脂肪細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

現在行われている遺伝子治療（豊岡ら、*Folia Pharmacol. Jpn.* 116:158-162, 2000（非特許文献1））は、(1)治療用遺伝子をコードするウイルスベクターまたはnaked plasmid等を直接患者に投与して遺伝子導入する方法（インビボ）、(2)患者から細胞を一旦取り出し、その細胞に遺伝子を導入して患者に戻す方法（エクスピボ）、の2種類に大別することができる。

【0003】

このうち、インビボの方法は、導入効率や発現の持続、標的細胞への選択的な遺伝子導入という点に大きな課題を残している。一方、エクスピボの方法はこれらの課題をクリアしうる可能性がある。エクスピボにおいては、採取と移植が比較的容易で患者への負担が少ないことから血液系の細胞（抹消血リンパ球、骨髄細胞）を使った例が大多数を占め（谷ら、*最新医学*, 56:258-267, 2001（非特許文献2））、また、血液系以外の細胞では肝臓細胞に遺伝子導入し戻す方法（Raper SE et al., *Cell Transplant* 2(5):381-400, 1993（非特許文献3））が行われているが、そのほとんどが導入細胞自体の機能回復・維持・増強に主眼が置かれている。

10

【非特許文献1】豊岡ら、*Folia Pharmacol. Jpn.* 116:158-162, 2000

【非特許文献2】谷ら、*最新医学*, 56:258-267, 2001

【非特許文献3】Raper SE et al., *Cell Transplant* 2(5):381-400, 1993

20

【発明の開示】

【0004】

エクスピボの遺伝子治療に適した細胞を探し出す過程で、本発明者らは、初代培養の脂肪細胞を用いることを考えた。脂肪細胞を用いる利点として、以下の点が挙げられる。

(1) 脂肪細胞から分泌される液性因子が複数報告され、脂肪細胞がホルモン産生・分泌臓器としての機能を有している（Bradley RD, et al., *Recent Prog Horm Res*, 2001; 56,329-358）。

(2) 皮下にも存在するために採取が容易であり、更に形成外科・美容整形分野等で摘出に関する技術が発達しつつある。また、容易に移植可能である皮下に移植した場合でも、本来そこに存在する細胞であるため異所にならない。

30

(3) 単離した初代培養脂肪細胞はインビトロでも活発に増殖するため、遺伝子導入などの操作に適している。

(4) 移植後に局所に生着すると予想されるため、移植後に移植細胞を取り出したい場合（すなわち、遺伝子発現を消去したい場合）でも対応可能である。

(5) 脂肪細胞自身が血管新生因子を産生する（Mick GJ, et al., *Endocrinology* 2002;143(3):948-53）ので、移植後の高い生着が期待できる。

(6) 成体において大きく重量を変動させる臓器であり、摘出／移植による人体への影響が少ない。

(7) 脂肪細胞は余分なもの・邪魔なものという認識が強く、採取の同意を得やすいと予想される。

40

【0005】

現在、同様の試みとしてケラチノサイトを用いた検討が行われている（*J Gene Med* 2001 Jan-Feb;3(1):21-31、*Histochem Cell Biol* 2001 Jan;115(1):73-82）が、初代培養を単離する過程で生体バリアである皮膚を除去することは、感染リスクの点などから問題がある。除去・移植に伴う患者の苦痛も強いと予想され、発現を消すための再摘出（上記4）なども容易ではない。また、2次元でしか移植できないケラチノサイト/皮膚は、移植量の増加を移植平面の面積増加でしか達成できず、立体的に移植可能な脂肪細胞がより有用であると考えられる。

【0006】

本発明者らは、初代培養した脂肪細胞に効率よく遺伝子を導入する方法を考案し、更に

50

導入した遺伝子が移植後も機能していることを確認して、脂肪細胞が遺伝子治療に有効に活用できることを見出した。しかも本発明の方法によれば、導入した外来遺伝子を体内で長期間安定して発現する脂肪細胞を得ることが可能である。移植した成熟脂肪細胞は1年以上にわたって外来遺伝子の発現を持続することができる。また、脂肪細胞を移植後に、外来遺伝子の発現が不要となれば、移植片を取り出すことで外来遺伝子の発現を停止させることも可能である。

