

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/107888

発行日 平成29年3月23日 (2017.3.23)

(43) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 Z N A A	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B065
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4C084
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2015-557768 (P2015-557768)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2015/000138
 (22) 国際出願日 平成27年1月14日 (2015.1.14)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-4262 (P2014-4262)
 (32) 優先日 平成26年1月14日 (2014.1.14)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 (74) 代理人 100110973
 弁理士 長谷川 洋
 (74) 代理人 100120293
 弁理士 中谷 智子
 (72) 発明者 小戩 健一郎
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 国立大学法人鹿児島大学内
 (72) 発明者 三井 薫
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 国立大学法人鹿児島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法

(57) 【要約】

【課題】ヒトES/iPS細胞の腫瘍化原因細胞を確実に標識化するための最良のプロモーターを探索する方法を提供することを課題とする。また、本発明は、ヒトES/iPS細胞の腫瘍化原因細胞を効率よく殺傷・除去することが可能な遺伝子を見出すことを課題とする。更に、本発明は、ヒトES/iPS細胞を目的細胞へ分化させた後に残存する未分化細胞を効率的かつ網羅的に除去する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター、特に、未分化細胞特異的プロモーターをプロモーター領域として含む前記ウイルスベクター等。

【選択図】なし

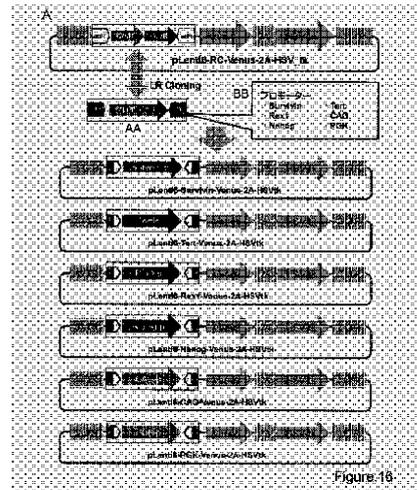


Figure 18
 AA Promoter
 BB Promoters

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター。

【請求項 2】

殺傷遺伝子が、自殺遺伝子である、請求項 1 に記載のウイルスベクター。

【請求項 3】

自殺遺伝子が、薬剤依存性自殺遺伝子である、請求項 2 に記載のウイルスベクター。

10

【請求項 4】

薬剤依存性自殺遺伝子が、HSV-tk、human-tmpk、シトシンデアミナーゼ請求項 CD 遺伝子、水痘ウイルスチミジンキナーゼ、又は Caspase である、請求項 3 に記載のウイルスベクター。

【請求項 5】

標識遺伝子が蛍光タンパク質である、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

【請求項 6】

蛍光タンパク質が、赤色又は緑色の蛍光蛋白質である、請求項 5 に記載のウイルスベクター。

20

【請求項 7】

蛍光タンパク質が、mKate2 又は緑色蛍光蛋白質である、請求項 5 に記載のウイルスベクター。

【請求項 8】

一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が、2A 配列又は IRES 配列である、請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

【請求項 9】

レンチウイルスベクターである、請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

30

【請求項 10】

プロモーター領域が未分化細胞特異的プロモーター領域である、請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

【請求項 11】

未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーター又は tert プロモーターである、請求項 10 に記載のウイルスベクター。

【請求項 12】

未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、請求項 10 に記載のウイルスベクター。

【請求項 13】

A) 請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターのプロモーター部分に被験プロモーターを組み替えて被験プロモーターを有するウイルスベクターを作製するステップ、

40

B) 被験プロモーターを有するウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

C) 分化誘導処理後の前記細胞における前記標識遺伝子の発現を検出するステップ、

D) 分化誘導処理後の前記細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップ、及び

E) 被験プロモーターが未分化細胞に特異的であるか否かを判定するステップを備える、未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法であって、

ここで、該判定が未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検

50

出される割合が高く、かつ、分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が低い場合、該被験プロモーターは未分化細胞に特異的であると判定することにより行われる方法。

【請求項 14】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

【請求項 15】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

【請求項 16】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

【請求項 17】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

【請求項 18】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、

C) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量請求項又は割合を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量請求項又は割合を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量請求項又は割合を示す方法。

【請求項 19】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、

B) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量請求項又は割合を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量請求項又は割合を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量請求項又は割合を示す方法。

【請求項 20】

A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、

10

20

30

40

50

C) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞数を決定する方法。

【請求項 2 1】

A) 請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞の数を決定する方法。

【請求項 2 2】

A) 請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存し又は発生したと判定するステップを備える、分化処理後に残存又は発生する未分化細胞のモニタリング方法。

【請求項 2 3】

A) 請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入され、分化誘導処理された細胞における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存又は発生していると判定するステップを備える、幹細胞の分化処理後の未分化細胞のモニタリング方法。

【請求項 2 4】

A) 請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、及び、

B) 前記細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターが導入された細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞標識剤。

【請求項 2 7】

請求項 1 0 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞殺傷剤。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された細胞。

【請求項 2 9】

幹細胞である請求項 2 8 に記載の細胞。

【請求項 3 0】

幹細胞が、ES細胞、iPS細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、又は生殖幹細胞である、請求項 2 9 に記載の細胞。

【請求項 3 1】

幹細胞を分化誘導処理することにより得られた細胞である、請求項 2 8 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【クロスリファレンス】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

本出願は、2014年1月14日に日本国において出願された特願2014-004262号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。また、本願において引用した全ての特許、特許出願及び文献に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞の標識及び除去に用いるためのプロモーターの探索方法に関する。また、本発明は、幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞の標識方法及び除去方法、並びに該方法に用いるためのウイルスベクターに関する。

10

【背景技術】

【0003】

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、（1）創薬開発において薬物の毒性試験等に用いるヒト細胞、（2）発生・病態を*in vitro*で解明するために用いる疾患モデル細胞、（3）再生医療の移植用細胞等の医療・医薬創出の基盤ツールとして期待されている。最も期待される再生医療については、米国において一部の疾患に対してヒトES細胞を用いたヒト患者での臨床試験が既に開始されている。また、日本では、眼疾患に対するヒトiPS細胞を用いた臨床研究が開始されている。

【0004】

ヒトES/iPS細胞の臨床応用における現在の最大の課題は、目的細胞へ分化させた後に残存する未分化細胞の混在である。分化誘導処理を行った細胞を移植した後、残存未分化細胞が奇形腫を形成することが報告されている（非特許文献1）。奇形腫は良性の腫瘍とはいえ、種々の副作用を生じる可能性が大きく、例えば、心臓に心筋細胞以外の細胞が移植された場合など、致死的不整脈などの重大な副作用を生じる可能性もある。

20

【0005】

更に、分化した細胞を初期化するという人工的な修飾を加えたiPS細胞においては、奇形腫のみならず悪性腫瘍の発生も高度であるという報告がある（非特許文献2）。その原因として、iPS細胞の樹立に必要な遺伝子の一つであり、癌原遺伝子としても知られる*c-Myc*が活性化することで細胞が癌化すること、並びに、iPS細胞の樹立においてレトロウイルスやレンチウイルスにより遺伝子が体細胞に導入されることにより、細胞の正常な機能を維持する上で重要な遺伝子（例えば、癌抑制遺伝子など）を破壊したり、細胞増殖に関連する遺伝子を異常に活性化させたりすることが考えられている。

30

【0006】

よって、分化処理後の細胞中に残存する未分化細胞を効率的かつ網羅的に除去することにより、純化された分化細胞を取得する方法が求められている。これまで、*c-Myc*を除いた3因子でiPS細胞を樹立する方法（非特許文献3及び4）や、ウイルスベクターの代わりにプラスミドを用いてiPS細胞を樹立することで染色体の損傷を抑制する方法（非特許文献5及び6）が報告されている。しかし、これらはいずれも細胞の「腫瘍化」を抑制する一定の効果は期待できるものの、未分化細胞の残存を防ぐものではなく、また、例えば、移植後に逆分化した未分化細胞を除去できないという問題があった。

40

【0007】

別のアプローチとして、分化させても腫瘍化しにくいクローンを選択して使用方法が報告されている（特許文献1）。しかし、この場合にも、未分化細胞の残存を防ぐものではなく、また、腫瘍化を完全に抑制できるものではなかった。

【0008】

また、残存未分化細胞を標的として殺傷する方法も検討されている。例えば、*Nano g*プロモーターの下流に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（*HSV-tk*）遺伝子を有するレンチウイルスベクターをマウスES/iPS細胞やヒトES/iPS細胞に導入し、これらの細胞をガンシクロビル（*GCV*）感受性とすることが試みられている。該細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた後、*GCV*を投与することで腫

50

瘍が縮小することが報告されている（非特許文献7及び8）。

【0009】

このようなHSV-tkとGCVの組み合わせによる自殺遺伝子治療法は、本発明のような再生医療における幹細胞の腫瘍化原因細胞の除去技術としては上記の一部の研究が発表された段階で、よって幹細胞の再生医療において臨床応用がなされた例は未だ全くない。その一方でHSV-tk/GCVは、癌への遺伝子治療への応用としては長年の研究の歴史があり、HSV-tk/GCV遺伝子治療（代表的なやり方は、HSV-tk遺伝子を導入・発現するウイルスベクターを患者の腫瘍内に直接注入した後に、GCVを患者さんに注射する）として癌患者へ臨床試験も既に数多く行われてきた実績がある。HSV-tkというヒト由来ではないウイルス由来の遺伝子を細胞に導入する場合は、異種蛋白に対する免疫の誘導が起こる可能性が示唆される。癌治療においては、HSV-tk遺伝子が導入された癌細胞が細胞性免疫を中心とする免疫誘導により除去されることは治療効果の増幅に繋がるため、ウイルス由来の遺伝子という点はむしろ利点とも考えられる。しかし再生医療においては、移植細胞にHSV-tk遺伝子を導入した場合、異種蛋白に対する免疫誘導により移植細胞が除去されていく可能性も考えられるため、この点ではヒト由来の遺伝子を用いる方がより望ましいと推察される。他の戦略として、細胞増殖サイクルの抑制に働くp53やp16遺伝子をドキシサイクリンにより誘導して利用する技術も報告されている（特許文献2）。しかし、このような技術は、そもそも腫瘍抑制遺伝子は腫瘍細胞を積極的あるいは直接的に殺傷するものではないため腫瘍化細胞を全て死滅させることは不可能であることより、生存したまま残存した未分化細胞がドキシサイクリン誘導解除後に増殖を開始する可能性や、またいわゆるドキシサイクリンの遺伝子発現誘導システムは特異性が低いため非特異的にこれらの遺伝子が発現して幹細胞の分化誘導や生物学的動態等に影響を及ぼしたりする可能性があるなど、効果・有用性の点では大きな問題があった。

10

20

【0010】

一方、未分化細胞を識別する方法として、SP1（Specificity Protein 1）、カハールボディに含まれているタンパク質、核ラミナに含まれているタンパク質、傍核小体コンパートメントに含まれているタンパク質、又はPMLボディに含まれているタンパク質の細胞核内の存在量等から識別する方法（特許文献3）や、hTERT遺伝子またはIPAS遺伝子のmRNAの発現の有無を調べることにより、細胞集団に含まれる形質転換細胞を検出する方法（特許文献4）、ポドカリキシン様タンパク質（PODXL）を表面上に発現する細胞を同定する方法（特許文献5）が開示されている。しかし、これらの方法はいずれも煩雑な操作が必要であり、例えば、生体内に移植された組織内の残存未分化細胞を簡便に識別することはできなかった。

30

【0011】

未分化細胞をそのプロモーター活性により識別することが試みられており、Stm1のプロモーター配列を利用する方法が開示されている。（特許文献6）

【0012】

これまで、本発明者らは、多因子癌細胞特異的増殖制御型ウイルスを用いた残存未分化細胞の選択的殺傷方法を提供してきた（特許文献7）。該方法は腫瘍化細胞や未分化細胞を直接、積極的に殺傷する点、遺伝子が導入されていない腫瘍化細胞にも殺傷効果が及ぶ点等から本問題の解決に非常に有用である一方、あらかじめ全ての幹細胞に目的遺伝子を導入しているものではないため、よって多因子癌細胞特異的増殖制御型ウイルスが到達しなかった幹細胞から腫瘍化細胞が出現した場合に、生体内でこのウイルスへの免疫誘導全てを除去できるかまでは保証できなかった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】国際公開第2012/115270号

【特許文献2】特開2013-9742号公報

50

【特許文献3】特開2012-223104号公報
 【特許文献4】特開2012-072063号公報
 【特許文献5】特表2009-528838号公報
 【特許文献6】特開2005-095027号公報
 【特許文献7】国際公開第2012/133674号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】TAKAHASHI, K. ら (2007) Cell 131: 861 - 72

【非特許文献2】MIURA, K. ら (2009) Nature Biotechnology 27: 743 - 745 10

【非特許文献3】NAKAGAWA, M. ら (2008) Nat. Biotechnology . 26: 101 - 6

【非特許文献4】WERNIG, M. ら (2008) Cell Stem Cell 2: 10 - 2

【非特許文献5】OKITA, K. ら (2008) Science 7: 949 - 53

【非特許文献6】YU, J. ら (2009) Science 8: 797 - 801

【非特許文献7】FUJII, CHENG ら (2012) Biomaterials 33: 3195 - 204

【非特許文献8】FEI, CHEN ら (2013) Biomaterials 34: 1701 - 11 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

従来の幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞の標識法及び除去法はその効率や簡便性等に問題があり、残存未分化細胞/腫瘍化細胞を同定及び除去する実用化可能な方法はまだ開発途中である。幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞を標識/除去するためには、細胞の正常な機能を維持する遺伝子を阻害することなく外来遺伝子を効率良く全ての未分化細胞に導入が可能なベクター、未分化細胞において特異的に機能させることができるプロモーターの効率的な探索・同定とその実証、並びに、未分化細胞を選択的に可視化・同定し、必要な時に選択的に腫瘍化原因細胞を確実に殺傷する自殺遺伝子等の複数の技術が必要となる。最終的には、これらの要素が全て収載された一つのベクターシステムであること、そしてそのシステムでは多種多様の候補のベクターを簡便・効率よく作製できる技術であること、が必要となる。これまで、これらの要件のすべてを満たす技術は見出されていない。

30

【0016】

また、従来、幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞の標識と除去は、それぞれ別個に行われてきた。従来の方法によれば、腫瘍化原因細胞を標識した後、異なる技術を用いて除去する必要があり、腫瘍化原因細胞の同定から除去まで行うには操作が煩雑であるという問題があった。また同定と除去が全く独立した別々の技術と過程で行われるため、必ずしも標識した腫瘍化原因細胞が、別の除去技術で完全に除去できる保証もなかった。特に、腫瘍化原因細胞、残存した未分化細胞を確実に除去、殺傷できる技術そのものが、研究も進んでおらず、未だ有効な手段はない。

40

【0017】

よって、本発明は、より効率的な残存未分化細胞の標識及び除去を達成するための利用可能な種々の方法を提供することを最終目的とする。具体的には、本発明は、細胞の正常な機能を維持する遺伝子を阻害することなく外来遺伝子を効率良く全ての未分化細胞に導入が可能な技術(ベクター)を提供することを目的とする。また、本発明は、幹細胞を分化させた後に残存する腫瘍化原因細胞を確実に標的化するための最良のプロモーターを探索する方法を提供することを課題とする。また、本発明は、幹細胞の腫瘍化原因細胞を効率

50

よく殺傷・除去することが可能な遺伝子を見出すことを課題とする。更に、本発明は、より簡便な腫瘍化原因細胞の標識及び除去の両方が可能なベクター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】

【0018】

本発明者らは、分化誘導処理後に残存する未分化細胞を効率的かつ網羅的に標識/除去する遺伝子導入技術について鋭意検討した結果、基本的な骨格となるベクターとして、リコンビネーションシステムにより組換え可能なプロモーター部分の下流に標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した発現カセットを有するウイルスベクターを見出した。本ベクターは、標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合していることから、一度の遺伝子導入で標識と細胞殺傷の両方の機能を付与することができる。また、本ベクターは、任意のプロモーターをリコンビネーションシステムにより簡便に組み込むことができることから、例えば、分化させる目的の細胞や、細胞除去のタイミング(移植前/移植後)等に応じて、適宜使用するプロモーターを選択することが可能である。また、プロモーターが未分化細胞又は腫瘍化原因細胞特異的に活性を有するか否かを簡便に解析する目的で使用することができる。また、本発明のベクターにおける殺傷遺伝子として薬剤依存性自殺遺伝子を採用することにより、腫瘍特異的/未分化細胞特異的プロモーターの細胞選択性に加えて、薬剤による誘導が無ければ細胞殺傷機能を発揮しない構造とすることができる。すなわち、このような本発明のベクターは、幹細胞に導入するのみではそれらの細胞を殺傷することがないため、全ての分化誘導処理前の幹細胞に導入することができ、これにより遺伝子導入の漏れが生じることを防ぐことができる。よって、腫瘍特異的/未分化細胞特異的プロモーターの細胞選択性と、薬剤依存性により、二重の安全性を確保することができる。さらに、本発明のベクターにおける殺傷遺伝子として(薬剤依存性の)増殖細胞特異的な殺傷機構を提供する殺傷遺伝子を利用することにより、腫瘍特異的/未分化細胞特異的プロモーターの細胞選択性と、薬剤依存性に加えて、殺傷機構の増殖細胞選択性を付与ことができ、三重の特異性・安全性を確保することができる。

【0019】

本発明者らは、本発明のベクターが搭載する薬剤依存性自殺遺伝子として、ヒト由来の酵素であるhuman-tmpk及びiCaspase9を利用することにより、免疫原性の問題を解消できることを見出した。また、本発明者らは、本発明のベクターが搭載する、未分化細胞又は腫瘍化原因細胞に特異的に活性を有するプロモーターを探索したところ、驚くことに、一般的には、腫瘍(癌)特異的プロモーターとして知られているsurvivinプロモーターが予想外に正常で未分化のヒトES/iPS細胞において高活性を示すことを見いだした。

【0020】

更に、本発明者らは、本発明のベクターを用いることによる、分化誘導処理後に残存する未分化細胞を効率的かつ網羅的に標識/除去する方法、並びに、プロモーターが未分化細胞又は腫瘍化原因細胞特異的に活性を有するか否かを簡便に解析する方法を見出した。

【0021】

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

(1) 標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター。

(2) 殺傷遺伝子が、自殺遺伝子である、(1)に記載のウイルスベクター。

(3) 自殺遺伝子が、薬剤依存性自殺遺伝子である、(2)に記載のウイルスベクター。

(4) 薬剤依存性自殺遺伝子が、HSV-tk、human-tmpk、シトシンデア

10

20

30

40

50

ミナーゼ (C D) 遺伝子、水痘ウイルスチミジンキナーゼ、又は Caspase である、
(3) に記載のウイルスベクター。

(5) 標識遺伝子が蛍光タンパク質である、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

(6) 蛍光タンパク質が、赤色又は緑色の蛍光蛋白質である、(5) に記載のウイルスベクター。

(7) 蛍光タンパク質が、mKate2 又は緑色蛍光蛋白質である、(5) に記載のウイルスベクター。

(8) 一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が、2A 配列又は IRES 配列である、(1) ~ (7) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

(9) レンチウイルスベクターである、(1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

(10) プロモーター領域が未分化細胞特異的プロモーター領域である、(1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。

(11) 未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーター又は tert プロモーターである、(10) に記載のウイルスベクター。

(12) 未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、(10) に記載のウイルスベクター。

(13) A) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターのプロモーター部分に被験プロモーターを組み替えて被験プロモーターを有するウイルスベクターを作製するステップ、

B) 被験プロモーターを有するウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

C) 分化誘導処理後の前記細胞における前記標識遺伝子の発現を検出するステップ、

D) 分化誘導処理後の前記細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップ、及び

E) 被験プロモーターが未分化細胞に特異的であるか否かを判定するステップを備える、未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法であって、

ここで、該判定が未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が高く、かつ、分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が低い場合、該被験プロモーターは未分化細胞に特異的であると判定することにより行われる方法。

(14) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

(15) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

(16) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

(17) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える

10

20

30

40

50

、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

(18) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、

C) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量 (又は割合) を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量 (又は割合) を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量 (又は割合) を示す方法。

(19) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、

B) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量 (又は割合) を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量 (又は割合) を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量 (又は割合) を示す方法。

(20) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞数を決定する方法。

(21) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞の数を決定する方法。

(22) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、

B) 分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存し又は発生したと判定するステップを備える、分化処理後に残存又は発生する未分化細胞のモニタリング方法。

(23) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入され、分化誘導処理された細胞における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存又は発生していると判定するステップを備える、幹細胞の分化処理後の未分化細胞のモニタリング方法。

(24) A) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、及び、

B) 前記細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

(25) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターが導入された細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

10

20

30

40

50

(26) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞標識剤。

(27) (10) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞殺傷剤。

(23) (1) ~ (12) のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された細胞。

(24) 幹細胞である(23)に記載の細胞。

(25) 幹細胞が、ES細胞、iPS細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、又は生殖幹細胞である、(24)に記載の細胞。