【0007】

すなわち本発明は、細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する、初代培養の遺伝子治療用脂肪細胞、該細胞の製造方法、該細胞を含む移植組成物、および該細胞の利用等に関し、より具体的には

〔1〕細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する、初代培養の遺伝子治療用脂肪細胞、

〔2〕該遺伝子がレトロウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターにより該細胞に導入された、〔1〕に記載の脂肪細胞、

〔3〕体内で少なくとも20日以上にわたって該蛋白質を有意に発現する能力を有する、〔1〕に記載の脂肪細胞、

〔4〕該蛋白質を血中に放出させるために用いる、〔1〕に記載の脂肪細胞、

〔5〕該蛋白質がインスリンまたはGLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) である、〔1〕に記載の方法、

〔6〕以下の工程、

(i) 脂肪細胞を初代培養する工程、

(ii) 細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入し、安定に保持させる工程、

を含んでなる遺伝子治療用脂肪細胞を製造する方法、

〔7〕該外来遺伝子をレトロウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターにより導入する、〔6〕に記載の方法、

〔8〕〔6〕または〔7〕に記載の方法により製造された遺伝子治療用脂肪細胞、

〔9〕細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する初代培養の脂肪細胞、および薬学的に許容される担体を含む、遺伝子治療用の移植組成物、

〔10〕さらに細胞外基質成分を含む、〔9〕に記載の移植用組成物、

〔11〕さらに血管新生因子を含む、〔9〕に記載の移植用組成物、

〔12〕細胞外に分泌される所望の治療蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する初代培養の脂肪細胞を体内に投与する工程を含む、遺伝子治療方法、

〔13〕蛋白質を血中に放出させる方法であって、細胞外に分泌される蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する初代培養の脂肪細胞を体内に投与する工程を含む方法、

〔14〕該蛋白質を血中20日以上にわたって血中に放出させる方法である、〔13〕に記載の方法、

〔15〕血糖を低下させる方法であって、インスリンまたはGLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) をコードする遺伝子を安定に保持する初代培養の脂肪細胞を体内に投与する工程を含む方法、

〔16〕細胞外に分泌される蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する初代培養の脂肪細胞が体内に移植された動物、に関する。

【0008】

以下に本発明の実施の形態について説明する。

本発明は、まず、細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持する、初代培養の遺伝子治療用脂肪細胞を提供する。

【0009】

ここで外来遺伝子とは、初代培養脂肪細胞に外から導入された遺伝子を言い、初代培養脂肪細胞が産生していない蛋白質をコードする遺伝子などが含まれる。また初代培養の細胞とは、生体から取り出された組織から培養された細胞で、株化していない細胞を言う。

また脂肪細胞 (adipocytes) とは成熟脂肪細胞 (mature adipocytes) ならびに前脂肪細胞 (preadipocytes) などの脂肪に分化する能力を有する細胞をいう。すなわち、特に“成熟”脂肪細胞と断らない限り、脂肪細胞には前脂肪細胞も含まれる。成熟脂肪細胞は球形で脂肪を蓄えた細胞であり油滴を含んでいる。成熟脂肪細胞に蓄えられた脂肪はoil red O染色によって確認することができる。成熟脂肪細胞は、一般的にインスリンに応答してレプチン (leptin) を分泌する。前脂肪細胞は、本来、成熟脂肪細胞に分化する前の間質 (stromal) 細胞として存在する。前脂肪細胞は、脂肪組織 (adipose tissue) をコラゲナーゼ処理して単離することができるが、後述する天井培養法によって成熟脂肪細胞が分裂した結果生じる前脂肪細胞を単離することもできる (杉原ら、日本臨床1995、53; 115-120、Sugihara H, et al. J Lipid Res. 1987, 28;1038-1045、Zhang HH, et al. J Endocrinol. 2000, 164;119-128)。また、脂肪細胞特異的な表面抗原の存在は確認されてはいないが、CD36などは成熟脂肪細胞に強く発現が認められる (Abumrad NA, et al. J Biol Chem. 1993 Aug 25;268(24):17665-8.)。よってこのような分子をマーカーにしてより高い純度で脂肪細胞を回収することも考えられる。前脂肪細胞は、後述する分化誘導によって数日から数週間の間成熟脂肪細胞に分化することができる (Hauner H, et al., J. Clin. Invest. 84, 1663-1670, 1989; Marko, et al. Endocrinology 136, 4582-4588, 1994)。初代脂肪細胞は所望の組織から単離してもよく、例えば皮下脂肪組織、副睾丸周囲または腸間膜などの内臓脂肪組織から得ることができる。