(26) 幹細胞を分化誘導処理することにより得られた細胞である、(23)に記載の細胞。

【0022】

本明細書において、「幹細胞」とは、多能性及び自己複製能を有する細胞を意味する。本明細書において、「多能性」とは、多分化能と同義であり、分化により複数の系統の細胞に分化可能な細胞の状態を意味する。本明細書における、多能性は、生体を構成する全ての種類の細胞に分化可能な状態(分化全能性(totipotency))、胚体外組織を除く全ての種類の細胞に分化可能な状態(分化万能性(pluripotency))、一部の細胞系列に属する細胞に分化可能な状態(分化多能性(multipotency))、及び1種類の細胞に分化可能な状態(分化単能性(unipotency))を含む。よって、本明細書における「幹細胞」は、幹細胞、ES細胞、iPS細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、又は生殖幹細胞を含む。好ましくは、本明細書における「幹細胞」は、分化万能性を有する細胞であり、より好ましくは、胚性幹細胞(ES細胞)及び人工多能性幹細胞(iPS細胞)である。ある細胞が幹細胞であるかどうかは、たとえば、体外培養系において胚様体(embryoid body)を形成する細胞、又は、分化誘導条件下で培養(分化処理)した後、に所望の細胞に分化する細胞が幹細胞であるとして確認することができる。または、幹細胞であるかどうかは、生体を用いて、免疫不全マウスへ移植することにより奇形種(テラトーマ)を形成する細胞、胚盤胞への注入によりキメラ胚を形成する細胞、生体組織への移植や腹水への注入により増殖する細胞が幹細胞であるとして確認することができる。あるいは、幹細胞であるかどうかは、アルカリフォスファターゼ染色、SSEA3染色、SSEA4染色、TRA-1-60染色、及び/又はTRA-1-81染色に陽性を示す細胞; oct3/4、nanog、sox2、cripto、dax1、eras、fgf4、esg1、rex1、zfp296、utf1、gdf3、sal14、tbx3、tcf3、dnmt31、及び/又はdnmt3b遺伝子を発現している細胞; miR-290、及び/又はmiR-302を発現している細胞が幹細胞であるとして確認することもできる。あるいは、ある細胞が幹細胞であるか否かは、例えば、テロメラーゼ逆転写酵素、又はサバイピンの発現レベルが高い細胞が幹細胞であるとして判定することができる。

【0023】

本明細書において、「分化」とは、多能性細胞の分裂によって特定の機能的又は形態的特徴を有する娘細胞を生じる現象をいう。本明細書において「分化処理」及び「分化誘導処理」とは同義であり、幹細胞を分化細胞へと誘導させるための処理を意味する。細胞の分化は、様々な方法により誘導されることが報告されている。多能性細胞は、分化させる細胞の種類等に応じて、分化誘導物質などを利用した分化誘導処理により分化させることができる。「分化細胞」とは、分化して生じた特定の機能的又は形態的特徴を有する娘細胞を意味する。分化細胞は通常安定しており、その増殖能は低く、別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。

【0024】

「未分化細胞」とは、分化していない細胞、もしくは分化途中の未分化細胞、および分

10

20

30

40

50

化が不完全な細胞を意味する。本明細書においては、特にそのように解することが不整合である場合を除き、「未分化細胞」とは、分化誘導処理したにもかかわらず、分化細胞とならなかった細胞を意味する。本明細書における未分化細胞は必ずしも前述の幹細胞の性質を完全に有することを必要とするものではなく、分化細胞と比較して（自己）増殖能が高い（例えば、増殖速度が2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上など）細胞を意味する。特に好ましくは、「未分化細胞」は「腫瘍化原因細胞」である。ある細胞が未分化細胞であるか否かは、例えば、c - M y c が活性化している細胞、あるいは、テロメラーゼ逆転写酵素、及びノ又はサバイビンの発現レベルが高い細胞を腫瘍形成能を有する細胞として判定することができる。

【0025】

本明細書において、「腫瘍化原因細胞」とは、幹細胞に対して分化処理をしたにもかかわらず分化しなかった未分化細胞であって、腫瘍細胞を生成し得る細胞を意味する。腫瘍化原因細胞は、分化する前の幹細胞と同等の性質を維持する細胞のみならず、分化する前の幹細胞とは異なる性質を有しているが分化細胞とはなかった細胞、例えば、少能性細胞（数種類の細胞にのみ分化できる細胞）、及び腫瘍形成能を有する細胞（例えば、がん幹細胞等）等をも包含する。ここで、「腫瘍細胞を生成し得る」とは、必ずしも100%腫瘍細胞を生成することを意味するものではなく、分化細胞と比較して腫瘍細胞を生成する能力が高いことを意味する。ある細胞が腫瘍形成能を有するか否かは、例えば、c - M y c が活性化している細胞、あるいは、テロメラーゼ逆転写酵素、及びノ又はサバイビンの発現レベルが高い細胞を腫瘍形成能を有する細胞として判定することができる。本明細書において、「分化処理後に残存する未分化細胞」、「残存未分化細胞」、「分化処理後の細胞における未分化細胞」等により表現される未分化細胞、特に幹細胞に対して分化誘導処理を行った後に残存する未分化細胞は「腫瘍化原因細胞」であってもよい。

【0026】

本明細書において、「標識遺伝子」とは、当該遺伝子が導入された細胞を検出又は測定可能な標識物質をコードする遺伝子を意味する。標識遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、あるいはGFPのアミノ酸配列を変える事で標識能がより向上したEGFP（enhanced GFP）やVenus、あるいは他の蛍光波長を呈する赤色蛍光タンパク質（RFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、mKate2等の赤色、緑色、青色、又は、黄色等の蛍光タンパク質； - グルクロニダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子を挙げることができ、好ましくは、mKate2又はVenusである。また、例えば、フェチリン遺伝子など、画像診断を可能とする標識遺伝子であってもよい。本明細書において、「標識」とは、その利用目的に応じて一時的に又は長期間、目的の細胞の存在又はその位置を同定し、目的の細胞数（量や割合でも良い）を測定し、あるいは目的の細胞を他の細胞から識別することを可能とすることを意味する。また、本明細書において「同定する」とは、一時的又は長期的に目的の細胞の存在又はその位置を特定することを意味し、「識別する」とは、一時的又は長期的に目的の細胞を他の細胞や組織から区別することを意味する。よって、本明細書における標識は、目的の細胞の存在又はその位置を特定し、あるいは、目的の細胞を他の細胞から区別することができれば特に制限されず、目的の細胞以外の細胞が全く染色等されないことを要するものではない。例えば、分化処理後の細胞中における未分化細胞の存在を、本発明のベクターが有する標識遺伝子の発現により識別する場合、該細胞中の分化細胞と比較して未分化細胞が区別可能な程度に染色されていればよく、分化細胞が（弱く）染色されることを妨げるものではない。

【0027】

本明細書において、「殺傷遺伝子」とは、導入された細胞を最終的に殺傷させる能力を有する遺伝子を意味し、例えば、いかなるアポトーシス誘導遺伝子（Bax, p53, DP5, PL-3, reaper, hid）、細胞死を誘導する遺伝子、腫瘍細胞を抑制する遺伝子であってもよい。また、「殺傷遺伝子」に変えて、分化誘導を促進する遺伝子を用いてもよい。本発明のウイルスベクターが分化誘導前に感染させることを目的とする場

10

20

30

40

50

合、「殺傷遺伝子」は、薬剤依存性自殺遺伝子、誘導（光、熱、温度、RNA、化合物、放射線、超音波など）依存性の遺伝子発現システム、あるいは誘導性殺傷遺伝子である。「薬剤依存性自殺遺伝子」とは、非毒性のプロドラッグ（薬剤）を毒性物質に変換させるタンパク質をコードする遺伝子、あるいは、非毒性のタンパク質であって薬剤の添加により毒性物質に変換されるタンパク質をコードする遺伝子を意味する。また、「薬剤依存性自殺遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤」とは前記薬剤依存性自殺遺伝子と相互作用することにより毒性を生じさせる薬剤を意味する。具体的には、本発明の薬剤依存性自殺遺伝子が、非毒性のプロドラッグ（薬剤）を毒性物質に変換させる代謝酵素タンパク質（プロドラッグ転換酵素）をコードする遺伝子であってもよい。この場合、「薬剤依存性自殺遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤」は、該薬剤依存性自殺遺伝子（代謝酵素）により毒性物質に変換される非毒性のプロドラッグを意味する。誘導（光、熱、温度、RNA、化合物、放射線、超音波など）依存性の遺伝子発現システム、又は誘導性殺傷遺伝子とは、光、熱、温度、RNA、化合物、放射線、超音波の刺激によりその発現が誘導される遺伝子発現システム、又は刺激によりその発現が誘導される殺傷遺伝子を意味する。本明細書において、そのように解することが不適合である場合を除き、「薬剤依存性自殺遺伝子」は「誘導性殺傷遺伝子」と読み替えても良い。

【0028】

薬剤依存性自殺遺伝子とプロドラッグ（薬剤）の組み合わせとしては、例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼと、ガンシクロビルまたはアシクロビル、Varicella Zosterウイルスチミジンキナーゼと、6メトキシプリンアラビノヌクレオシド（Huberら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039）、E. coli シトシンデアミナーゼと、フルオロウラシル（Mullenら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:33）、E. coli キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼと、チオキサンチン（Beshardら、1987、Mol. Cell Biol. 7:4139）、E. coli または Leishmania プリンヌクレオチドホスホリラーゼと、非毒性プリンデオキシアデノシン、アデノシン、デオキシグアノシン、またはグアノシン誘導體（Koszalka および Krenitsky、1979、J. Biol. Chem. 254:8185、1979；Sorscherら、1994、Gene Therapy 1:233）、シトクロム p150 2B1 またはシトクロム p450 レダクターゼと、3-アミノ-1,2,4ベンゾトリアジン1,4-ジオキド（Waltonら、1992、Biochem. Pharmacol. 44:251）、細胞表面アルカリホスファターゼと、エトポシド1リン酸（Senterら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4842、1988）、ニトロレダクターゼと、メトロニダゾールまたはニトロフアントイン（Hofら、1988、Immunitat und Infektion 16:220）、N-デオキシリボシル（deoxyribo-syl）トランスフェラーゼと、1-デアザプリン（Betbederら、1989、Nucleic Acids Res. 17:4217）、ピルビン酸フェロドキシノキシドレダクターゼと、メトロニダゾール（Upcroftら、1990、Int. J. Parasitology 20:489）、カルボキシペピダーゼ G2 と、アミノアシル酸ナイトロジェンマスタード（Antoniwら、1990、Brit. J. Cancer 62:909）、カルボキシペプチダーゼ A と、メトトレキセート アラニン（Haenselerら、1992、Biochemistry 31:891）、ラクタマーゼと、セファロスポリン誘導體（Meyerら、1993、Cancer Res. 53:3956；および Vradhulaら、1993、Bioconjugate Chemistry 4:334）、アクチノマイシン D シンセターゼ複合体と、合成ペントペプチドラクトン前駆体（Katzら、1990、J. Antibiotics 43:231）、およびグルクロニダーゼと、デオキシソルピシンのような毒性物質のグルクロニド誘導體（Bossletら、1994、Cancer Res. 54:2151；Haerberlinら、1993、Pharmaceuti

10

20

30

40

50

cal Res. 10:1553)を挙げることができる。

【0029】

例えば、薬剤依存性自殺遺伝子としてHSV-tk等のチミジンキナーゼを用い、薬剤としてガンシクロビル(GCV)を用いる場合、GCVがHSV-tkにより代謝されて毒性物質であるガンシクロビル三リン酸を生じさせることができる。また、例えば、薬剤依存性自殺遺伝子としてhuman-tmpkを用い、非毒性のプロドラッグとしてアジドチミジン(AZT)を用いる場合、AZTがhuman-tmpkにより代謝された毒性物質であるAZT三リン酸を生じさせることができる。また、薬剤依存性自殺遺伝子として大腸菌等の細菌由来のシトシンデアミナーゼ(CD)を用い、非毒性のプロドラッグとして5-フルオロトキシン(5-FC)を用いる場合、5-FCがCDにより代謝されて毒性物質である5-フルオウリシル(5-FU)を生じさせることができる。薬剤依存性自殺遺伝子として水痘ウイルスチミジンキナーゼを用い、非毒性のプロドラッグとして6-メトキシプリンアラビノヌクレオシド(Ara-M)を用いる場合、Ara-Mが水痘ウイルスチミジンキナーゼにより代謝されて毒性物質である6-メトキシプリンアラビノヌクレオシド(Ara-MMP)を生じさせることができる。

10

【0030】

あるいは、本発明の薬剤依存性自殺遺伝子は、非毒性のタンパク質を薬剤の添加により毒性物質に変換されるタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、本発明の薬剤依存性自殺遺伝子は、単量体では毒性を発揮しないが多量体(例えば、二量体)となることにより毒性を発揮するタンパク質をコードしていてもよい。この場合、「薬剤依存性自殺遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤」は、薬剤依存性自殺遺伝子を毒性物質に変換させる物質を意味する。例えば、薬剤依存性自殺遺伝子としてはCaspase 9、及びCaspase 3等のカスパーゼを用い、薬剤としてDimerizerを用いる場合、Dimerizerによってカスパーゼが二量体化することで毒性物質である活性のあるCaspase-9二量体を形成させ、アポトーシスを誘導することができる。このような多量体(例えば、二量体)となることにより毒性を発揮する薬剤依存性自殺遺伝子としては、例えば、Fas受容体、及びFADDを挙げることができる。

20

【0031】

本明細書において、「一つのプロモーターにより2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列」とは、一つのプロモーターが活性化することにより2種類のタンパク質又はペプチドを翻訳させることが可能な配列を意味する。このような配列は、自己切断活性を持つ配列であって、一つのプロモーターの活性化により2つの遺伝子を共に発現させて該配列を介して結合された2つのタンパク質又はペプチドとして翻訳された後に、該配列を介して結合された当該2つのタンパク質又はペプチドが、該配列の領域で自己切断されて、結果的にセパレートされた2つのタンパク質又はペプチドが翻訳される配列であってもよい。あるいは、「一つのプロモーターにより2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列」は、リボソームを引きつけてmRNAの途中から2度目の翻訳を開始させ、1つのmRNAから2つの異なる遺伝子がバイシストロニックに翻訳させる配列であってもよい。前者としては、例えば、「2A配列」を挙げることができ、後者としては、例えば、「IRES(internal ribosome entry site)配列」を挙げることができる。より具体的には、2A配列には、口蹄疫ウイルス由来の2A配列、equine rhinitis Aウイルス由来の2A配列が含まれる(Furler, Sら(2001) Gene Ther. 8, 864-73; 及びHasegawaら(2007) Stem Cells 25, 1707-12参照)。

30

40

【0032】

本発明のベクターは、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有する。リコンビネーションカセットとは、リコンビネーション(リコンビナーゼ)によって遺伝子を組み換えることできる領域を意味し、リコンビナーゼにより認識される核酸配列と、当該核酸配列に挟まれた外来遺伝子挿入部位を備える。リコンビネーションカセットとしては、例えば、attL-末端DNA断片とattR含有ドナーベクターとの間でリコン

50

ピネーションが起こる、LRリコンビネーション（バクテリオファージ インテグラーゼ及びエクシジョナーゼ、並びに、大腸菌インテグレーションホスト因子タンパク質）、及び、attB-末端DNA断片とattP含有ドナーベクターとの間でリコンビネーションが起こる、BPリコンビネーション（バクテリオファージ インテグラーゼ、及び、大腸菌インテグレーションホスト因子タンパク質）等のファージのリコンビネーション（Landy, A (1989) Ann. Rev. Biochem. 58: 913-949; 及びPtashne, M. (1992) A Genetech Switch: Phage (Lambda) And Higher Organisms (Cambridge, MA: Cell Press) 参照) (Gateway (登録商標) Technology, Invitrogen社); Cre-loxPリコンビネーション (Cre); FLP-FRTリコンビネーション (Flippase); 並びに、RSリコンビネーション (R Recombinase, GIX Recombinase) 等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0033】

本発明のウイルスベクターを未分化細胞の標識及び/又は殺傷（除去）に使用する場合、プロモーターとしては、未分化細胞特異的プロモーターを使用することができる。本発明において、「未分化細胞特異的プロモーター」とは、未分化細胞及び/又は腫瘍化原因細胞において、特異的に、かつ、その下流に結合された標識遺伝子及び/又は薬剤依存性自殺遺伝子とその機能を発揮するのに十分な程度に発現させることができる活性を示すプロモーターを意味する。このようなプロモーターとしては、テロメラーゼ逆転写酵素 (tert) プロモーター (Takakura, M. ら, Cancer Res., 59: 551-557, 1999 参照)、サバイビン (survivin) プロモーター (Li, F. ら, (1999) Cancer Res., 59: 3143-3151; LI, F. ら, (1999) Biochem. J., 344: 305-311 参照)、Auroraキナーゼプロモーター、低酸素応答性領域 (HRE) プロモーター、Grp78プロモーター、L-プラスチンプロモーター、及びヘキソキナーゼIIプロモーター、Oct3/4プロモーター、Nanogプロモーター、SOX2プロモーター、CRIPTOプロモーター、DAX1プロモーター、ERasプロモーター、Fgf4プロモーター、Esg1プロモーター、Rex1プロモーター、Zfp296プロモーター、UTF1プロモーター、GDF3プロモーター、Sal14プロモーター、Tbx3プロモーター、Tcf3プロモーター、DNMT3Lプロモーター、DNMT3Bプロモーター、miR-290プロモーターなどが挙げられる。

【0034】

本明細書において、「発現可能に連結されている (operably linked to) とは、(in vitroにおける転写/翻訳システムにおいて、又は、ベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞内で) 目的の遺伝子の核酸配列の発現を可能とする状態で、当該目的の遺伝子の核酸配列が制御配列 (プロモーター配列) と結合していることを意味する。

【0035】

ウイルスベクターとしては、本発明の目的で使用可能なウイルスベクターであれば特に制限されるものではないが、例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターを含む。

【0036】

また、本発明は、上述のウイルスベクターが導入された細胞に関する。本細胞は、幹細胞であってもよいし、幹細胞を分化誘導することにより得られた細胞 (例えば、分化細胞) であってもよい。

【発明の効果】

【0037】

本発明のウイルスベクター及び方法は、標識遺伝子と殺傷遺伝子が一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合していることから、一度の遺伝子導入で標識と細胞殺傷の両方の機能を付与することができる。また、本ベクターは、任意のプロモーターをリコンビネーションシステムにより簡便に組み込むことができることから、例えば、分化させる目的の細胞や、細胞除去のタイミング（移植前/移植後）等の目的に応じて、その目的に適する候補のプロモーターを複数選択して様々なウイルスベクターを効率・迅速に作製しておくことが可能である。また、プロモーターが未分化細胞又は腫瘍化原因細胞特異的に活性を有するか否かを簡便に解析する目的で使用することができる。また、本発明のベクターにおいて、未分化細胞又は腫瘍化原因細胞特異的プロモーター配列の制御下に薬剤依存性自殺遺伝子が配置されている場合、薬剤による誘導が無ければ細胞殺傷機能を発揮しない構造となっている。そのため、分化誘導処理前の全ての幹細胞に導入しても、薬剤を添加しない限りは細胞が死滅しないため、分化誘導前に遺伝子を導入し、遺伝子が導入された幹細胞のみを分化誘導に用いることができることから、遺伝子導入の漏れを防ぐことができる。また、本発明のベクターが搭載する薬剤依存性自殺遺伝子は、ヒト由来の酵素であることにより、免疫原性の問題を解消できる。即ち、本発明の未分化細胞特異的なプロモーターを有するウイルスベクターは、分化処理前の全ての幹細胞に導入することで、分化処理後の残存未分化細胞を特異的かつ網羅的に標識/殺傷することができることから、再生医療において未分化細胞が残存することによる腫瘍化の問題を解決することができる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】ベクター構築の概略図である。リコンビネーションカセット（RC）を含むlentivirus vector plasmid（pLenti6-RC）に、制限酵素を用いたクローニングおよびIn-Fusion（登録商標）クローニングで作製した“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”カセットを導入して「pLenti6-RC-蛍光タンパク質-2A-自殺遺伝子」を作成した。Promoter部分の組み換えはGateway（登録商標）クローニングを用いて、Shuttle vector plasmidにサブクローニングしたプロモーター（“Promoter”カセット）をpLenti6-RC-蛍光タンパク質-2A-自殺遺伝子のRC部分に挿入し、プラスミド「pLenti6-Promoter-蛍光タンパク質-2A-自殺遺伝子」を完成させた。

【図2】pLenti6-RCの構成とPromoter挿入の概略図である。A. RCを含むLentivirus vector plasmid（pLenti6-RC）の構成を示す。B. LRコナーゼを使用したプロモーターカセットの挿入を示す。pLenti6-RCと、遺伝子組み換え用のShuttle vector plasmidには相同なatt配列が含まれる。目的のPromoterをクローニングしたShuttle vector plasmidとpLenti6-RCと組換え酵素であるLR clonaseで反応させ、pLentiベクターにプロモーター配列を組み込む。

【図3】PCRによる制限酵素付加およびpGEM-Teasy vectorへのクローニングを示す模式図である。ベクター構築に利用する蛍光タンパク質遺伝子（mKate2：A，Venus：B）と自殺遺伝子（human-tmpk：C，HSV-tk：D）をサブクローニングし、pGEM-Teasy Cloning vectorへTAクローニングした。各遺伝子には図に示した制限酵素配列を付加した。

【図4】蛍光タンパク質遺伝子のpFlag-CMV-2Aベクターへのクローニングを示す模式図である。pGEM-TeasyにサブクローニングしたmKate2（A）およびVenus（B）を制限酵素で切り出し、NotI/BglIIで切断したpFlag-CMV-2AのCMVと2Aの間に挿入した。

【図5】“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”発現カセットの作製の模式図を示す。pGEM-Teasyにサブクローニングしたhuman-tmpkおよびHSV-tkを制限酵素で切り出し（A）、BamHIおよびBstXI（平滑末端化）で切断したpFlag-CMV-蛍光タンパク質-2Aに挿入した（B）。完成したプラスミドの概略をCに示す。

【図6】“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”発現カセットのpLenti6-RC plasmidへの挿入を示す模式図である。図2に示したRCを含むpLenti6-RC(A)に、図5に示した2種類の“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”発現カセット(B)をAgeIおよびKpnIサイトに挿入した(C)。

【図7】“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”発現カセットのpLenti6-RC plasmidへの挿入を示す模式図である。図2に示したRCを含むpLenti6-RC(A)に、図5に示した2種類の“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”発現カセット(B)をAgeIおよびKpnIサイトに挿入した(C)。

【図8】“iCaspase+蛍光タンパク質”発現カセットを持つpLenti6-RCの作製を示す模式図である。pLenti6-RCをベクターとし、RCの下流にiCaspase9-2Aと蛍光タンパク質遺伝子が挿入できるよう両末端に15PBの相同配列を付加したプライマーを設計しPCRを行った。これらをそれぞれ合わせ、IN-FUSION酵素で反応させることで、クローニングを行った。

【図9】サブクローニングした蛍光タンパク質の発現を確認した写真を示す。pFlag-CMV-2Aに挿入したmKate2(A)、及びVenus(B)の発現を確認した。作製したプラスミドをHEK293細胞に導入し、48時間後に蛍光顕微鏡で確認した写真である。

【図10A】“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”カセットの発現を確認した写真を示す。図2Bに示すプラスミドをHEK293細胞に導入し、48時間後より3日間、GCVを0、0.01、0.1、1、10、100mg/mLの濃度に振り分けて投与した。HSV-tkを持つプラスミドを導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、mKate2(赤色)及びVenus(緑色)の蛍光発現をGCV投与後経時的に確認した。

【図10B】図10Aの細胞についてGCV投与後の細胞生存数をカウントした結果を示す。縦軸の数値は薬剤0mg/mLの細胞生存数を100としたときの割合(%)で示す。

【図10C】“蛍光タンパク質+自殺遺伝子”カセットの発現を確認した写真を示す。図2Bに示すプラスミドをHEK293細胞に導入し、48時間後より3日間、AZTを0、0.1、1、10、100、1000nmの濃度に振り分けて投与した。human-tmpkを持つプラスミドを導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、mKate2(赤色)及びVenus(緑色)の蛍光発現をAZT投与後経時的に確認した。

【図10D】図10Cの細胞についてAZT投与後の細胞生存数をカウントした結果を示す。縦軸の数値は薬剤0nmの細胞生存数を100としたときの割合(%)で示す。

【図11A】KHE51細胞におけるHSV-tk導入後のGCV感受性を示す写真である。KHE51細胞にAd.CAG-HSV-tkをMOI=10で感染後、GCVの投与の有無による細胞傷害効果の差を経時的に観察した。左はGCV非投与群、右はGCV投与群を表す。

【図11B】BJ細胞におけるHSV-tk導入後のGCV感受性を示す写真である。BJ細胞にAd.CAG-HSV-tkをMOI=10で感染後、GCVの投与の有無による細胞傷害効果の差を経時的に観察した。左はGCV非投与群、右はGCV投与群を表す。

【図12A】KHE51細胞におけるhuman-tmpk導入後のAZT感受性を示す写真である。KHE51細胞にpHR'-cPPT-EF-Tmpk(F105Y)を導入し、24時間後よりAZTを0、30、100、300nmで投与し、3日後及び4日後の細胞傷害効果を確認した。

【図12B】BJ細胞におけるhuman-tmpk導入後のAZT感受性を示す写真である。BJ細胞にpHR'-cPPT-EF-Tmpk(F105Y)を導入し、24時間後よりAZTを0、30、100、300nmで投与し、3日後及び4日後の細胞傷害効果を確認した。

【図12C】MKN45細胞におけるhuman-tmpk導入後のAZT感受性を示す写真である。MKN45にpHR'-cPPT-EF-Tmpk(F105Y)を導入し

10

20

30

40

50

、24時間後よりAZTを0, 30, 100, 300mmで投与し、3日後及び4日後の細胞傷害効果を確認した。

【図13A】分取したHuman tmpk恒常発現細胞(CD19陽性細胞)の確認の結果を示すグラフである。1×10⁶個のKhES1細胞をAlexa Fluor 488 anti-Human SSEA4と、anti-Human CD19-APCの2種類で標識し、フローサイトメーターによりSSEA4/CD19両陽性細胞の割合を解析した。

【図13B】分取したHuman tmpk恒常発現細胞(CD19陽性細胞)の確認の結果を示すグラフである。1×10⁶個のKhES1をanti-Human CD19-APCで標識し、フローサイトメーターによりCD19陽性細胞の割合を解析した。左は分取前、右は分取後の解析結果を示す。

【図13C】分取したHuman tmpk恒常発現細胞(CD19陽性細胞)の確認の結果を示すグラフである。1×10⁶個のJurkatをanti-Human CD19-APCで標識し、フローサイトメーターによりCD19陽性細胞の割合を解析した。左は分取前、右は分取後の解析結果を示す。

【図13D】分取したHuman tmpk恒常発現細胞(CD19陽性細胞)の確認の結果を示すグラフである。1×10⁶個のMKN45をanti-Human CD19-APCで標識し、フローサイトメーターによりCD19陽性細胞の割合を解析した。左は分取前、右は分取後の解析結果を示す。

【図14A】human-tmpk恒常発現Jurkat細胞における薬剤感受性を確認した結果を示す写真である。分取したhuman-tmpk恒常発現細胞(tmpk)と非感染細胞(negative control:NC)と共に1wellあたり1×10⁵個の細胞を24well plateに播種し、翌日より3日間、tmpk及びNC両群にAZTを0, 0.1, 1, 10, 100, 1000mmでそれぞれ投与した。Jurkatにおける、AZT処理三日後の細胞の様子を示す。左はtmpk恒常発現細胞群、右はNC群。

【図14B】human-tmpk恒常発現MKN細胞における薬剤感受性を確認した結果を示す写真である。分取したhuman-tmpk恒常発現細胞(tmpk)と非感染細胞(NC)と共に1wellあたり1×10⁵個の細胞を24well plateに播種し、翌日より3日間、tmpk及びNC両群にAZTを0, 0.1, 1, 10, 100, 1000mmでそれぞれ投与した。MKNにおける、AZT処理三日後の細胞の様子を示す。左はtmpk恒常発現細胞群、右はNC群。

【図14C】図14Aの実験の投与三日後のJurkat細胞の生存細胞数を細胞カウントにより測定した結果を示すグラフである。数値は薬剤0mg/mLの細胞生存数を100としたときの割合(%)で示す。

【図14D】図14Bの実験の投与三日後のMKN45細胞の生存細胞数を細胞カウントにより測定した結果を示すグラフである。数値は薬剤0mg/mLの細胞生存数を100としたときの割合(%)で示す。

【図15】A:未分化特異的プロモーターの候補であるsurvivinプロモーター部分を、既に作製済みであったpGEMT-easy-survivinよりNotIで切り出した後平滑末端化処理を行い、pENTR-vectorにサブクローニングしてpENTR-survivinを構築した。B:未分化特異的プロモーターの候補であるtertプロモーター部分を、既に作製済みであったpGEMT-EASY-tertよりMluI/BglIIで切り出した後平滑末端化処理を行い、pENTR-vectorにサブクローニングしてpENTR-Tertを構築した。C:未分化特異的プロモーターの候補であるRex1プロモーター部分を、既に作製済みであったpGEMT-easy-Rex1よりMunI/NheIで切り出した後平滑末端化処理を行い、pENTR-vectorにサブクローニングしてpENTR-Rex1を構築した。D:未分化特異的プロモーターの候補であるNanogプロモーターは、マウスES細胞(mES)よりゲノムDNA抽出したものを材料とし、Nanogプロモーター領域の5'側にpEN

10

20

30

40

50

TR - vector クローニング用の突出末端として CACC を付加したプライマー、及び 3' 側のプライマーを作製して PCR 法により増幅した後、pENTR - vector にサブクローニングして pENTR - Nanog を構築した。E : 恒常性プロモーターの候補である CAG プロモーター部分を、既に作製済みであった pCX - EGFP より SalI / EcoRI で切り出した後平滑末端化処理を行い、pENTR - vector にサブクローニングして pENTR - CAG を構築した。F : 恒常性プロモーターの候補である PGK プロモーターは、5' 側に pENTR - vector クローニング用の突出末端として CACC を付加したプライマー、及び 3' 側に PstI サイトを付加したプライマーを作製して PCR 法により増幅した後、pENTR - vector にクローニングして pENTR - PGK を構築した。

10

【図 16 A】図 7 で示したプラスミドのうち、pLenti6 - RC - Venus - 2A - HSV - tk の RC 部分に、リコンビネーションにより各種プロモーターを挿入した。未分化特異的プロモーターとして survivin, tert, Rex1, Nanog を、またコントロールとして恒常性プロモーターの CAG, PGK をそれぞれ挿入した。

【図 16 B】図 7 で示したプラスミドのうち、pLenti6 - RC - Venus - 2A - human - tmpk の RC 部分に、リコンビネーションにより各種プロモーターを挿入した。未分化特異的プロモーターとして survivin, tert, Rex1, Nanog を、またコントロールとして恒常性プロモーターの CAG, PGK をそれぞれ挿入したものを作製した。

【図 17 A】survivin - Venus - 2A - HSV - tk を有するレンチウイルスベクターを KhES1 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4, 7 日後の細胞の様子を表す。

20

【図 17 B】CAG - Venus - 2A - HSV - tk を有するレンチウイルスベクターを KhES1 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4, 7 日後の細胞の様子を表す。

【図 17 C】HSV - tk を持たない survivin - Venus - 2A - puromycin を有するレンチウイルスベクターを KhES1 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4, 7 日後の細胞の様子を表す。

【図 17 D】レンチウイルスベクター非感染 KhES1 細胞 (No virus) に感染した細胞の写真である。左から GCV 処理 1, 4, 7 日後の細胞の様子を表す。

30

【図 18 A】survivin - Venus - 2A - HSV - tk を有するレンチウイルスベクターを D3 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4 日後の細胞の様子を表す。

【図 18 B】CAG - Venus - 2A - HSV - tk を有するレンチウイルスベクターを D3 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4 日後の細胞の様子を表す。

【図 18 C】HSV - tk を持たない survivin - Venus - 2A - puromycin を有するレンチウイルスベクターを D3 細胞に感染した細胞における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4 日後の細胞の様子を表す。

40

【図 18 D】レンチウイルスベクター非感染 D3 細胞 (No virus) における写真である。左から GCV 処理 1, 4 日後の細胞の様子を表す。

【図 18 E】図 18 A - D に示した細胞の GCV 処理 7 日後に、各細胞の細胞生存率を WST - 8 Assay により測定した結果である。各群は左から survivin - Venus - 2A - HSV - tk、CAG - Venus - 2A - HSV - tk、survivin - Venus - 2A - puromycin、非感染の D3 細胞の各 GCV 濃度投与後の生存率を示す。

【図 19 A】survivin - Venus - 2A - HSV - tk を有するレンチウイルスベクターを KhES1 細胞に感染し、分化誘導処理後における Venus の発現を確認した写真である。左から GCV 処理 1, 4 日後の細胞の様子を表す。

50

【図19B】CAG-Venus-2A-HSV-tkを有するレンチウイルスベクターをKHE S1細胞に感染し、分化誘導処理後におけるVenusの発現を確認した写真である。左からGCV処理1, 4日後の細胞の様子を表す。

【図19C】HSV-tkを持たないsurvivin-Venus-2A-purromycinを有するレンチウイルスベクターをKHE S1細胞に感染し、分化誘導処理後におけるVenusの発現を確認した写真である。左からGCV処理1, 4日後の細胞の様子を表す。

【図19D】レンチウイルスベクター非感染KHE S1細胞(No virus)の、分化誘導処理後における写真である。左からGCV処理1, 4日後の細胞の様子を表す。

【図19E】図18A-Dに示した細胞のGCV処理7日後に、各細胞の細胞生存率をWST-8 Assayにより測定した結果である。各群は左からsurvivin-Venus-2A-HSV-tk、CAG-Venus-2A-HSV-tk、survivin-Venus-2A-purromycin、非感染のKHE S1細胞の各GCV濃度投与後の生存率を示す。

【図20】図17で使用した各レンチウイルスベクター感染未分化KHE S1細胞が分化多能性を保持しているかについて確認するために、細胞を免疫不全マウス(NOD-Scid mouse)に皮下移植してテラトーマ形成実験を行った。得られたテラトーマ切片のヘマトキシリン-エオジン(HE)染色像を示す。(A)~(C) survivin-Venus-2A-HSV-tk感染KHE S1細胞で、矢印の部分はそれぞれ(A)消化管細胞(内胚葉)、(B)筋細胞・脂肪細胞(破線)(中胚葉)(C)神経細胞(外肺葉)を示し、レンチウイルス非感染細胞と同様に三胚葉への分化能を維持していることを確認した。(D)~(F) CAG-Venus-2A-HSV-tkを感染させたKHE S1細胞で、矢印の部分はそれぞれ(D)消化管細胞(内胚葉)、(E)軟骨(中胚葉)(C)神経細胞(外肺葉)を示し、レンチウイルス非感染細胞と同様に三胚葉への分化能を維持していることを確認した。

【発明を実施するための形態】

【0039】

1. 本発明のベクターの製造

本発明のベクターは、標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクターを当業者周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製することにより得ることができる。

【0040】

2. プロモーターの導入

本発明のウイルスベクターは、リコンビネーション法を用いて任意の被験プロモーター領域、又は目的のプロモーター領域を組み込むことができる。リコンビネーションによる遺伝子導入は、ベクター中のリコンビネーションカセットに使用した遺伝子配列に対応するシャトルベクター及びリコンビナーゼを用いることにより、当業者周知の方法を用いて実施することができる。

【0041】

3. 未分化細胞特異的標識/殺傷方法

一態様において、未分化細胞特異的なプロモーター領域を用いることによって本発明のウイルスベクターは、分化処理後に残存する未分化細胞を特異的に標識し、かつ/又は殺傷する方法に使用することができる。なお、以下の全ての方法において、「対象の細胞」とは、幹細胞(例えば、分化処理前の幹細胞、分化処理中の幹細胞など)、又は幹細胞を分化処理した後の細胞であってもよい。例えば、本発明の方法において本発明のウイルスベクターを感染させる「対象の細胞」とは、本発明のベクターを感染させる標的細胞を意味し、分化誘導処理後に未分化細胞として残存又は発生した場合に除去又は検出すること

を意図する細胞であれば分化誘導の前後を問わない。また、対象の細胞が、分化処理前の幹細胞又は分化処理中の幹細胞の場合、本発明のウイルスベクターが感染した細胞の分化を誘導する分化処理ステップを含んでいてもよい。また、以下の全ての方法において、「分化処理された細胞」又は「分化処理後の細胞」とは、幹細胞に分化処理を施すことにより得られた細胞を意味する。また、以下の全ての方法において、「未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクター」とは、上述の本発明のベクターを意味し、具体的には、標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、未分化細胞特異的プロモーターを含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクターを意味する。

【0042】

3.1 未分化細胞特異的標識方法

例えば、未分化細胞特異的なプロモーター領域を有する本発明のウイルスベクターは、幹細胞を分化処理した後に残存する又は発生した未分化細胞を特異的に標識する目的で用いることができる。

【0043】

よって、一態様において、本発明は、未分化細胞を特異的に標識することにより、分化処理した後の細胞に未分化細胞が残存しているか否かを判定する方法に関する。具体的には、本発明は、A)未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターを対象の細胞に感染させるステップ、B)分化処理後の前記細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、C)前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法に関する。

【0044】

前記方法は、既に本発明のベクターが導入された幹細胞を分化誘導処理した細胞、又は、幹細胞を分化誘導処理して本発明のベクターを導入した細胞を用いることにより、感染ステップを含んでいなくても良い。即ち、本発明は、A)未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入された分化処理後の細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、B)前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法であってもよい。

【0045】

あるいは、本発明の方法は、単に未分化細胞の有無を判定する代わりに、細胞集団に含まれる標識遺伝子のレベル(量)を指標として、未分化細胞の含有量又は含有割合を決定する方法であっても良い。具体的には、本発明の方法は、A)未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターを対象の細胞に感染させるステップ、B)分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、C)測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量(又は割合)を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量(又は割合)を決定する方法であって、ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量(又は割合)を示す方法に関する。

【0046】

前記方法は、既に本発明のベクターが導入された幹細胞を分化誘導処理した細胞、又は、幹細胞を分化誘導処理して本発明のベクターを導入した細胞を用いることにより、感染ステップを含んでいなくても良い。即ち、本発明は、A)未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入された分化処理後の細胞における前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、B)測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量(又は割合)を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における

未分化細胞の量（又は割合）を決定する方法であって、ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量（又は割合）を示す方法であってもよい。これらの未分化細胞の量（又は割合）を決定する方法において、「レベル」とは、通常は前記標識遺伝子の発現産物の量を示すが、当該量の指標となる他の値（例えば、測定された蛍光強度等）を用いても良い。また、「測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量（又は割合）を決定する」とは、例えば、予め用意された標準細胞における標識遺伝子の発現産物のレベルと細胞数との検量線から、具体的な想定細胞数を算出することを意味としてもよいし、他のサンプル又は異なる処理経過時間における測定値との比較において、未分化細胞の量（又は割合）の多少又は増減として決定することを意味としても良い。後者の場合、対象との比較において発現産物のレベルが高い場合には未分化細胞の量（又は割合）が多い（高い）又は増加したと判定し、発現産物のレベルが低い場合には未分化細胞の量（又は割合）が少ない（低い）又は減少したと判定することができる。

10

20

30

40

50

【0047】

別の態様において、本発明においては、未分化細胞のみが特異的に標識化され、分化細胞は標識化されないことから、細胞レベルで分化細胞と未分化細胞を識別可能であることから、本発明は、分化処理された細胞群に含まれる未分化細胞（又は未分化細胞の位置）を同定する方法を含む。具体的には、本発明の方法は、A）未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターを対象の細胞に感染させるステップ、B）分化処理後の前記細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を測定するステップ、及び、C）前記標識遺伝子が発現している細胞（又は当該細胞の位置）が、未分化細胞（又は未分化細胞が存在する位置）であると同定するステップ、を備える、分化処理後の細胞における未分化細胞（又は未分化細胞の位置）を同定する方法に関する。

【0048】

あるいは、本発明は既に本発明のベクターが導入された幹細胞を分化誘導処理した細胞、又は、幹細胞を分化誘導処理して本発明のベクターを導入した細胞における、未分化細胞（又は未分化細胞の位置）を同定する方法であっても良い。即ち、本発明は、A）未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入された分化処理後の細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を測定するステップ、及び、B）前記標識遺伝子が発現している細胞（又は当該細胞の位置）が、未分化細胞（又は未分化細胞が存在する位置）であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞（又は未分化細胞の位置）を同定する方法に関する。これらの未分化細胞（又は未分化細胞の位置）を同定する方法において、前記標識遺伝子の発現産物の測定は、当該発現産物を発現している細胞又は該細胞の位置が特定できる方法により行われる。

【0049】

このように本発明によれば、分化細胞と未分化細胞を細胞レベルで識別可能であることから、分化誘導後の細胞集団に含まれる未分化細胞は、細胞数として計数することもできる。よって本発明は、A）未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターを対象の細胞に感染させるステップ、B）分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、C）前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞の数を決定する方法に関する。

【0050】

あるいは、本発明は既に本発明のベクターが導入された幹細胞を分化誘導処理した細胞、又は、幹細胞を分化誘導処理して本発明のベクターを導入した細胞における、未分化細胞数を決定する方法であっても良い。即ち、本発明は、A）未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが感染した細胞であって、分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞の数を計数するステップ、及び、B）前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞の数を決定する方法に関する。これらの分化誘導後の細胞集団に含まれる未分化細胞数の決定方法は、計数する対象を所定の細胞数の細胞、所定の培養領域、又

は、所定の培養量とすることにより、所定の細胞数当たりの未分化細胞数、所定の培養領域当たりの未分化細胞数、又は、所定の培養量当たりの未分化細胞数として決定しても良い。

【0051】

上述の未分化細胞の存在、存在量若しくは細胞数の決定方法、又は同定方法は、経時的に行うことにより、細胞品質のモニタリング方法として利用することもできる。例えば、本発明は、

A) 分化処理された細胞又は分化処理中の細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入され、分化誘導処理された細胞における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、

B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存又は発生していると判定するステップを備える、幹細胞の分化処理後の未分化細胞のモニタリング方法を含む。

【0052】

また、本発明のモニタリング方法は、2以上の時点においてこれらの方法を実施し、過去の値と比較することで未分化細胞の増減又は発生の経時的变化を確認することができる。特に、本発明の標識遺伝子が非侵襲的に検出可能である場合、該モニタリングは細胞を培養しながら、又は、細胞を生体内に移植後もリアルタイムでモニタリングすることができる。よって、本発明の方法は、A) 分化処理された細胞又は分化処理中の細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入された細胞における、前記標識遺伝子の発現産物を検出し、レベルを測定し、同定し、又は、測定するステップ、B) 前記A)とは異なる時間において前記A)のステップを実施するステップ、C) 前記A)で決定された結果と比較した前記B)で決定された結果が前記標識遺伝子の発現産物が検出又は増加することを意味する場合には、未分化細胞が発生又は増加していると判定し、あるいは、前記A)で決定された結果と比較した前記B)で決定された結果が前記標識遺伝子の発現産物が同程度であることを意味する場合には未分化細胞が残存している判定するステップを備える、分化処理後又は分化処理中の細胞における未分化細胞残存又は発生の有無のモニタリング方法に関する。