10

【0010】

遺伝子治療用とは、外来遺伝子がコードする蛋白質を、その効果を期待して体内において発現させる用途に用いることを言う。また遺伝子治療用細胞とは、エクスピボ投与により外来遺伝子を体内に投与する用途に用いる、さらにエクスピボで投与された体内で該蛋白質を発現する能力を有する、該外来遺伝子を保持する細胞のことを言う。エクスピボ投与とは、脂肪組織または脂肪細胞を個体より取り出し、インビトロで遺伝子導入を行った後、同一または別の個体に移植することを言う。

20

【0011】

遺伝子治療用細胞は、より好ましくは、ある特定の蛋白質を産生する細胞を移入して疾患を治療するために用いる細胞を言う。好ましくは、ある特定の蛋白質による治療は、その物理的もしくは機能的な不足あるいは欠如により疾患が引き起こされる蛋白質による補充療法、ないしはある病態の発症・悪性化をきたす因子を中和しうる作用を有する蛋白質による中和療法が挙げられる。ある特定の蛋白質とは、血流中で活性を示す、もしくは血流中から対象組織に供給され、該組織の細胞表面で作用する蛋白質であり、一定の期間 (例えば数日から数週間、またはそれ以上にわたって) 持続的な供給を必要とするものが望ましい。すでに蛋白補充療法が施行されている、もしくは有効性が予測されている因子および疾患はすべて対象となり得る。

30

【0012】

以下に、代表的な対象を分類別に記載するが、用途はこれに限定されるものではなく、類似の目的により類似の因子を使用することは本発明の範疇に含まれる。

補充療法には、ホルモンまたはサイトカインの不足・機能低下により発症・増悪する疾患に対する補充、先天性の遺伝子欠損による疾患に対する補充、病態改善因子の補充、などが含まれる。

40

【0013】

インスリン/糖尿病、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)/糖尿病・肥満・摂食障害、GLP-2/炎症性腸疾患・癌化学療法などに伴う消化管障害、レプチン/肥満症・脂肪萎縮性糖尿病、アディポネクチン/糖尿病・血管障害、血液凝固第VIII・第IX因子/血友病、リポプロテインリパーゼ (LPL)/LPL欠損症・高トリグリセリド血症、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)/LCAT欠損症、エリスロポエチン/赤血球減少症、アポA-I/低HDL血症、アルブミン/低蛋白血症、心房性ナトリウムペプチド (ANP)/高血圧・心不全、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH)/乳がん・前立腺ガン、アンギオスタチン・エンドスタチン/血管新生・転移阻害、モルヒネ受容体作動ペプチド (内因性オピオイドペプチ

50

ド（エンケファリン等）やダイノルフィン（dynorphin）等）/疼痛緩和、カルシトニン・骨形成因子（BMP）/骨粗しょう症、インターフェロン- α ・ β /悪性腫瘍、インターフェロン- γ /悪性腫瘍・肝炎・アレルギー、インターフェロン- β 1/多発性硬化症、インターロイキン-1 α ・ β /悪性腫瘍、インターロイキン-4/乾癬、インターロイキン-10/自己免疫疾患、インターロイキン-12/悪性腫瘍、膵分泌性トリプシンインヒビター/膵炎、スーパーオキシドディスムターゼ/虚血性心疾患・血管障害、など