【0053】

本発明は更に、分化処理後の細胞を体内に移植した後に発生する未分化細胞をモニタリングする方法を含む。具体的には、本発明は、A) 分化処理された細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターが導入された細胞(以下、「移植細胞」という)を移植された患者における、前記標識遺伝子の発現産物を検出し、レベルを測定し、同定し、又は、測定するステップ、B) 前記ステップにより決定された結果が前記標識遺伝子の発現産物が検出又は増加することを意味する場合には、未分化細胞が発生又は増加していると判定するステップを備える、移植細胞中における未分化細胞残存又は発生の有無のモニタリング方法に関する。なお、これらのモニタリング方法において、「決定された結果が前記標識遺伝子の発現産物が検出又は増加することを意味する」か否かは、上述の未分化細胞の存在、存在量若しくは細胞数の決定方法、又は同定方法に従って決定することができる。

【0054】

3.2 未分化細胞特異的標識/殺傷方法

別の態様において、未分化細胞特異的なプロモーター領域を有する本発明のウイルスベクターは、分化処理後に残存する未分化細胞を特異的に殺傷する方法に用いることができる。

【0055】

具体的には、本発明は、未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターを対象の細胞に感染させるステップ、及び、分化処理後に残存する未分化細胞を殺傷遺伝子により殺傷せしめるステップを備える、分化処理後に残存する又は発生した未分化細胞を殺傷又は除去する方法であってもよい。殺傷遺伝子が薬剤依存性又は誘導性殺傷遺伝子ではない場合

10

20

30

40

50

、対象の細胞は分化誘導後の細胞である。

【0056】

また、殺傷遺伝子として、薬剤依存性殺傷遺伝子（薬剤依存性自殺遺伝子を含む、本明細書全体において同様）を用いる場合、本発明の方法は、薬剤依存性殺傷遺伝子の発現を誘導する薬剤の投与ステップを含む。よって、本発明は、A）標識遺伝子と薬剤依存性殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、未分化細胞特異的プロモーターを含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該薬剤依存性殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター（以下、本明細書において「未分化細胞特異的標識/薬剤依存性殺傷遺伝子発現ベクター」という）を対象の細胞に感染させるステップ、及びB）分化処理後の前記細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与することにより残存する未分化細胞を薬剤依存性殺傷遺伝子により殺傷せしめるステップを備える、幹細胞の分化処理後に残存する又は発生した未分化細胞を殺傷又は除去する方法であってもよい。このように殺傷遺伝子として薬剤依存性殺傷遺伝子を用いる場合、対象の細胞は分化処理前又は分化処理中の幹細胞であってもよいし、分化処理後の細胞であっても良い。

10

【0057】

あるいは、殺傷遺伝子として薬剤依存性殺傷遺伝子を用いる場合、分化処理後に残存する未分化細胞を特異的に殺傷する方法は、既に本発明のウイルスベクターが導入された分化誘導処理後の細胞に対して、未分化細胞特異的に殺傷する薬剤を投与することにより行うこともできる。即ち、本発明は、分化処理された細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/薬剤依存性殺傷遺伝子発現ベクターが導入された細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与することにより残存する未分化細胞を殺傷遺伝子により殺傷せしめるステップを備える、分化処理後に残存する又は発生した未分化細胞を除去する方法であってもよい。

20

【0058】

別の態様において、本発明の方法は、分化誘導処理後に患者の体内に移植した細胞において残存又は発生した未分化細胞を除去する方法であっても良い。即ち、本発明の方法は、A）幹細胞から分化処理された細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/薬剤依存性殺傷遺伝子発現ベクターが導入された細胞（以下、「移植細胞」という）を移植された患者に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、移植細胞中に残存し又は移植細胞中で発生した未分化細胞を殺傷又は除去する方法であってもよい。

30

【0059】

薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤の投与量は、各薬剤依存性殺傷遺伝子の種類に応じて適宜選択することができるが、好ましくは、前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な量であり、より好ましくは、前記薬剤依存性殺傷遺伝子が発現している細胞を殺傷可能な量である。

【0060】

あるいは、殺傷遺伝子として、誘導性殺傷遺伝子を用いる場合、本発明の方法は、誘導性殺傷遺伝子の発現を誘導する薬剤の投与ステップを含む。よって、本発明は、A）標識遺伝子と誘導性殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、未分化細胞特異的プロモーターを含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該薬剤依存性殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター（以下、本明細書において「未分化細胞特異的標識/誘導性殺傷遺伝子発現ベクター」という）を対象の細胞に感染させるステップ、及びB）分化処理後の前記細胞に前記誘導性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な刺激を付加することにより残存する未分化細胞を誘導性殺傷遺伝子により殺傷せしめるステップを備える、幹細胞の分化処理後に残存する又は発生した未分化細胞を殺傷又は除去する方法であってもよい。このように殺傷遺

40

50

伝子として誘導性殺傷遺伝子を用いる場合、対象の細胞は分化処理前又は分化処理中の幹細胞であってもよいし、分化処理後の細胞であっても良い。

【0061】

あるいは、殺傷遺伝子として誘導性殺傷遺伝子を用いる場合、分化処理後に残存する未分化細胞を特異的に殺傷する方法は、既に本発明のウイルスベクターが導入された分化誘導処理後の細胞に対して、未分化細胞特異的に殺傷する薬剤を投与することにより行うこともできる。即ち、本発明は、分化処理された細胞であって、該細胞が未分化細胞特異的標識/誘導性殺傷遺伝子発現ベクターが導入された細胞に前記誘導性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与することにより残存する未分化細胞を殺傷遺伝子により殺傷せしめるステップを備える、分化処理後に残存する又は発生した未分化細胞を除去する方法であ

10

【0062】

前記の各方法(3.1及び3.2に記載の方法、ただし、移植細胞の標識/殺傷方法は除く)は、必要に応じて感染させるステップ(又は、必要に応じて分化処理するステップ)の後に、該細胞を患者の必要な臓器又は組織に移植するステップを含んでよいし、該移植ステップを含まず全ての工程が*in vitro*で行われてもよい。よって、上述において「分化処理された細胞」又は「分化処理後の細胞」は、移植前であってもよいし、移植後であってもよい。移植後に薬剤を投与する場合には、通常の医薬品における薬剤の投与方法に準じて行うことができ、例えば、経口投与形態、又は注射剤、点滴剤等の非経口投与形態で投与することができる。薬剤を哺乳動物等に投与する場合、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等として経口投与してもよいし、又は、注射剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は、移植した細胞の数、組織又は部位、移植からの経過期間、残存し又は発生した未分化細胞の量、患者の年齢、体重及び性別、投与ルート、投与形態、選択した薬剤依存性自殺遺伝子と薬剤の種類等により適宜設定することができ、例えば、通常成人1回当たり50~500mgを1~数回に分けて投与することができる。

20

【0063】

4. 未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法

一態様において、本発明は、本発明のウイルスベクターを用いた、被験プロモーターの未分化細胞における活性を測定する方法に使用することができる。

【0064】

例えば、本発明の方法は、

- A) 未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターのプロモーター領域に被験プロモーターを組み替えて被験プロモーターを有するウイルスベクターを作製するステップ、
- B) 被験プロモーターを有するウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
- C) 分化誘導処理後の前記細胞における前記標識遺伝子の発現を検出するステップ、
- D) 分化誘導処理後の前記細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップ、及び
- E) 被験プロモーターが未分化細胞に特異的であるか否かを判定するステップを備える、未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法であって、

ここで、該判定が、未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が高く、かつ、分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が低い場合、該被験プロモーターは未分化細胞に特異的であると判定することにより行われる方法に関する。

40

【0065】

前記スクリーニング方法は、例えば、以下の方法であってもよい：

- A) 未分化細胞特異的標識/殺傷遺伝子発現ベクターのプロモーター部分に被験プロモーターを組み替えて被験プロモーターを有するウイルスベクターを作製するステップ、
- B) 被験プロモーターを有するウイルスベクターを未分化細胞(例えば、ES細胞又はiPS細胞)に感染させるステップ、
- C) 前記未分化細胞を分化させるステップ、

50

- D) 分化誘導処理後の各細胞における前記標識遺伝子の発現を検出するステップ、
 E) 分化誘導処理後の各細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップ、及び
 F) 被験プロモーターが未分化細胞に特異的であるか否かを判定するステップを備える、未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法であって、

ここで、該判定が、未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が高く、かつ、分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が低い場合、該被験プロモーターは未分化細胞に特異的であると判定することにより行われる方法に関する。

【0066】

前記方法において、分化誘導処理後の各細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップは、アルカリフォスファターゼ染色、SSEA3染色、SSEA4染色、Tra-1-60染色、及び/又はTra-1-81染色に陽性を示す細胞；Oct3/4、Nanog、Sox2、Cripto、Dax1、Eras、Fgf4、Esg1、Rex1、zfp296、UTF1、GDF3、Sal14、Tbx3、Tcf3、DNMT3L、及び/又はDNMT3B遺伝子を発現している細胞；miR-290、及び/又はmiR-302を発現している細胞を未分化細胞とし、該染色に陰性を示す細胞又は該遺伝子を発現していない細胞を分化細胞として識別することにより行うことができる。

【0067】

本発明のスクリーニング方法において、未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される「割合が高く」分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される「割合が低い」か否かは、分化細胞と未分化細胞における前期標識遺伝子の発現レベルを比較し、未分化細胞における前期標識遺伝子の発現レベルが分化細胞における前期標識遺伝子の発現レベルよりも高いことを意味する。具体的には、未分化細胞における前期標識遺伝子の発現レベルが分化細胞における前期標識遺伝子の発現レベルよりも統計学的有意差をもって高い場合に、未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される「割合が高く」分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される「割合が低い」と判定することができる。

【0068】

5. 本発明のベクターの感染

上述の本発明の方法において、本発明のウイルスベクターは分化処理前又は分化処理中の幹細胞（例えば、ES細胞又はiPS細胞等の多能性幹細胞）、あるいは分化処理後の細胞に感染させることができる。本発明のベクターの細胞毒性が薬剤依存性である場合、プロモーター活性を発揮する細胞であっても薬剤不添加の条件下では本発明のベクターが細胞毒性を発揮することはない。そのため、導入ベクターの細胞毒性による分化処理前の幹細胞への障害を理由として分化処理ステップと感染ステップの前後関係が制限されることない。よって、本発明のベクターのこのような特徴は、全ての対象の細胞への感染を確実にするために最適なタイミングで感染の時期を選択することを可能とする。例えば、感染は、*in vitro*で分化処理の前に行われる。あるいは、本発明のウイルスベクターは、幹細胞の分化処理後に感染させてもよい。好ましくは、本発明のウイルスベクターは、分化処理前に感染させる。また、本発明の方法が移植ステップを含む場合、全ての対象の細胞への感染を確実にするため、感染は移植の前に行われる。感染は、使用するウイルスベクターの種類及び性質に応じて、適宜ウイルスベクター数や感染期間を選択し、当業者周知の方法を用いて実施することができる。例えば、感染はMOI1～1000の範囲で行うことができ、好ましくは、MOI10～100の範囲で行うことができる。

【0069】

6. 分化処理ステップ

よって、例えば、本発明の方法は、標識遺伝子と薬剤依存性自殺遺伝子とが2A配列を

10

20

30

40

50

介して結合した核酸配列、及び、未分化細胞特異的プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該薬剤依存性自殺遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクターを未分化細胞（例えば、ES細胞又はiPS細胞等の多能性幹細胞）に感染させることにより行われる感染ステップの前、後、又は該感染ステップと同時に、更に、前記未分化細胞を分化細胞へと誘導させるステップ（分化処理ステップ）を含んでいてもよい。細胞の分化誘導処理は、未分化細胞に分化誘導のための分化誘導物質を接触させ、適切な培養条件により培養することにより行うことができる。分化誘導処理のための各種培養条件、及び培養方法が報告されており、使用する細胞及び分化させようとする細胞の種類に応じて適宜選択することができる。

10

【0070】

7. 標識遺伝子の検出、同定、測定

前記標識遺伝子の発現産物の検出、同定、又はレベルの測定方法は、使用する標識遺伝子に応じて適宜選択することができる。例えば、蛍光遺伝子を使用する場合、発現産物の検出は、蛍光検出装置、フローサイトメトリー、又はリアルタイム蛍光検出装置等を用いて実施することができる。

【0071】

以下、本発明をより詳細に説明するため実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

20

【実施例】

【0072】

(実施例1) レンチウイルスベクタープラスミドの作製

(1) レンチウイルスベクタープラスミドの設計

作成するベクターの概略図を図1に示す。ベクターの基盤としてレンチウイルスベクターを使用し、プロモーター部分に以下のようなリコンビネーションカセット(RC)を用いた。これはファージが大腸菌染色体へ侵入する際に関与する部位特異的組換えシステムを利用し、ベクター間で改変したatt配列に挟まれたDNA配列の交換反応を行う(James, L.ら(2000) Genome Res. 10: 1788-1795)。RC部分は組換え時に特異的に相互作用するDNA配列(att R配列)が両端にあり、その間にクロラムフェニコール耐性遺伝子(CMR)と大腸菌自殺遺伝子であるcdBを有する。RCをプロモーター部位に挿入したレンチウイルスベクターと、様々なプロモーター配列をRCのatt R配列に対応するatt L配列間にクローニングした遺伝子組み換え用シャトルベクタープラスミドを作製した(図1及び図2A)。レンチウイルスベクターのatt R配列とシャトルベクターのatt L配列とを反応させるLR clonaseを使用することにより、レンチウイルスベクターにプロモーター配列を組換えることを可能とした(図2B)。これにより、様々なプロモーターを簡便に入れ替えることができ、各種プロモーターの未分化細胞/腫瘍化細胞における活性について検証を行うことを可能とした。

30

【0073】

40

(2) 蛍光タンパク質-2A-自殺遺伝子

プロモーター部分の下流に目的細胞への遺伝子導入を可視化するための蛍光タンパク質(図3及び8)と、遺伝子が導入された細胞を薬剤により選択的に殺傷可能とするための自殺遺伝子(図5及び8)とを組み合わせた遺伝子カセットを挿入した(図1及び7-9)。

【0074】

蛍光タンパク質としては、近赤外蛍光タンパク質であるTAGFP635の100倍程度の蛍光強度を持つmKate2、及び発光クラゲに由来する緑色蛍光タンパク質であるGreen Fluorescent Protein(GFP)の発光効率などが改良されたVenusの2種類を使用し、目的に応じて使い分けられるようにした。

50

【0075】

自殺遺伝子としては、以下の3種類を使用した。

(I) HSV - tk

HSV - tkはGCVに感受性があり、自殺遺伝子として働くことが報告されている (Yasuhira TERAZAKIら (2003) Hepatology 37: 155 - 63)。HSV - tk発現細胞をGCVを含む培地で培養すると、GCVはHSV - tkによりリン酸化され、さらにヒト細胞内の内在性キナーゼによりリン酸化され、最終的に強い毒性を有するガンシクロビル三リン酸 (GCV - 3P) となり、GCV - 3PはDNA合成を阻害するためHSV - tk遺伝子導入細胞が死滅する。一方、HSV - tkを発現しない細胞ではGCVはGCV - 3Pに変換されないため毒性を示さない。さらにこのシステムの長所として、上記のようにGCV - 3Pの細胞殺傷作用はDNA合成阻害であるため、多くの正常細胞は体内では細胞分裂はしていないか限定的であるため、例えば正常細胞にHSV - tkが導入されて発現しても細胞障害は無いか軽微であり、異常に恒常的な細胞分裂が起こっている腫瘍細胞を優位に特異的に殺傷していくという、高度な腫瘍選択制が上げられる。よってHSV - tk遺伝子を腫瘍特異的プロモーター、あるいは未分化特異的プロモーターで発現させた場合、そのプロモーターの特異性とHSV - tk / GCV自体の特異性という二重の特異性により、非常に高度な腫瘍細胞や幹細胞の未分化細胞に対する特異性を保持させることが期待できる。またHSV - tkのもう一つの利点として腫瘍細胞に対してはバイスタンダード効果という、HSV - tk遺伝子が導入されていない周辺の腫瘍細胞の多くも殺傷されるという強力な腫瘍治療効果がよく知られている。従って、HSV - tkとGCVとの組み合わせにより、細胞分裂が旺盛な細胞 (腫瘍細胞や幹細胞の未分化細胞など) 選択的に殺傷作用を強力に引き起こすことができる。

10

20

【0076】

(II) human - tmpk / AZT

HSV - tkは非常に高い殺傷効果を有するが、単純ヘルペス由来であるためヒトの体内において免疫応答が起こり、細胞内に導入された遺伝子を排除するという問題も推察される。そこで、ヒト由来の酵素Thymidylate Kinase (tmpk) と3' - azido - 3' - deoxythymidine (AZT) とを組み合わせる方法についても検討を行った。プロドラッグであるAZTは、リン酸化されてAZT三リン酸 (AZT - 3P) に変換される。AZT - 3Pはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製や、真核生物のDNAの合成を阻害する (Fei CHENら (2013) Biomaterials 34: 1701 - 11)。AZTから毒性を持つAZT - 3Pへの転換における律速酵素は、AZT - リン酸 (AZT - MP) からAZT二リン酸 (AZT - DP) への変換を触媒する細胞性Thymidylate Kinase (tmpk) である。tmpkの酵素効率は低い、最小限に遺伝子改変を加えてAZT - MPへの作用が200倍であるtmpk (F105Y) が報告されている (13; 14)。本実験においては、この遺伝子改良型tmpkを使用した。またtmpkは自殺遺伝子としての上記のHSV - tkに記載した長所は全て保持していると思われ、さらなる長所として、さらに高い腫瘍細胞や未分化細胞の殺傷効果と、異種蛋白由来の免疫誘導がない、ということが考えられる。但しtmpkを幹細胞に応用した報告は、当該発明のベクターシステムに限らずこれまで全くない。

30

40

【0077】

(III) iCaspase9 / Dimeriser

上述の2遺伝子と異なり、アポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こす遺伝子である。Caspaseはアポトーシスのシグナル伝達を構成している。ミトコンドリアからのカパーゼ経路の初期に関わるCaspase - 9は、通常AKTなどによりリン酸化され不活性化された状態にある。ミトコンドリアからの刺激により不活性化型のCaspase - 9が活性化され、Caspase - 3やCaspase - 7を活性化することでアポトーシスを引き起こす。Caspase - 9の活性化を任意のタイミングで制御する

50

ため、薬剤誘導性の Caspase - 9 の活性化システムを用いた。これは Caspase - 9 遺伝子とヒト FK506 結合蛋白 (FKBP) 蛋白遺伝子の融合タンパク質である iCaspase9 (iCasp9) を目的細胞に遺伝子導入・発現させた後、FKBP と結合する細胞膜透過性低分子化合物である AP20187 (クロンテック社) を培地に添加して、Caspase - 9 二量体を形成させ、活性化させることによりアポトーシスを誘導し、細胞死を引き起こすことができる (Carlos A Ramos ら (2010) Stem Cells 28:1107-15)。

【0078】

(3) HSV-tk 又は human-tmpk を有するレンチウイルスベクタープラスミドの構築

10

プラスミドの構築は、以下に詳細を示すように 2 段階に分けて行った。即ち、リコンビネーションカセット (RC) を挿入したレンチウイルスベクターの作製 (図 1A) と、蛍光タンパク質 - 2A - 自殺遺伝子カセットの作製 (図 1B) とを行い、これを最終的に組み合わせてレンチウイルスベクタープラスミドとした (図 1C)。

【0079】

(3-1) pLenti6-RC-BIs の作製

レンチウイルスベクタープラスミドである pLenti6-V5-RC-LacZ (Invitrogen 社) を MluI サイトで切断し、V5-LacZ 領域を除去したものを基本のベクタープラスミドとした。制限酵素で切断した後に平滑末端化を行い、Gateway (登録商標) プラスミド (Invitrogen 社) からリコンビネーションカセット部分を挿入して、pLenti6-RC-BIs を構築した (図 2)。このカセット部位にリコンビネーション反応を用いて種々のプロモーター配列を挿入することができる。

20

【0080】

(3-2) 蛍光タンパク質 - 2A - 自殺遺伝子 (HSVtk / human-tmpk) カセットの作製

上述において作製した pLenti6-RC-BIs の RC カセットの下流に挿入するための遺伝子カセットを以下の方法により作製した。遺伝子カセットは、蛍光タンパク質と自殺遺伝子が 2A 配列を介して結合されたものとした。

【0081】

30

(A) 蛍光タンパク質 - 2A

赤色蛍光タンパク質 mKate2 及び緑色蛍光タンパク質 Venus の 2 種類を使用した。mKate2 は、5' 側に AgeI、3' 側に BglII サイトを付加したプライマーを設計し (表 1)、PCR 法により増幅した後、PCR 産物クローニング用ベクターである pGEM-Teasy vector (Invitrogen 社) にクローニングして pGEM-Teasy-mKate2 を構築した (図 3A)。クローニング後、pGEM-Teasy vector 内のクローニング部位の両端にあるプライマー配列より、5' 側の T7 及び 3' 側の M13R を用いてシーケンス解析を行った。次に、pGEM-Teasy-mKate2 から、NotI / BglII で mKate2 を切り出した (図 4A)。5' 側に BglII、3' 側に BamHI サイトの突出末端を持つ合成二本鎖 2A 配列 DNA オリゴを BglII / BamHI で切断した pFlag-CMV-2 (SIGMA) へ挿入した pFlag-CMV-2A を構築し、この pFlag-CMV-2A も同様に NotI / BglII で切断し、CMV プロモーターと 2A 配列の間に mKate2 を挿入して pFlag-CMV-mKate2-2A を構築した (図 4A)。