【0014】

病態形成因子もしくは悪性化因子の中和療法には、可溶性受容体や中和抗体の部分ペプチド、ドミナントネガティブ型蛋白の産生がこれに含まれる。

腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）可溶性受容体/慢性関節リュウマチ、可溶性IgE受容体/アレルギー、可溶性IgA受容体/食物アレルギー、可溶性細胞障害性Tリンパ球抗原-4（CTLA4）/自己免疫疾患、可溶性CD40リガンド/免疫疾患、ドミナントネガティブ型血液凝固第VIIa因子/血栓症、繊維芽細胞増殖因子（FGF）可溶性受容体/血管内膜肥厚、など

【0015】

また、本発明の脂肪細胞は、いわゆる「治療」に用いるものに限定されず、所望の分泌蛋白質を体内において発現させるために用いられる細胞が含まれる。例えば、本発明の方法により、ある特定の蛋白質を後天的に発現させてモデル動物とすることが可能である。該方法を用いれば、病態発症因子もしくは悪性化因子を後天性に発現する病体モデル動物の作製が可能であり、該動物を用いて薬物をスクリーニングすることも可能となる。また、病態改善因子を発現させれば、当該因子が病態を改善するという新薬探索の作業仮説の証明にも利用できる。動物としては、所望の非ヒト動物、好ましくは非ヒト哺乳動物（げっ歯類、霊長類などを含む）が用いられる。

【0016】

本発明の初代培養の遺伝子治療用脂肪細胞は、細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を安定に保持している。「安定に保持する」とは、細胞分裂に伴い、外来遺伝子が娘細胞に受け継がれることを言い、より具体的には外来遺伝子が細胞の染色体に組み込まれていることを言う。本発明の遺伝子治療用脂肪細胞は、好ましくは外来遺伝子が染色体組み込み型のウイルスベクターにより安定に導入されている。より好ましくは、外来遺伝子がレトロウイルスベクターにより導入されている。

【0017】

レトロウイルスベクターは、細胞の染色体に安定にインテグレートされ導入遺伝子を長期間にわたって発現する能力を有しているが、導入効率および導入遺伝子の発現の持続性は細胞種に依存している。例えば、レトロウイルスベクターにより導入した遺伝子は、細胞が増殖している間は発現が持続するが、細胞の増殖が止まると発現が停止することがある（Lund AH, et al., J Biomed Sci 1996; 3:365-378; Niwa, O. et al., 1983, Cell, 32:1105-1113）。外来遺伝子の発現の抑制は、特にインビボまたはエクスピボにより体内に遺伝子を導入した後にしばしば観察される。このような発現抑制には、導入遺伝子のプロモーターまたはコード配列のde novoのメチル化が関与しているといわれている（Jahne r D and Jaenisch R, Nature 315: 594-597, 1985; Challita P-M and Kohn DB, Proc Natl Acad Sci USA 91: 2567-2571, 1994; Hoeben RC et al., J Virol 65: 904-912, 1991）。また導入遺伝子のサイレンシングにはヒストンの脱アセチル化も関与している（Chen, W.Y. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 97: 377-382,2000; Chen, W.Y. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 94: 5798-5803, 1997）。しかしながら、本発明者らがレトロウイルスベクターを介して初代培養の脂肪細胞に外来遺伝子を導入したところ、驚くべきことに導入遺伝子の発現はインビトロおよびインビボの両方において、極めて安定に持続することが判明した。導入遺伝子の発現は、分化前の脂肪細胞でも、成熟脂肪細胞でも安定しており、インビトロ培養においては実験の全期間である80日以上にわたって、また体内に移植された場合は実験の全期間である360日以上にわたって発現が持続することが確認された。従って、外来遺伝子が安定に導入された初代培養の脂肪細胞は、長期間安定して該遺伝子を発現するインプラントとして利用できることが判明した。

【0018】

本発明の遺伝子治療用脂肪細胞は、インビトロで、さらに好ましくはインビボにおいて、少なくとも20日以上にわたって外来遺伝子がコードする蛋白質を有意に発現する能力を有する。有意に発現するとは、例えば外来遺伝子を導入しない場合に比べ、統計学上有意に（例えば有意水準5%またはそれより高い有意性をもって）発現が検出されることである。より好ましくは、本発明の脂肪細胞は、体内に移植された場合、体内において少なくとも30日以上、より好ましくは40日以上、より好ましくは50日以上、より好ましくは60日以上、より好ましくは80日以上、より好ましくは100日以上、より好ましくは150日以上、より好ましくは200日以上、より好ましくは250日以上、より好ましくは300日以上、より好ましくは350日以上にわたって、外来遺伝子がコードする蛋白質を有意に発現する能力を

10

【0019】

また本発明の遺伝子治療用脂肪細胞は、該細胞が保持する外来遺伝子がコードする蛋白質を、血中に放出させるための細胞として特に有用である。血中に放出させる蛋白質としては、血流中または対象組織の細胞表面で活性を示す所望の分泌蛋白質が含まれ、例えばホルモンおよびサイトカインなどの所望の液性因子および抗体などが例示できる。具体的には、上記のように糖尿病などの治療においてはインスリンおよび/またはグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-Like Peptide 1; GLP-1) 等の血糖降下ホルモン、血友病などの治療においては血液凝固因子、TNF- α が亢進する慢性関節リュウマチなどの治療においてはTNF- α 受容体の可溶化断片または抗TNF- α 抗体 (FabおよびscFv等の抗体可変領域を含む抗体断片を含む) 人工可溶化などが挙げられる。例えばインスリンであれば、効率よく成熟型インスリンを産生できるように開裂部位 (site1およびsite2) を脂肪細胞内で発現するプロテアーゼの開裂配列に置換することができる (例えばGroskreutz DJ, et al. JBC, 1994, 269(8), 6241)。また、単鎖型に改変したインスリンアナログを使用することもできる (Lee HC, et al., Nature. 2000 Nov 23; 408(6811): 483-8.)。GLP-1としては、GLP-1受容体 (NP_002053, Thorens, B. et al., Diabetes 42, 1678-1682 (1993); Dillon, J.S. et al., Endocrinology 133, 1907-1910 (1993); Graziano, M.P. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196, 141-146 (1993); Stoffel, M. et al., Diabetes 42, 1215-1218 (1993)) のリガントとして作用する所望のペプチドを用いることができるが、例えばGLP-1(7-37)などが挙げられる (Diabetes, 1998, 47:159-69; Endocrinology, 2001, 142: 521-7, Curr Pharm Des., 2001, 7:1399-412, Gastroenterology, 2002, 122:531-44)。

20

30

【0020】

また本発明は、以下の工程、
(1) 脂肪細胞を初代培養する工程、
(2) 細胞外に分泌する蛋白質をコードする外来遺伝子を導入、好ましくはレトロウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターにより導入し、安定に保持させる工程、を含んでなる遺伝子治療用脂肪細胞を作製する方法、および、この方法により作製された遺伝子治療用脂肪細胞、に関する。安定に保持させるとは、外来遺伝子が細胞分裂に伴って娘細胞に受け継がれるように遺伝子を導入することを言い、より具体的には外来遺伝子を細胞の染色体に組み込むことである。外来遺伝子が染色体に組み込まれ安定発現を獲得したことを分子生物学的に証明するためには、サザンブロット法やゲノムDNAを用いたPCR法などを行うことが出来る。また、安定導入細胞をより濃縮するためには、例えば細胞に目的遺伝子と共に発現させたGFPなどを認識させて濃縮するFluorescence Activated Cell Sorter (FACS) などの方法を用いることが出来る。

40

【0021】

1. 初代培養の脂肪細胞を採取する方法

初代培養の脂肪細胞は杉原らの報告 (Sugihara H. et al., Differentiation, 31:42-49, 1986) に記載の方法により採取できる。具体的には脂肪組織、好ましくは移植レシピエント自身の皮下脂肪組織、あるいは副睾丸周囲または腸間膜などの内臓脂肪組織より脂

50