40

【0082】

Venus も同様に 5' 側に NotI、3' 側に BamHI サイトを付加したプライマーを設計して (表 1)、PCR 法により増幅した後、pGEM-Teasy vector にクローニングして pGEM-Teasy-Venus を構築した。クローニング後、前記プライマーを用いてシーケンス解析を行った。次に、pGEM-Teasy-Venus から、NotI / BamHI サイトで Venus を切り出し (図 4B)、mKate

50

e 2と同様に p F l a g - C M V - 2 A に挿入して p F l a g - C M V - V e n u s - 2 A を構築した (図 4 B) 。

【 0 0 8 3 】

(B) 自殺遺伝子 (H S V - t k 、 h u m a n - t m p k)

H S V - t k は、プライマーを作製して (表 1) 、 P C R 法により増幅した後、クローニング用ベクターである p G E M - T e a s y v e c t o r にクローニングして p G E M - T e a s y - H S V - t k を構築した (図 3) 。クローニング後、m K a t e 2 、 V e n u s と同様に前記プライマーでシーケンス解析を行った。次に、p G E M - T e a s y - H S V t k を、H S V - t k の 3 ' 側の S P E I で切断した後、平滑末端化し、H S V - t k の 5 ' 側の B a m H I で切断して H S V - t k を得た (図 5 A) 。

10

【 0 0 8 4 】

h u m a n - t m p k は、H S V - t k と同様にプライマーを作製して (表 1) 、 P C R 法により増幅した後、p G E M - T e a s y v e c t o r にクローニングして p G E M - T e a s y - h u m a n - t m p k を構築した (図 3 D) 。クローニング後、m K a t e 2 - V e n u s と同様に前記プライマーを用いてシーケンス解析を行った。次に、p G E M - T e a s y - h u m a n - t m p k から、5 ' 側の B a m H I と 3 ' 側の S m a I (b l u n t e n d) で切断することにより、h u m a n - t m p k を得た (図 5 A) 。

【 0 0 8 5 】

【 表 1 】

20

Table1

Primer名	配列
mKate2-F-Age I	ACCGGTCACCATGGTGAGGGAGCTGATT
mKate2-R-Bgl II	AGATCTTCTGTGCCCCAGTTTGCTAGGG
Venus-F-Age I	ACCGGTCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Venus-R-BamHI	GGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
HSVtk-F-BamHI	GGATCCATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAA
HSVtk-R-Pme I	GTTTAAACTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCC
HumanTK-F-BamHI	GGATCCATGGCGGCCCGGCGGGGCTCTC
HumanTK-R-Kpn I-Sma I	CCCGGGTACCTCACTTCCATAGCTCCCC

30

【 0 0 8 6 】

(C) 蛍光タンパク質 - 2 A + 自殺遺伝子

(B) で得られた遺伝子断片を (A) で作製したプラスミドに挿入し、蛍光タンパク質 - 2 A - 自殺遺伝子の発現カセットを持つベクタープラスミドの作製を行った。

40

p F l a g - C M V - m K a t e 2 - 2 A 及び p F l a g - C M V - V e n u s - 2 A は、3 ' 側 B s t X I で切断した後、平滑末端化し、5 ' 側を B a m H I で切断して切り出した (図 5 B) 。(B) で得られた H S V - t k 又は h u m a n - t m p k を 2 A の 3 ' 側へ挿入し、4種類のプラスミド、p F l a g - C M V - m K a t e 2 - 2 A - H S V t k 、 p F l a g - C M V - m K a t e 2 - 2 A - t m p k 、 p F l a g - C M V - V e n u s - 2 A - H S V t k 、 及び p F l a g - C M V - V e n u s - 2 A - t m p k を構築した。

【 0 0 8 7 】

(3 - 3) p L e n t i 6 - R C - B I s + 蛍光タンパク質 - 2 A - 自殺遺伝子のプラス

50

ミド作製

上述のとおり作製したRCカセットを持つpLenti6-RC-BISに、上述のとおり作製した蛍光タンパク質-2A-自殺遺伝子の発現カセットを挿入し、モニターベクタープラスミドを完成させた。

pLenti6-RC-BISを3'側KpnIで切断した。human-tmpkを持つplasmidとのライゲーション用に、5'側をAgeIで切断した(図6A)。また、HSV-tkを有する2種類のプラスミドとのライゲーションに使用するために、3'側をKpnIで切断後、平滑末端化を行い、5'側をAgeIで切断した(図7A)。

また、pFlag-CMV-mKate2-2A-tmpk、及びpFlag-CMV-Venus-2A-tmpkは、5'側をAgeI、3'側をKpnIで切断し、それぞれ、mKate2-2A-tmpk、及びVenus-2A-tmpk部分を切り出した(図6B)。HSVtkは内部にKpnI切断サイトを持つため、pFlag-CMV-mKate2-2A-HSVtk、及びpFlag-CMV-Venus-2A-HSVtkは5'側をAgeI、3'側をPmeI(プラントエンド)で切断し、それぞれ、mKate2-2A-HSVtk、及びVenus-2A-HSVtkを切り出した(図7B)。

これらをそれぞれ組み合わせてライゲーションすることにより、pLenti-RC-mKate2-2A-tmpk、pLenti-RC-Venus-2A-tmpk、pLenti-RC-mKate2-2A-HSVtk、及び、pLenti-RC-Venus-2A-HSVtkを作製した。

【0088】

(4) iCaspase9を有するレンチウイルスベクタープラスミド(pLenti6-iCaspase9-2A-蛍光タンパク質)の構築

induced-Caspase9(iCasp9-2Aの配列を持つプラスミド(Brenner博士から譲渡)から、iCasp9-2Aの領域をサブクローニングし、In-Fusion(登録商標)HD Cloning KIT(TAKARA BIO社)を用いてプラスミドを構築した。本KITはPCRで調整したDNA断片や線状化したベクターを、各DNA断片末端の相同な15塩基を正確に認識してクローニングすることができ、複数のDNA断片をあらゆるベクターへ迅速にクローニングできる(Zhu Bら(2007)Biotechniques. 43(3):354-9)。そこで、記述のpLenti6-RC-BISのRCの下流にiCasp9-2A-Venus又はiCasp9-2A-mKate2を挿入するため、iCasp9-2Aの前後、及びVenusとmKate2の前後にそれぞれお150bpのプライマーを設計し、PCRを行った(図8、表2)。

その後、pLenti6-RC-BIS、iCasp9-2AのDNA配列と、Venus又はmKate2を混合して酵素反応させることにより、2種類のプラスミド、pLenti6-RC-iCasp9-2A-Venus、及びpLenti6-RC-iCasp9-2A-mKate2を完成させた。

【0089】

10

20

30

40

【表 2】

Table2

Primer名	配列
InFusion_iCasp-F-Agel	ttctacgcgtaccggTGCCATGCTCGAGGGAGTGC
InFusion_iCasp-2A-R	GGGCCCCGGGATTTTCCTCCACG
InFusion_Vesus-F	gaaaatcccggggcccATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
InFusion_Vesus-R-KpnI	tggtcttaaaggtagCTTACTTGTACAGCTCGTCC
InFusion_mKate2-F	gaaaatcccggggcccATGGTGAGCGAGCTGATTAAG
InFusion_mKate2-R-KpnI	tggtcttaaaggtagCTCATCTGTGCCCCAGTTTGC

10

【0090】

20

(5) プラスミドの機能確認

蛍光タンパク質 - 2A - 自殺遺伝子の発現カセットを持つプラスミドは、作成の各段階で HEK293 細胞に導入して評価することにより、蛍光の発現確認を行った。HEK293 細胞は 6 ウェルプレートに 6×10^5 細胞/ウェルで播種し、翌日にプラスミドを 2 mg/ウェルで、Polyfect Transfection Reagent Kit (QIAGEN 社) を用いて製造者提供のプロトコルに従って遺伝子導入を行った。遺伝子導入の 48 時間後に蛍光顕微鏡で蛍光の発現を確認した。

【0091】

(6) 結果

pFlag - CMV - mKate2 - 2, pFlag - CMV - Venus - 2A を HEK293 細胞に導入し、蛍光タンパク質の発現について評価を行った結果、恒常性プロモーターである CMV の制御下で、mKate2 及び Venus が正常に発現することが確認された (図 9)。また、pFlag - CMV - mKate2 - 2A - HSVtk、pFlag - CMV - Venus - 2A - HSVtk、pFlag - CMV - mKate2 - 2A - Human tmpk、及び pFlag - CMV - Venus - 2A - Human tmpk についても同様に HEK293 細胞に導入し、蛍光タンパク質及び自殺遺伝子の発現について評価を行った結果、mKate2 及び Venus が正常に発現することが確認された (図 10A 及び図 10C)。また、自殺遺伝子は各遺伝子に対応する薬剤を加えたところ、薬剤の濃度依存的に細胞傷害効果がみられた (図 10A ~ D)。

30

【0092】

40

(実施例 2) ヒト培養細胞における自殺遺伝子の細胞毒性効果の検証

ヒト培養細胞における自殺遺伝子の細胞毒性効果を検証するため、HSV - tk、human - tmpk、及び iCaspase 9 の 3 種類の自殺遺伝子を発現するウイルスベクターを細胞に感染させた後、それぞれに対応する薬剤を加えて各細胞に対する毒性効果を比較した。HSV - tk は既に作製済みのアデノウイルスベクターを使用した (Yasuhiro Terazaki ら (2003) Hepatology 37; 155 - 63)。human - tmpk 及び iCaspase 9 は、それぞれ、Medin 博士に譲渡頂いたプラスミド pHR' - cPPT - EF - tmpk (F105Y) (Takeya Sato ら (2007) Mol Ther 15: 962 - 70)、及び brenner 博士に譲渡頂いたプラスミド iCasp9 - 2A - DCD19RRF (CARLOS

50

A RAMOSら(2010)STEM Cells 28;1107-15)を使用した。これらのプラスミドを直接細胞に導入し、又はレンチウイルスベクターを産生して使用した。

【0093】

(1)細胞培養

ヒトiPS細胞として、ヒト成人繊維芽細胞(HDF)由来で、OCT3/4、KLF4、SOX2及びc-Mycの4因子を導入して樹立された201B7、及びHDF由来でc-Myc以外の3因子を導入して樹立された253G1を使用した。また、マウスES細胞としてD3細胞を使用した。ヒトES細胞は、KhES1(京都大学より譲渡)を使用した。また、ヒト正常繊維芽細胞(BJ)、ヒト癌細胞(ヒトTリンパ腫細胞株Jurkat、ヒト胃癌細胞MKN45)を使用した。ヒトiPS/ES細胞はマイトマイシンC処理したマウス胎仔繊維芽細胞(MEF)上で共培養した。マウスES細胞はゼラチンコートしたディッシュ上で培養した。各細胞の培養に使用した培地は以下のとおりである：

(ヒトiPS/ES細胞)

20% KSR(Invitrogen社)、200mM L-Glutamine、0.1mM Non Essential Amino Acid(Sigma社)、0.1mM 2-Mercaptoethanol(Sigma社)、5ng/mL Basic-Fgf(Wako社)、Penicillin/Streptomycin(P/S)(Nacalai Tesque)含有 DMEM-F12(Sigma社)

(マウスES細胞)

20% Fetal Bovine Serum(FBS)(GIBCO社)、0.1mM Non Essential Amino Acid、1mM Sodium Pyruvate(Gibco社)、70µM 2-Mercaptoethanol、 1×10^3 unit/mL LIF mouse recombinant(ナカライ社)、P/S含有 DMEM(SIGMA社)

(Jurkat細胞及び MKN45細胞)

10% FBS(Bio West社)及びP/S含有 RPMI-1640(SIGMA社)

(BJ細胞)

10% FCS、200mM L-Glutamine(Gibco社)、0.1mM Non Essential Amino Acid、1mM Sodium Pyruvate、P/S含有 Minimum Essential Medium Eagle(Sigma社)

【0094】

ウイルス感染実験に用いる未分化ヒトiPS、ES細胞は、無フィーダー分散培養を行った。無フィーダー分散培養に用いるConditional Medium(CM)としては、マイトマイシンC処理を施したMEF(1.5×10^6 細胞/10CMディッシュ)の培地を、ヒトES細胞用培地(BFGF-)に置き換えて37のインキュベーター内で一晚培養した後、その上清を使用した。

KhES1は、ROCK阻害剤(Y27632、WAKO社)を用いて、単一分散培養を無フィーダー下で行い、ウイルス感染実験に用いた。24ウェルプレートに無血清培地(DMEM-F12)で40倍に希釈したgrowth Factor Reduced BD Matrigel(BD Bioscience社)を加え、37のCO₂インキュベーター内で1時間以上静置し、マトリゲルコート処理を行った。6CMディッシュのKhES1の培地を新しい培地2mLに交換し、最終濃度が10mmとなるようにY27632を加え、37のCO₂インキュベーターにて1時間以上培養した。Y27632処理ヒトES細胞を2mLのPBSで洗浄し、ヒトES細胞用解離液(CTK)を0.4mL加え、37で5分静置した後、10mm Y27632含有ヒトES細胞用培地を2mL加えてピペティングにより細胞塊を単一細胞に分散させた。細胞数をカウ

10

20

30

40

50

トし、必要量のK h E S 1を遠心(1000rpm、5分)して、CMに懸濁させ、マトリゲルコート処理したプレートに播種した。

【0095】

(2) レンチウイルスの産生

レンチウイルスベクターとして、PHR - CPPT - EF - tmpk (human - tmpk発現用)、iCasp9 . 2A . DCD19 . RRF (iCasp9発現用)、及びCMV - EGFPを使用した。PHR - CPPT - EF - tmpk、及びiCasp9 . 2A . DCD19 . RRFは自殺遺伝子と同時にCD19を発現することから、各自殺遺伝子の発現は抗CD19抗体により確認することができる。CMV - EGFPは、レンチウイルスベクターの力価確認のために用いた。

POLY - L - LYSINE (SIGMA社)でコートした6ウェルプレートにHEK293T細胞を 6×10^5 細胞/ウェルで播種した。翌日、各レンチベクタープラスミド0.5mgにPLP1, PLP2、及びPLP - VSVGを混合し、50mLのOPTI - MEMを添加した後、FUGENE HD (PROMEGA社)を6mL加え、vortexした後、室温で15分静置した。この全量を1ウェルに添加してトランスフェクションし、24時間後に培地を10%FCS/DMEM, P/S(-)と交換し、48及び72時間後の2回、上清を回収した(6ウェルプレート各2mL x 4ウェルで2回収、合計16mL)。これをLenti - X Concentrator Kit (Clontech社)を用いて製造者提供のプロトコルに従い、100倍に濃縮した。

10

【0096】

20

(3) レンチウイルスの感染

感染前日に、各細胞を以下の細胞数で24ウェルプレートに播種した：

K h E S 1細胞	4×10^4 細胞/ウェル
Jurkat細胞	1.25×10^5 細胞/ウェル
MKN45細胞	2×10^4 細胞/ウェル
HEK293T細胞	5×10^4 細胞/ウェル

ウイルス感染当日、4mg/mLのポリブレンを含む培地に交換し、各レンチウイルスベクターを20mL添加して24時間感染させた。全ての細胞の培地を24時間後に交換し、更に培養を続けた。EGFP発現レンチウイルスベクターを感染させた細胞は、感染72時間後にフローサイトメーター(Cyan Adp Analyzer、ベックマンコールター社)で評価し、産生したウイルスベクターの力価を計算した。

30

【0097】

(4) フローサイトメトリー分析(FACS)によるCD19発現細胞の分取

human - tmpk発現レンチウイルスベクターを感染させた細胞について、FACSARIA II (BD社)を使用して感染細胞(CD19陽性細胞)を分取した。

K h E S 1は、10mm Y27632を含む培地で一晚培養したK h E S 1をCTKで処理した後、単一細胞へと分散させた。細胞数をカウントした後、必要量の細胞を遠心(1000rpm、5分)し、10mm Y27632含有PBSに再懸濁させた。未分化細胞標識抗体である、Alexa Fluor 488 anti - Human SSEA4 (BIOLEGEN社)及びanti - Human CD19 - APC (EBIOSCIENCE社)を、細胞懸濁液100mL(1×10^6 細胞)あたり5mL加え、氷上で10分毎に細胞を懸濁しながら30分間静置して細胞のラベリングを行った。10mm Y27632含有PBSで1回洗浄後、10mm Y27632含有ES用培地に懸濁させ、両抗体に標識されたK h E S 1を未分化なCD19陽性細胞としてフローサイトメーターで評価した。

40

Jurkat、MKN45については、細胞数のカウント後、必要量の細胞を遠心(1000rpm、5分)し、10%FCS含有PBSに再懸濁させた。細胞懸濁液100mL(1×10^6 細胞)あたり5mLのanti - Human CD19 - APC (EBIOSCIENCE社)を加え、氷上で10分毎に細胞を懸濁しながら30分間静置して細胞のラベリングを行った。10%FCS含有PBSで1回洗浄後、10%FCS含有PB

50

Sに懸濁し、標識されたJurkat、及びMKN45をCD19陽性細胞としてフローサイトメーターで評価した。

フローサイトメーターでCD19陽性細胞を確認後、細胞を増やし、再び上記プロトコルに従って抗体で標識した後、BD FACSAria IIにより陽性細胞の分取を行った。KHES1は、SSEA4及びCD19両陽性な細胞を、Jurkat及びMKN45はCD19陽性細胞を分取した。分取した細胞は直ちに遠心(1000rpm、5分)し、新しい培地に再懸濁させ、KHES1についてはMEF細胞と共培養を行った。Jurkat、MKN45については、通常培養を行った。

【0098】

(5) in vitroにおける細胞毒性効果の検証

各細胞における自殺遺伝子の細胞毒性を評価するため、HSV-tk、human-tmpk、及びiCaspase9を細胞に導入し、薬剤を加えて細胞の殺傷効果を比較検討した。HSV-tkについては、既に作製済みのHSV-tkアデノウイルス(Ad.CAG-HSV-tk)を用いた。human-tmpk、及びiCasp9は、プラスミドを細胞に導入した。各細胞を以下の細胞数で24ウェルプレートに播種した：

KHES1細胞	4 × 10 ⁴ 細胞/ウェル
MKN45細胞	2 × 10 ⁴ 細胞/ウェル (tmpk、iCasp9のみ)
BJ細胞	1 × 10 ⁴ 細胞/ウェル

翌日、Ad.CAG-HSV-tkをMOI = 10で感染させ、24時間後に培地交換した後、GCV(10mg/mL)を10mL、4日間投与した。human-tmpk、及びiCasp9は、各プラスミド0.5mgをOPTI-MEM25mLに加え、FUGENE HD(QIAGEN社)2mLを添加して、voltexした後、15分静置したものを全量投与した。24時間後に培地交換した後、human-tmpk導入細胞にはAZTを0, 30, 100, 300nmで各ウェルに3日間投与した。iCasp3にはDimerizerを0, 0.03, 0.1, 0.3nmで各ウェルに3日間投与した。薬剤投与後、細胞毒性効果の測定は生細胞数の測定により行った。測定当日、KHES1はCTK処理し、単一細胞へと分離した後、10mLを採取した。Jurkatは細胞懸濁後10mLを採取し、MKN45はトリプシンで処理し、細胞懸濁後10mLを採取した。採取した細胞懸濁液のそれぞれにトリパンブルー10mLを加え、生細胞数をカウントした。

【0099】

また、human-tmpkについては、レンチウイルスベクターを感染させ、CD19を指標として分取した恒常発現細胞を用いて同様の実験を行った。細胞は次の細胞数で24ウェルプレートに播種した：

Jurkat-tmpk/NC	1 × 10 ⁵ 細胞/ウェル
MKN45細胞-tmpk/NC	2 × 10 ⁴ 細胞/ウェル

翌日よりAZTを0, 0.1, 1, 10, 100, 1000nmで各ウェルに3日間投与し、上述の方法で生細胞数をカウントした。

【0100】

(6) 結果

コントロールであるAd.CAG-HSV-tk感染KHES1細胞は、GCV投与により傷害を受けた一方、GCV非投与ではそのような傷害は受けていなかった(図11A)。BJでは、GCV非投与で障害がみられず、GCV投与による細胞障害はKHES1と比較してわずかであった(図11B)。

pHR-CPPT-EF-tmpk(F105Y)導入KHES1では、低濃度のAZT投与でも細胞傷害効果がみられ、アデノウイルスベクターで導入したHSV-tk(図11A)とほぼ同様の殺傷効果を示した(図12A)。AZT高濃度投与ではhuman-tmpk非導入細胞でも細胞傷害が観察された。BJでは、human-tmpk導入/非導入細胞間で細胞傷害に差は見られなかった(図12B)。MKN45では、未分化細胞同様、AZT投与により低濃度でも細胞傷害効果がみられ、高濃度ではhuman-

10

20

30

40

50

tmpk非導入細胞でも細胞傷害が確認された(図12C)。しかし、iCasp9.2A.DCD19.RRFを導入したKHE51、BJ、及びMKN45については、いずれもほとんど変化が見られなかった。

【0101】

プラスミドによる一過性の発現で薬剤感受性に効果がみられたhuman-tmpkについて、恒常発現株を作製し、更に解析を行った。PHR-CPPT-EF-tmpk(F105Y)からhuman-tmpkとCD19とを発現するレンチウイルスベクターを産生し、細胞に感染させ、CD19陽性を指標に分取した。KHE51、Jurkat、及びMKN45細胞を分取、増殖後、再度抗CD19抗体を用いてフローサイトメーターで解析したところ、分取前と比較して高い割合でCD19陽性細胞が存在することが確認された(図14A~C)。これらの感染細胞にAZTを投与したところ、Jurkatでは薬剤依存的に細胞傷害効果が増強する傾向がみられ、高濃度になるとhuman-tmpk非導入細胞でも細胞障害が確認された(図15A及びC)。MKN45では、Jurkatに比べ、濃度依存的な殺傷効果はみられず、高濃度ではhuman-tmpk非導入細胞でも細胞障害が起きていた(図15B及びC)。

10

【0102】

(実施例3)作製したレンチウイルスベクタープラスミドを用いたヒト培養細胞における自殺遺伝子の細胞毒性効果の検証

ヒト培養細胞における自殺遺伝子の細胞毒性効果を検証するため、まず実施例1で作成したRCを含むレンチウイルスベクタープラスミドに、リコンビネーションにより各種プロモーターを挿入してプラスミドを完成させた。これらのプラスミドよりレンチウイルスベクターを産生し、細胞に感染させた後、それぞれに対応する薬剤を加えて各細胞に対する毒性効果を比較した。

20

【0103】

(1)シャトルベクタープラスミドへのプロモーターのサブクローニング

各種プロモーターをpENTR-vector(LIFE TECHNOLOGIES社)に挿入したものを作製した(図15)。pENTR-vectorはattL配列を含んでおり、LR-clonaseでpLenti6-RCと反応させることにより、プロモーターをRC内に組み込むためのシャトルベクターとして使用する。サブクローニングするプロモーターには、未分化特異的プロモーターの候補として、survivin, tert, Rex1, Nanogを、またコントロールとして恒常性プロモーターのCAG, PGKを使用し、それぞれ以下の方法でpENTR-vectorに挿入した。

30

(A) survivinプロモーター

既に作製済みであったpGEMT-easy-survivinより、survivinプロモーター部分をNotIにより切り出し、pENTR-vectorにクローニングしてpENTR-survivinを構築した(図15A)

(B) tertプロモーター

既に作製済みであったpGEMT-easy-tertより、tertプロモーター部分をMluI/BglIIにより切り出し、pENTR-vectorにクローニングしてpENTR-Tertを構築した(図15B)

40

(C) Rex1プロモーター

既に作製済みであったpGEMT-easy-Rex1より、Rex1プロモーター部分をMunI/NheIにより切り出し、pENTR-vectorにクローニングしてpENTR-Rex1を構築した(図15C)

(D) Nanogプロモーター

Nanogプロモーター領域の3'側、及び5'側にpENTR-vectorクローニング用の突出末端としてCACGを付加したプライマーを作製して(表3)、PCR法により増幅した後、pENTR-vectorにクローニングしてpENTR-Nanogを構築した(図15D)

(E) CAGプロモーター

50

既に作製済みであった pC X - E G F P より C A G プロモーター部分を S a l I / E c o R I (平滑末端化)により切り出し、p E N T R - v e c t o r にクローニングして p E N T R - C A G を構築した (図 1 5 E)

(F) P G K プロモーター

P G K プロモーター領域の 5 ' 側に p E N T R - v e c t o r クローニング用の突出末端として C A C C を付加し、3 ' 側に P s t I サイトを付加したプライマーを作製して (表 3)、P C R 法により増幅した後、p E N T R - v e c t o r にクローニングして p E N T R - P G K を構築した (図 1 5 F)

【 0 1 0 4 】

【表 3】

10

Table3

Primer名	配列
Nanog-pro-F	caccTAAAGTGAAATGAGGTAAAGCC
Nanog-pro-R	GGAAAGATCATAGAAAGAAGAG
PGK-pro-F	caccGAATTCTACCGGGTAGGGGAG
PGK-pro-R-Pst I	CTGCAGGTCGAAAGGCCCGG

20

【 0 1 0 5 】

(2) R C を含むレンチウイルスベクタープラスミドへのプロモーター組み替え

図 7 で示したプラスミドのうち、p L e n t i 6 - R C - V e n u s - 2 A - H S V - t k の R C 部分に、図 1 5 で示した各種プロモーターをリコンビネーションにより挿入した (p L e n t i 6 - P r o m o t e r - V e n u s - 2 A - H S V - t k)。R C を含むレンチウイルスベクタープラスミドと、各プロモーターを含む p E N T R v e c t o r プラスミドをそれぞれ合わせて、L R クローナーゼを反応させることでプロモーターを R C 部分に挿入した。未分化特異的プロモーターとして s u r v i v i n , t e r t , R e x 1 , N a n o g を、またコントロールとして恒常性プロモーターの C A G , P G K をそれぞれ挿入した (図 1 6 A)。また、図 7 で示したプラスミドのうち、p L e n t i 6 - R C - V e n u s - 2 A - h u m a n - t m p k の R C 部分に、図 1 5 で示した各種プロモーターをリコンビネーションにより挿入した (p L e n t i 6 - P r o m o t e r - V e n u s - 2 A - h u m a n - t m p k)。未分化特異的プロモーターとして s u r v i v i n , t e r t , R e x 1 , N a n o g を、またコントロールとして恒常性プロモーターの C A G , P G K をそれぞれ挿入したものを作製した (図 1 6 B)。

30

【 0 1 0 6 】

(3) フローサイトメトリー分析 (F A C S) による G F P 発現細胞の分取

p L e n t i 6 - P r o m o t e r - V e n u s - 2 A - H S V - t k のうち、s u r v i v i n および C A G プロモーターのプラスミドよりレンチウイルスベクターを産生し、感染させた細胞について F A C S A R I A I I (B D 社) を使用して感染細胞 (G F P 陽性細胞) を分取した。

40

K h E S 1 は、1 0 m m Y 2 7 6 3 2 を含む培地で一晚培養した K h E S 1 を C T K で処理した後、単一細胞へと分散させた。細胞数をカウントした後、必要量の細胞を遠心 (1 0 0 0 r p m、5 分) し、1 0 m m Y 2 7 6 3 2 含有 P B S に再懸濁させた。未分化細胞標識抗体である、A l e x a F l u o r 4 8 8 a n t i - H u m a n S S E A 4 (B I O L E G E N D 社) を、細胞懸濁液 1 0 0 m L (1 × 1 0 6 細胞) あたり 5 m L 加え、氷上で 1 0 分毎に細胞を懸濁しながら 3 0 分間静置して細胞のラベリングを行

50

った。10 mm Y27632含有PBSで1回洗浄後、10 mm Y27632含有ES用培地に懸濁させ、抗体に標識されたGFP陽性細胞を未分化なレンチウイルス感染Khes1としてフローサイトメーターで評価した。

D3細胞はトリプシン処理し、ピペッティングにより細胞塊を単一細胞に分散させた。細胞数をカウントし、必要量のD3細胞を遠心(1000rpm、5分)して、培地で再懸濁させ、GFP陽性細胞をレンチウイルス感染D3細胞としてフローサイトメーターで評価した。

フローサイトメーターでGFP陽性細胞を確認し、細胞を増やした後、BD FACSAria IIによりGFP陽性細胞の分取を行った。分取した細胞は直ちに遠心(1000rpm、5分)し、新しい培地に再懸濁させ、Khes1細胞はMEF細胞と共培養を行い、D3細胞はゼラチンコートしたディッシュに播種した。

【0107】

(4) *in vitro*における未分化細胞に対する毒性効果の検証

上記の分取したKhes1細胞およびD3細胞を用いて、GCV投与後の細胞毒性効果について解析を行った。Khes1細胞は、1wellあたり 1×10^5 個の細胞を96well plateに播種し、翌日より7日間、survivin-Venus-2A-HSV-tk(A)、CAG-Venus-2A-HSV-tk(B)、およびHSV-tkを持たないsurvivin-Venus-2A-puromycin(C)、及び非感染細胞(NC)(D)の各群にGCVを0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/mLでそれぞれ毎日、7日間投与した。結果を図17に示す。D3細胞は、1wellあたり 1×10^5 個の細胞を96well plateに播種し、翌日より4日間、survivin-Venus-2A-HSV-tk(A)、CAG-Venus-2A-HSV-tk(B)、およびHSV-tkを持たないsurvivin-Venus-2A-puromycin(C)、及び非感染細胞(NC)(D)の各群にGCVを0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/mLでそれぞれ毎日、4日間投与した。4日間投与後の細胞毒性効果の測定は、MTT assayの変法であるWST-8 assayを用いて行った。使用した試薬SF(ナカライ社)は高感度水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩; WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt]を発色基質として使用することでこれまでのMTTよりも高感度測定を可能としており、WST-8が細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの450 nmの吸光度を直接測定することにより生細胞数を測定した(E)。結果を図18に示す。

【0108】

(5) 結果

LV.survivin-Venus-2A-HSV-tk感染Khes1細胞は、コントロールであるLV.CAGと共に、GCV1 mg/mLと低用量で十分な細胞毒性効果を示し、細胞がほぼ全滅していた(図17A, B)。一方で、HSV-tkを持たないLV.survivin-Venus-2A-puromycin感染細胞、および非感染細胞(NC)細胞では同様に細胞毒性は見られず(図17C, D)、GCV1 mg/mL投与時にHSV-tk依存性の特異的な細胞傷害効果であることが示された。またGCVが10 μ g/mL以上の高濃度になるとHSV-tk非特異的な細胞毒性が見られた。また、D3細胞でも同等の結果が得られ、特にLV.survivin-Venus-2A-HSV-tk感染D3細胞では、同ウイルス感染Khes1細胞よりも感受性の高い細胞毒性効果を示した(図18A-E)

【0109】

(6) *in vitro*における分化細胞に対するGCV投与の安全性の検証

上記の分取したKhes1細胞を用いて、分化誘導後にGCV投与を行った際の安全性を確認するための解析を行った。分化誘導は、細胞を1wellあたり 3×10^3 個の細

10

20

30

40

50

胞を96well 低接着plateにES培地(LIFを除く)で播種し、1週間培養して胚葉体を形成させた。その後、ゼラチンコートしたディッシュに継代を続け、28日以上培養して十分に分化させて作製した。分化誘導した細胞を1wellあたり 1×10^5 個の細胞を96well plateに再播種し、翌日より4日間、survivin-Venus-2A-HSV-tk(A)、CAG-Venus-2A-HSV-tk(B)、およびHSV-tkを持たないsurvivin-Venus-2A-puromycin(C)、及び非感染細胞(NC)(D)の各群にGCVを0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100mg/mLでそれぞれ毎日、4日間投与した。結果を図19に示す。

【0110】

(7) 結果

LV.survivin-Venus-2A-HSV-tk感染KhES1細胞は、コントロールであるLV.CAGと共に、未分化細胞では毒性効果を示していたが、上述の方法で分化させた細胞ではほとんど障害がみられず、未分化細胞特異的な殺傷効果を示した(図19A, B)。HSV-tkを持たないLV.survivin-Venus-2A-puromycin感染細胞、および非感染細胞(NC)細胞では未分化細胞と同じく細胞毒性は見られず(図19C, D)、GCV10mg/mL以上投与時でも未分化細胞に比べて非特異的な殺傷が見られないことから、HSV-tk存在下で、かつ未分化細胞でのみGCVの毒性が現れることが示された。(図19A-E)

【0111】

(8) in vivoにおけるレンチウイルス感染ヒトES細胞の分化多能性の検証

上記の分取したKhES1細胞を用いて、レンチウイルス感染後の分化多能性に対する影響がないことを確認するための検証を行った。免疫不全マウスに 4×10^6 個の細胞を皮下移植して、テラトーマを形成させた。テラトーマが直径5mm以上になったものをそれぞれ取り出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製した。各切片は、脱パラフィンした後、HE染色を行った。結果を図20に示す。

【0112】

(9) 結果

LV.survivin-Venus-2A-HSV-tk、及びLV.CA-Venus-2A-HSV-tk感染KhES1細胞のいずれにおいても、三胚葉由来の各細胞が見られ(図20A-F)、非感染細胞と同等に多能性を維持していることが示された。この結果より、以前の研究で多数報告のあるとおり、レンチウイルス感染が、多能性幹細胞が有する分化多能性に影響しないことが確認された。

10

20

30

【 図 1 】

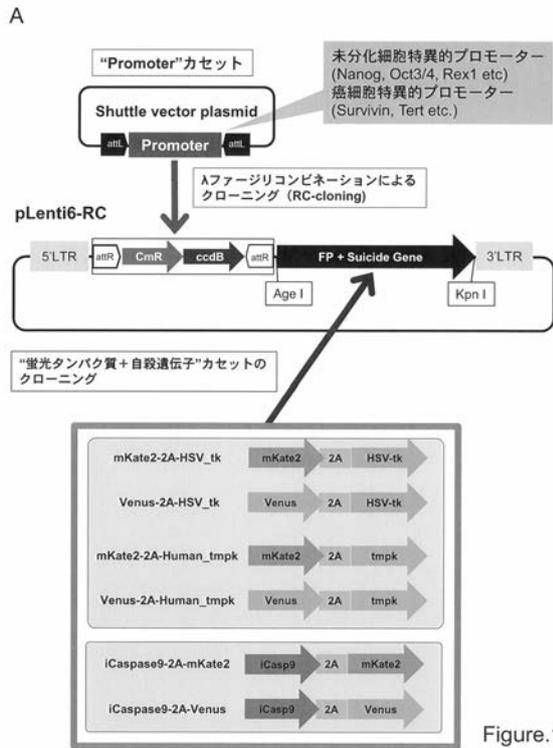


Figure.1

【 図 2 】

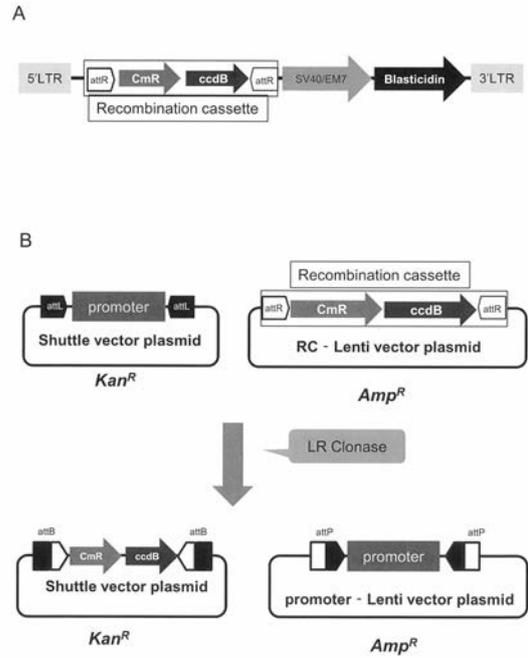


Figure.2

【 図 3 】

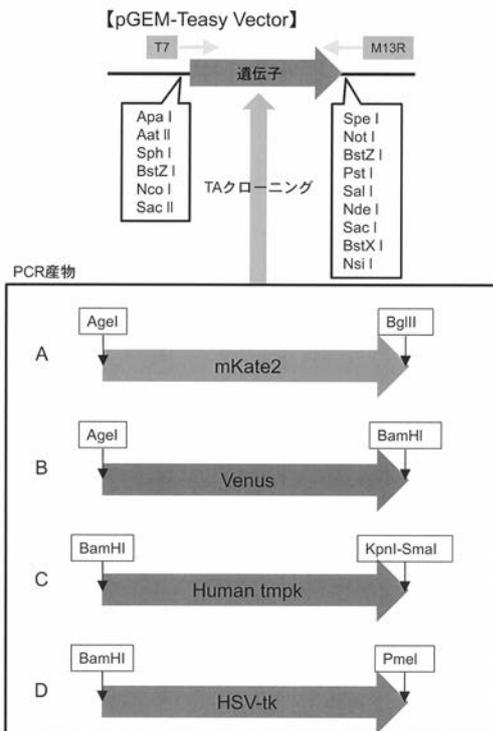


Figure.3

【 図 4 】

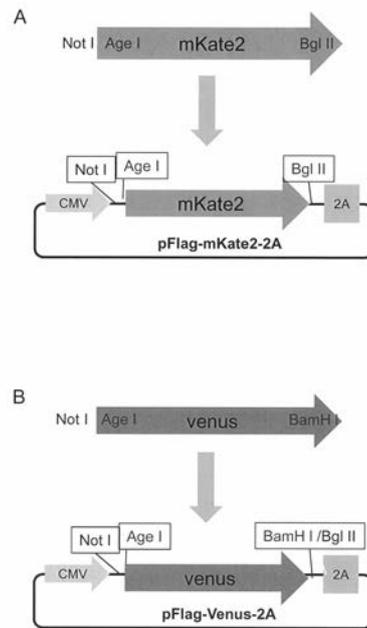


Figure.4

【 図 5 】

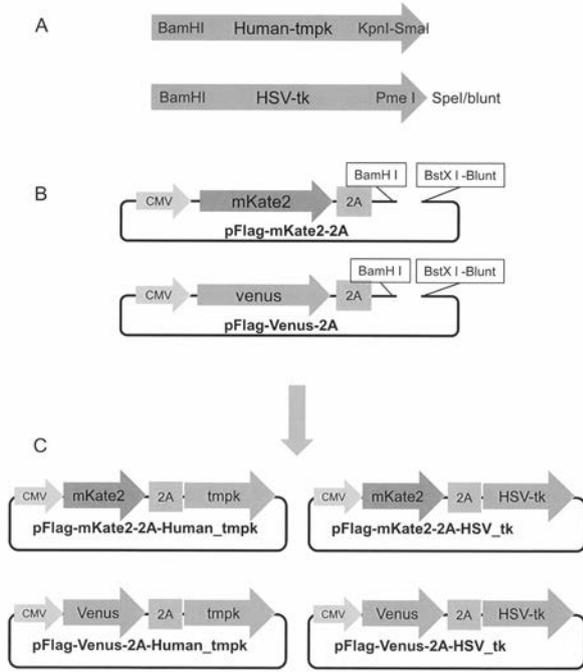


Figure.5

【 図 6 】

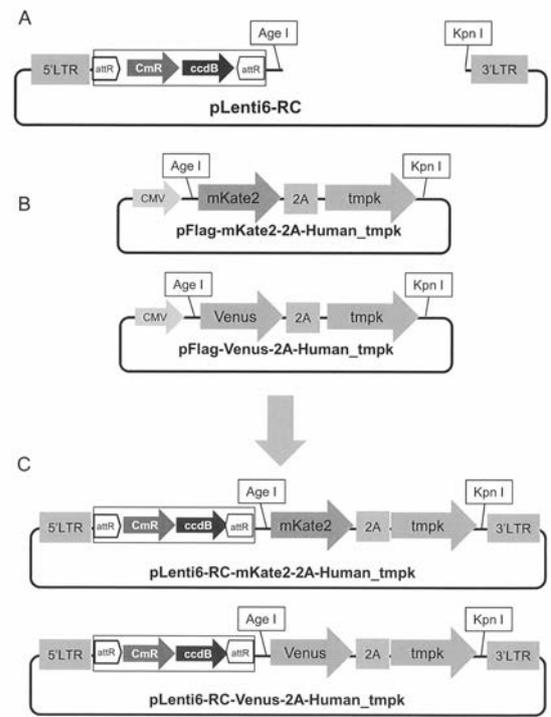


Figure.6

【 図 7 】

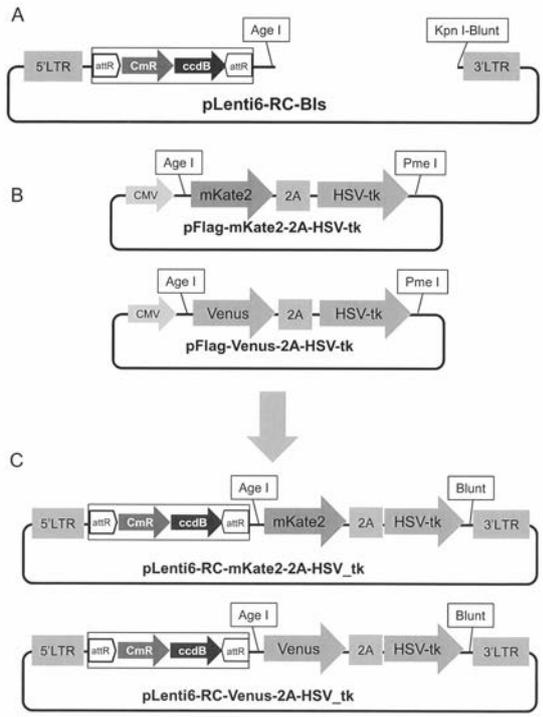


Figure.7

【 図 8 】

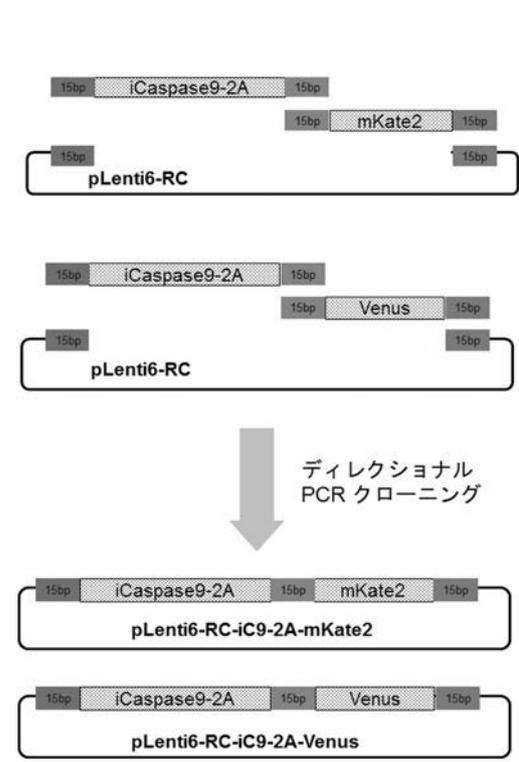


Figure.8

【 图 9 】

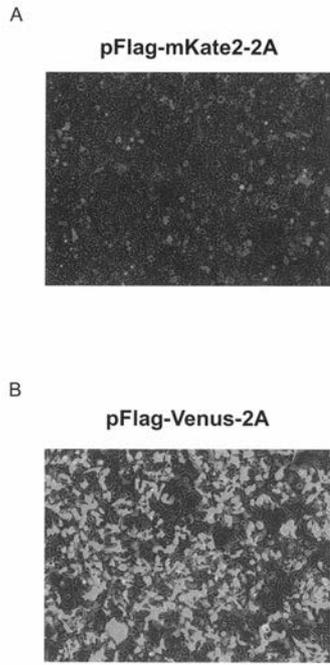


Figure.9

【 图 10 A 】

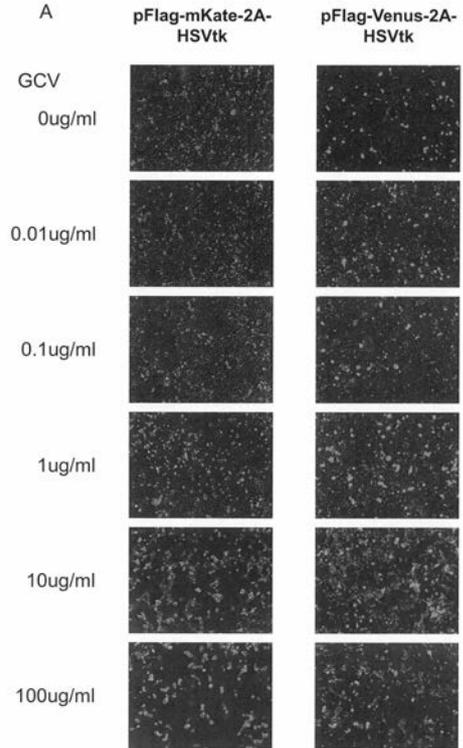


Figure.10

【 图 10 B 】

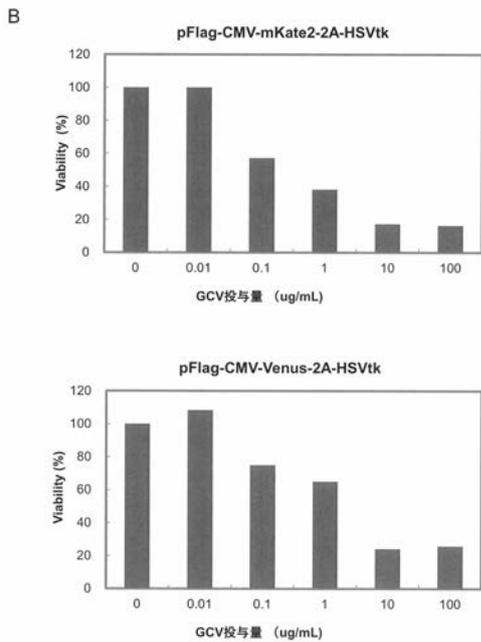


Figure.10

【 图 10 C 】

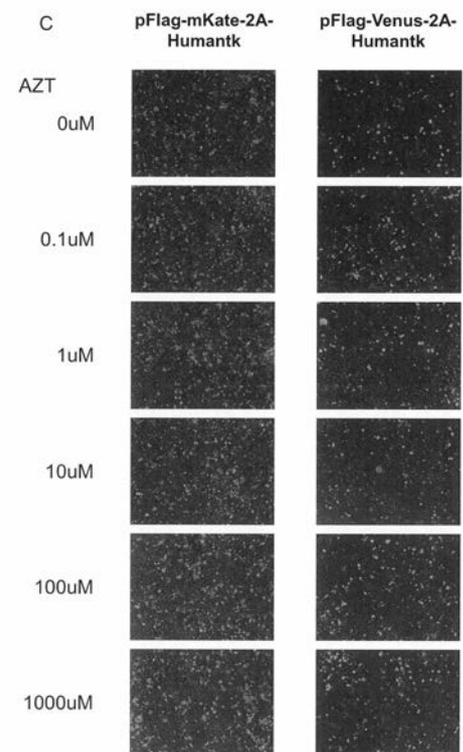


Figure.10

【 図 1 0 D 】

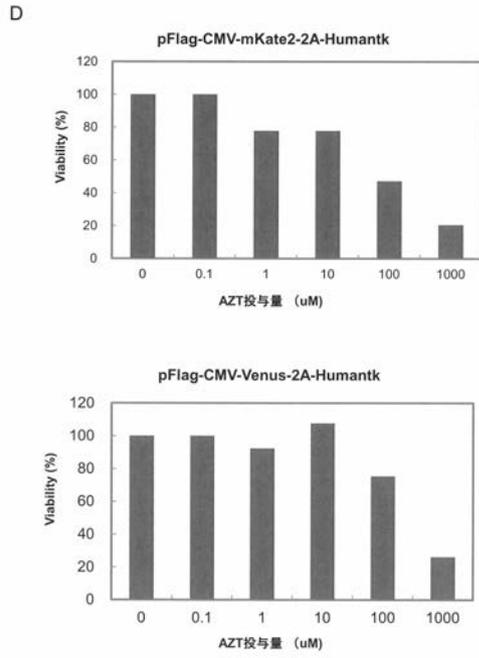


Figure.10

【 図 1 1 A 】

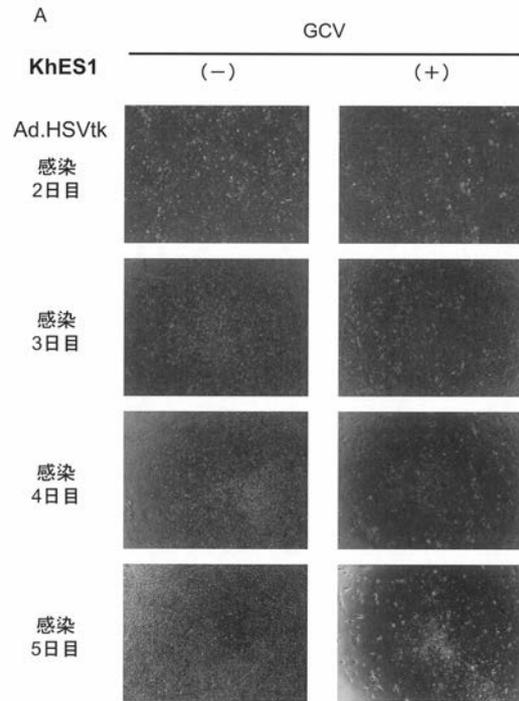


Figure.11

【 図 1 1 B 】

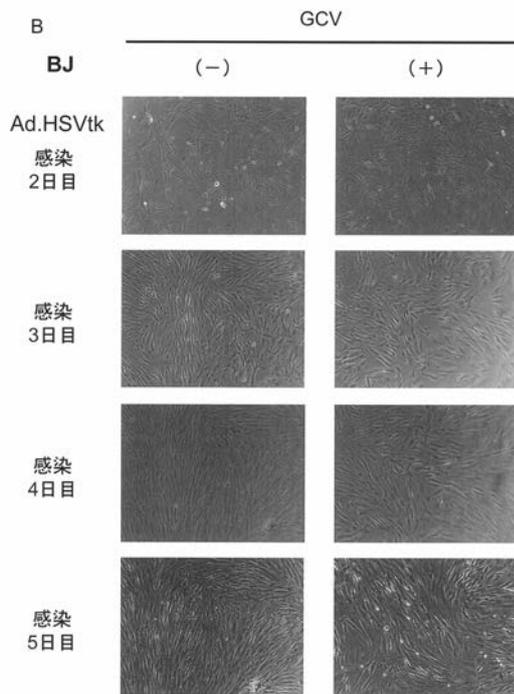


Figure.11

【 図 1 2 A 】

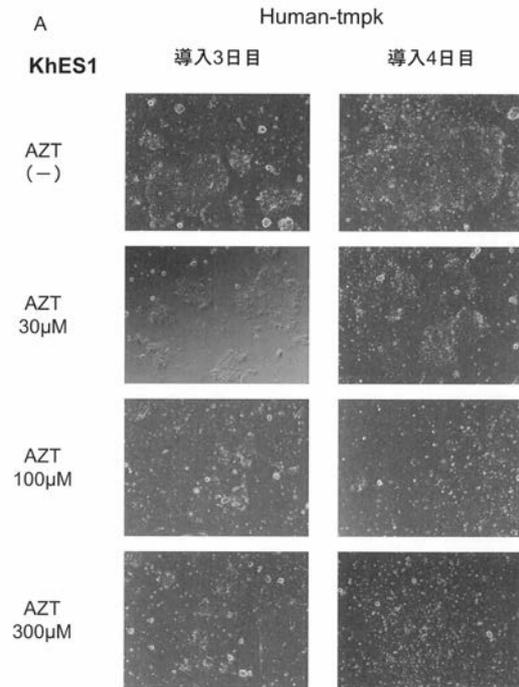


Figure.12

【 図 1 2 B 】

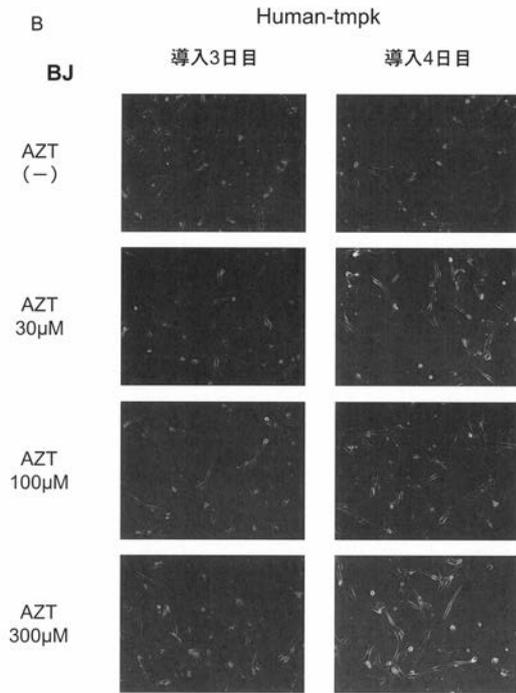


Figure.12

【 図 1 2 C 】

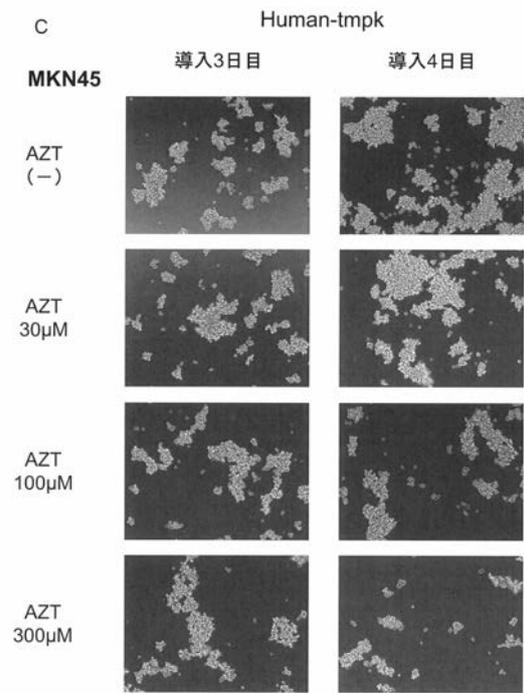


Figure.12

【 図 1 3 A 】

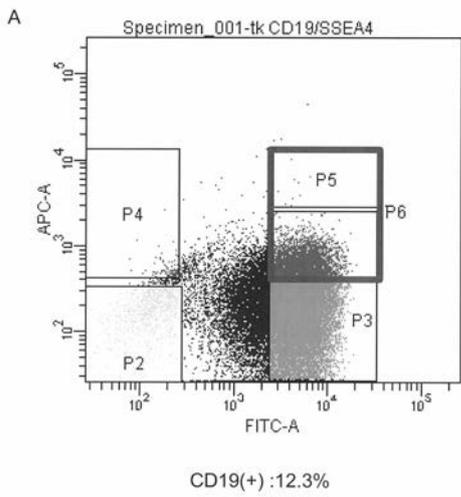
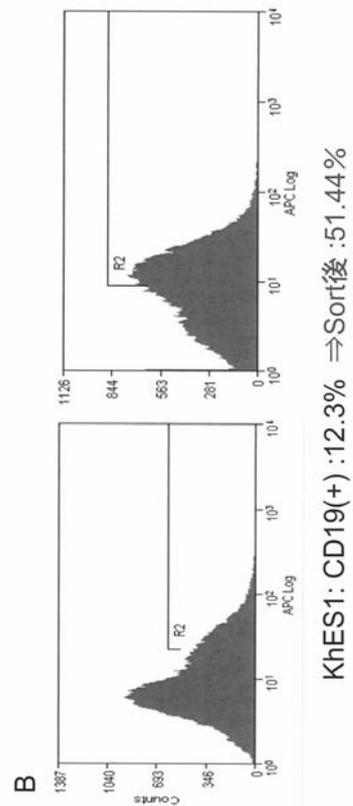
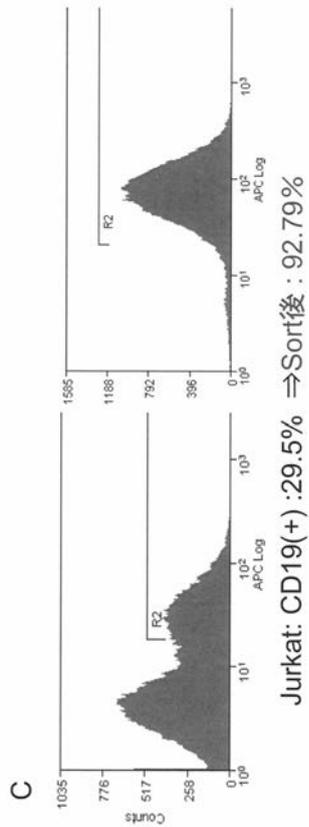


Figure.13

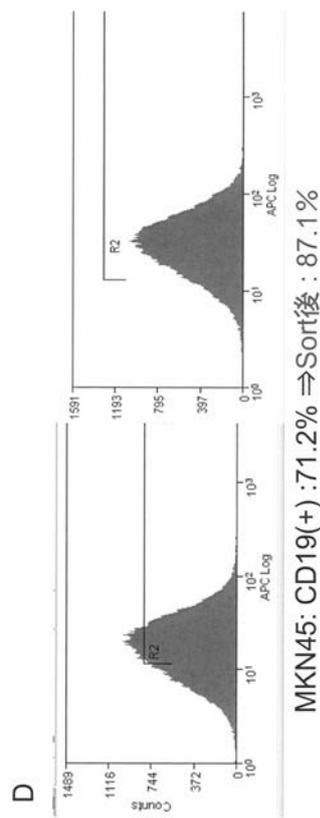
【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】



【 図 1 3 D 】



【 図 1 4 A 】

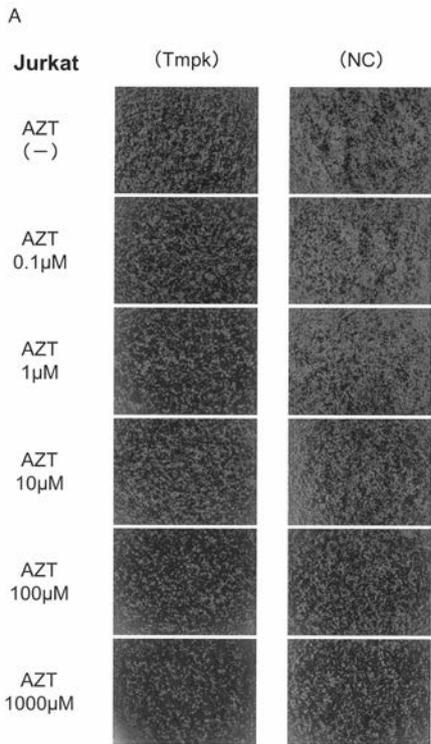


Figure.14

【 図 1 4 B 】

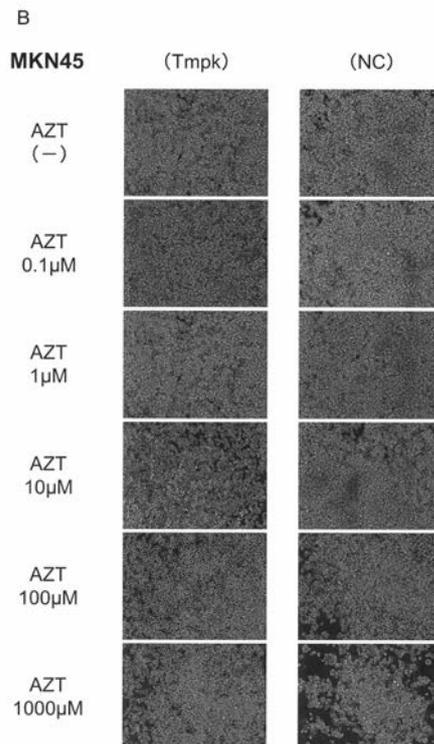
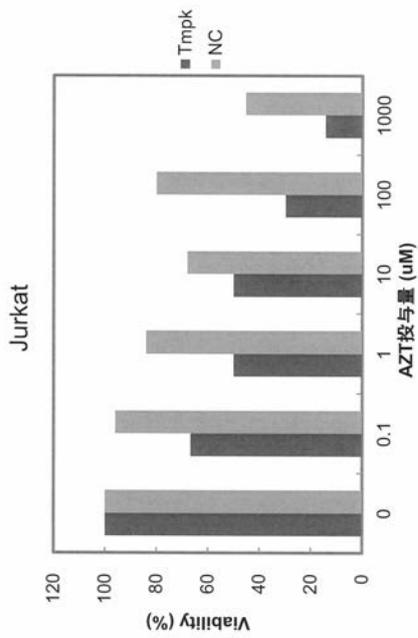


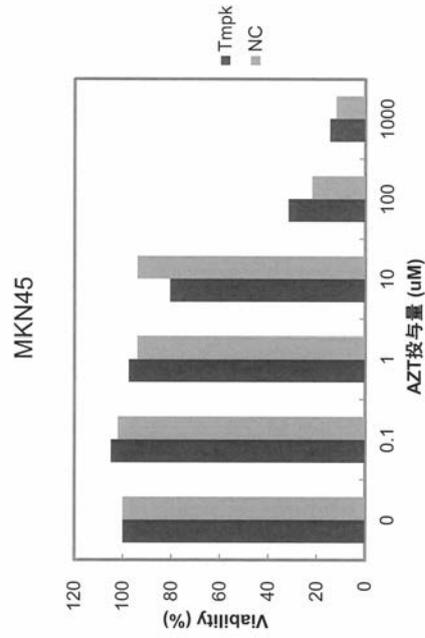
Figure.14

【 図 1 4 C 】



C

【 図 1 4 D 】



D

【 図 1 5 】

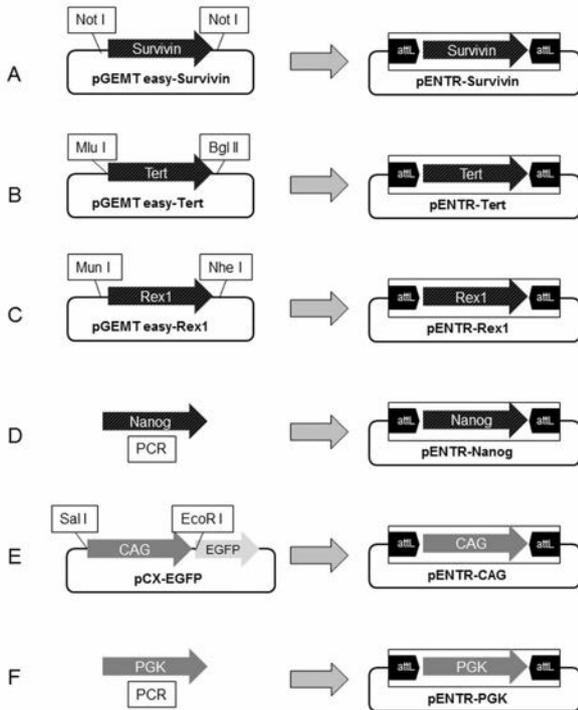


Figure.15

【 図 1 6 A 】

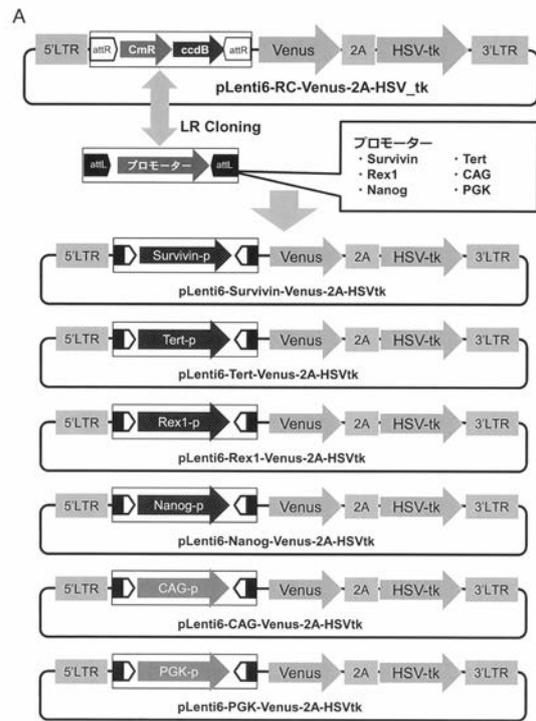


Figure.16

【 図 1 6 B 】

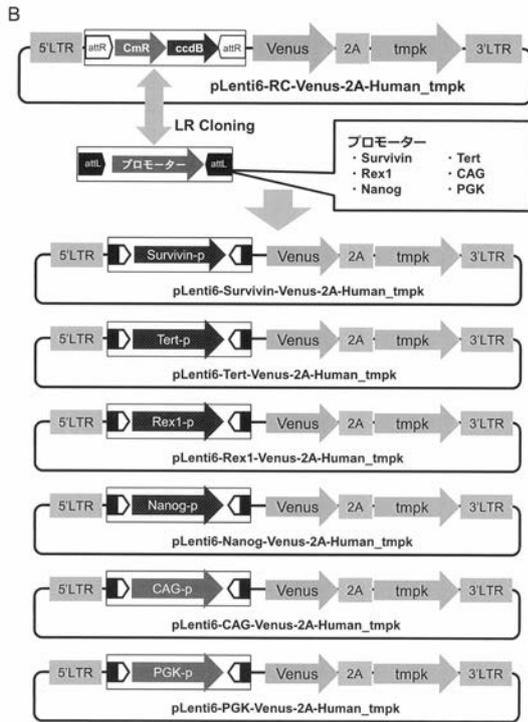


Figure.16

【 図 1 7 A 】

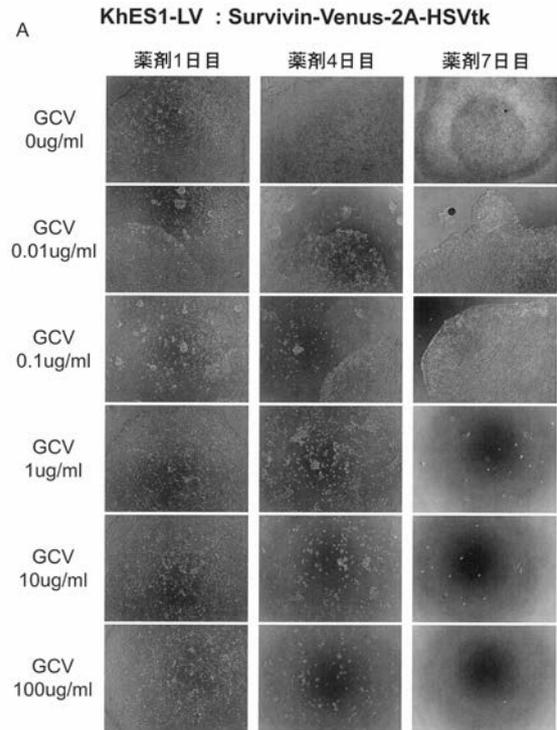


Figure.17

【 図 1 7 B 】

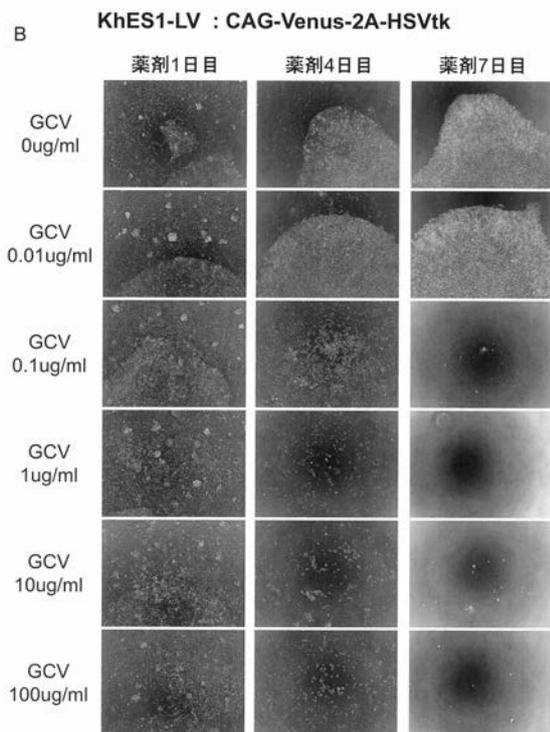


Figure.17

【 図 1 7 C 】

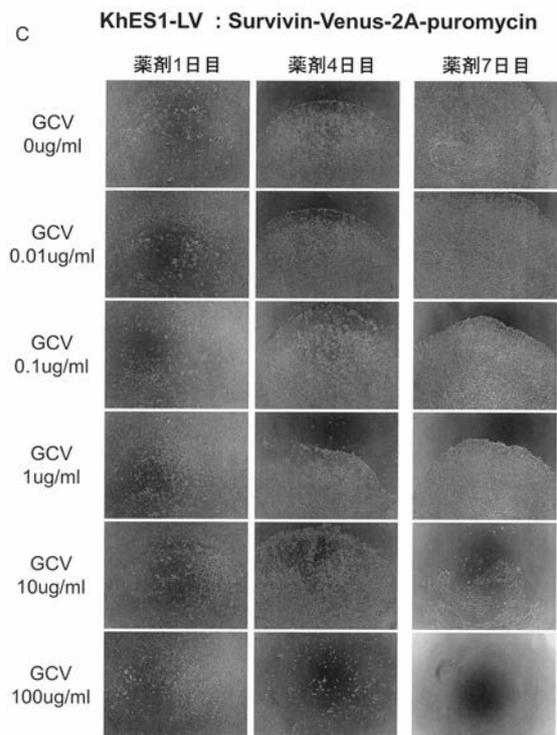


Figure.17

【 図 1 7 D 】

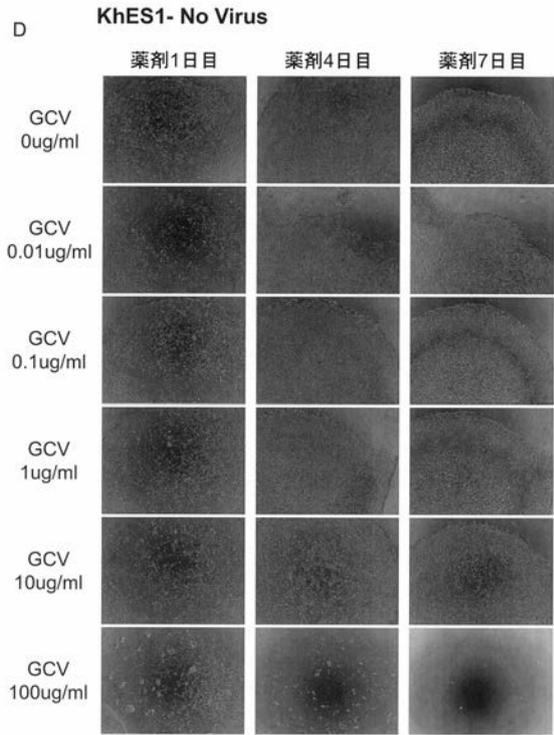


Figure.17

【 図 1 8 A 】

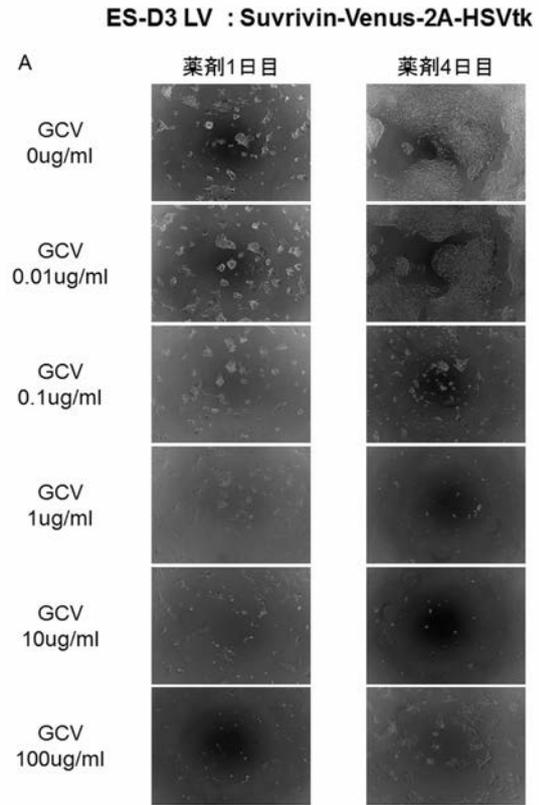


Figure.18

【 図 1 8 B 】

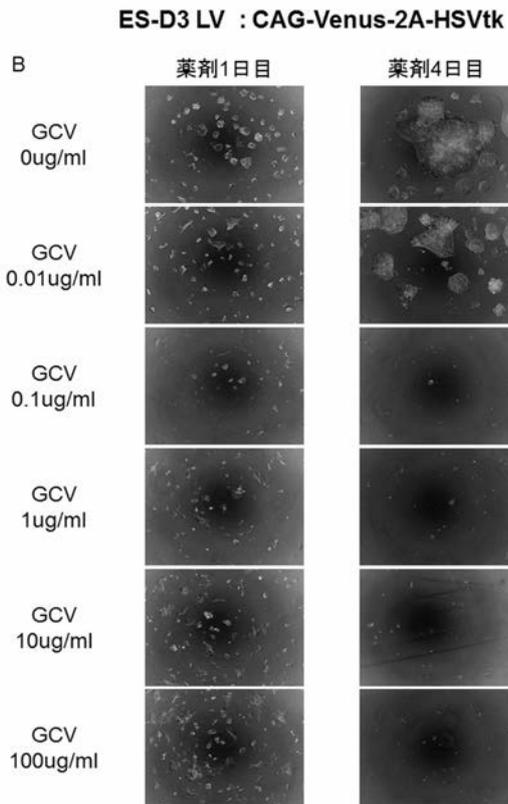


Figure.18

【 図 1 8 C 】

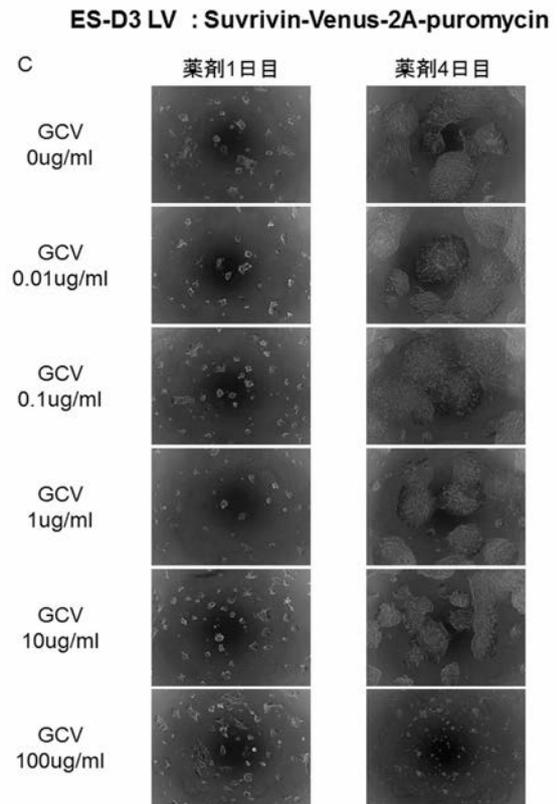


Figure.18

【 図 1 8 D 】

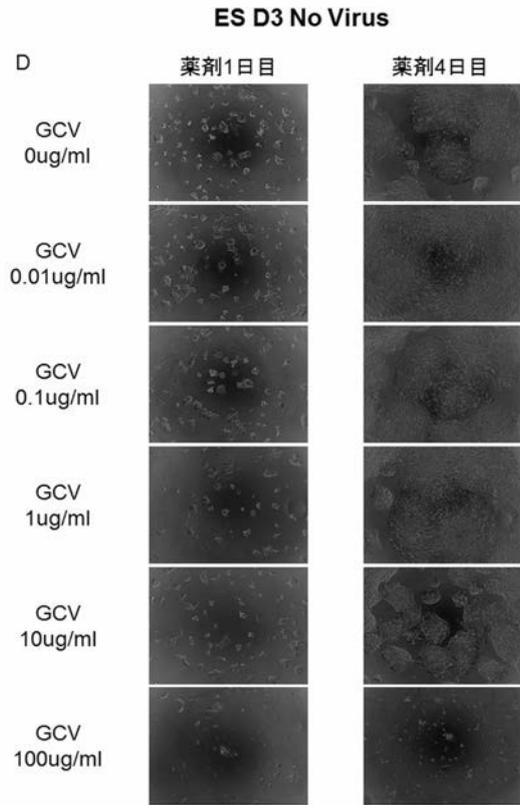


Figure.18

【 図 1 8 E 】

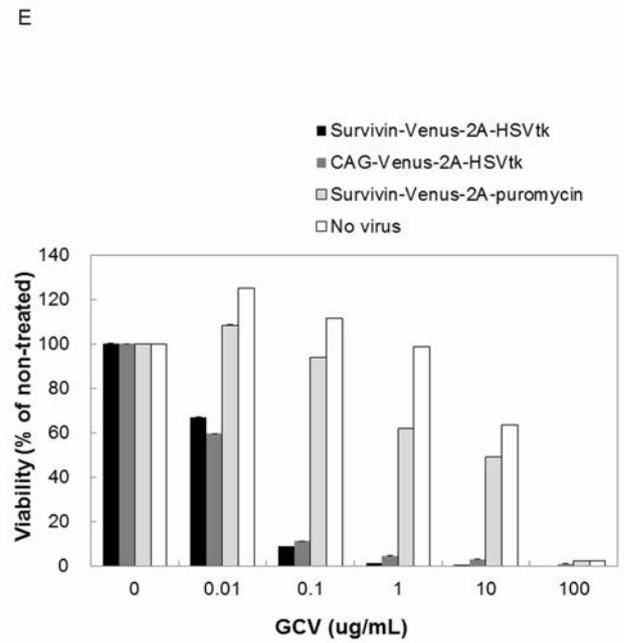


Figure.18

【 図 1 9 A 】

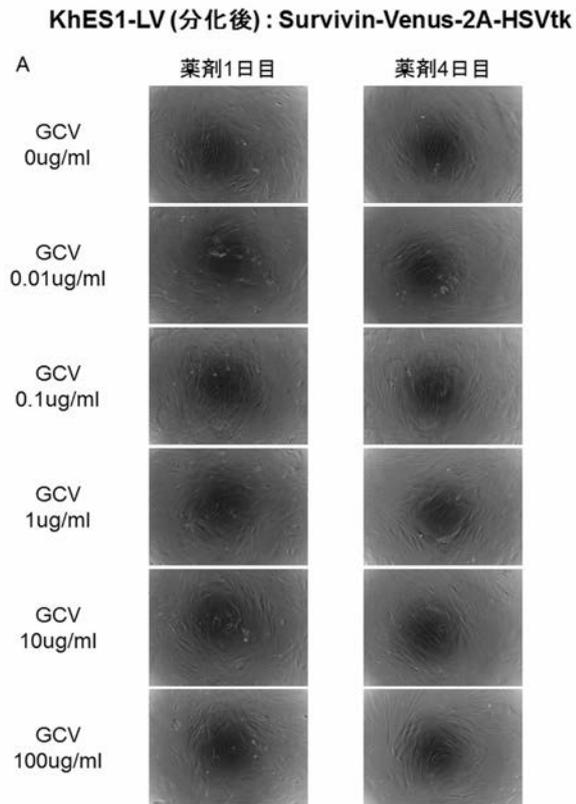


Figure.19

【 図 1 9 B 】

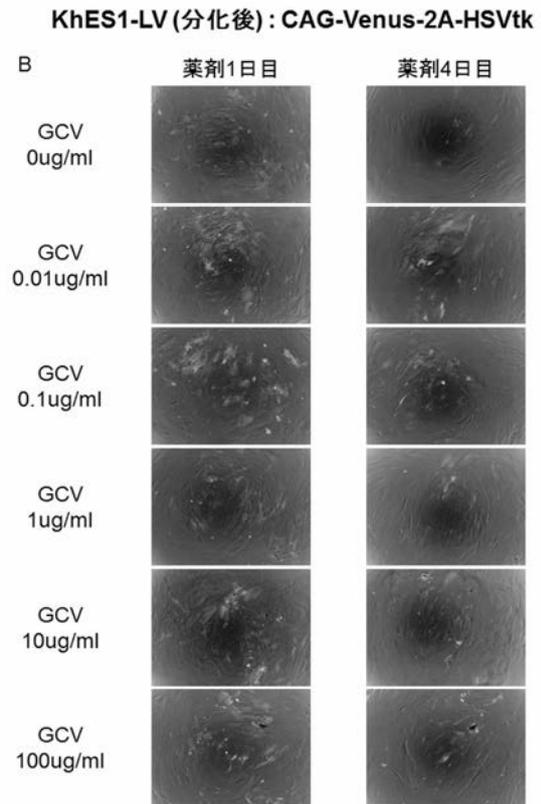


Figure.19

【 図 1 9 C 】

KhES1-LV (分化後) : Survivin-Venus-2A-puromycin

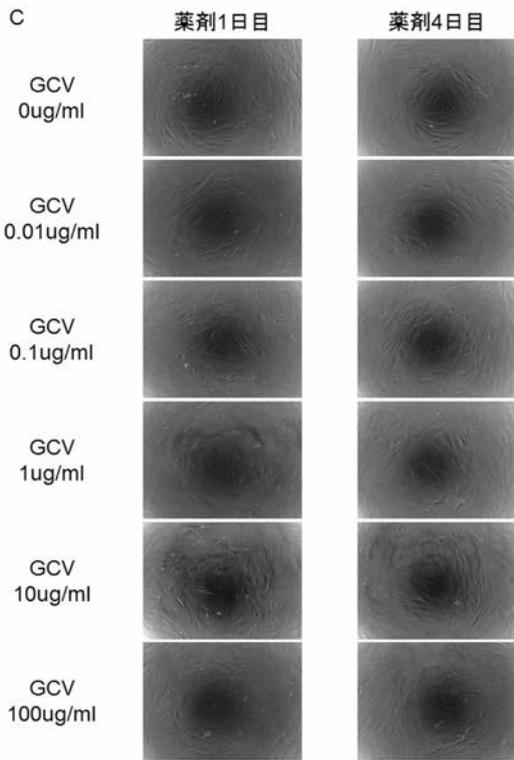


Figure.19

【 図 1 9 D 】

KhES1-LV (分化後) No virus

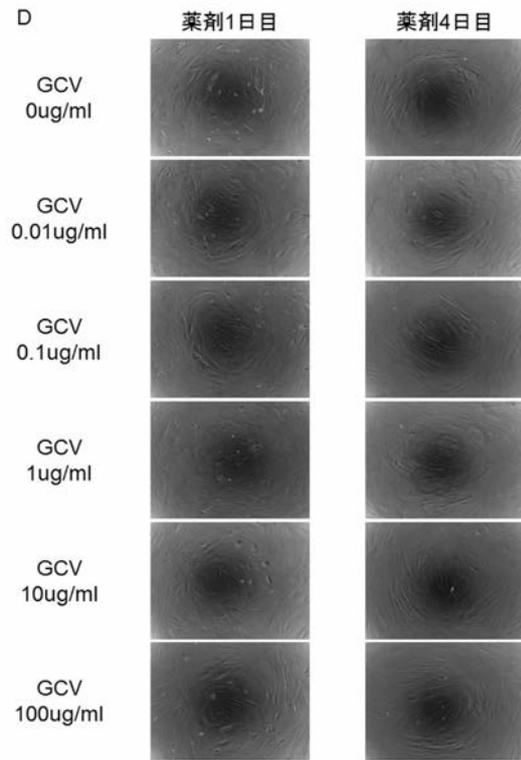


Figure.19

【 図 1 9 E 】

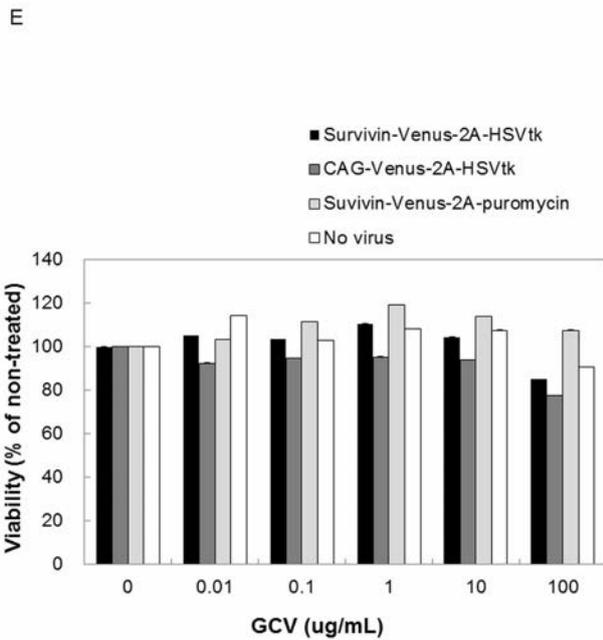


Figure.19

【 図 2 0 】

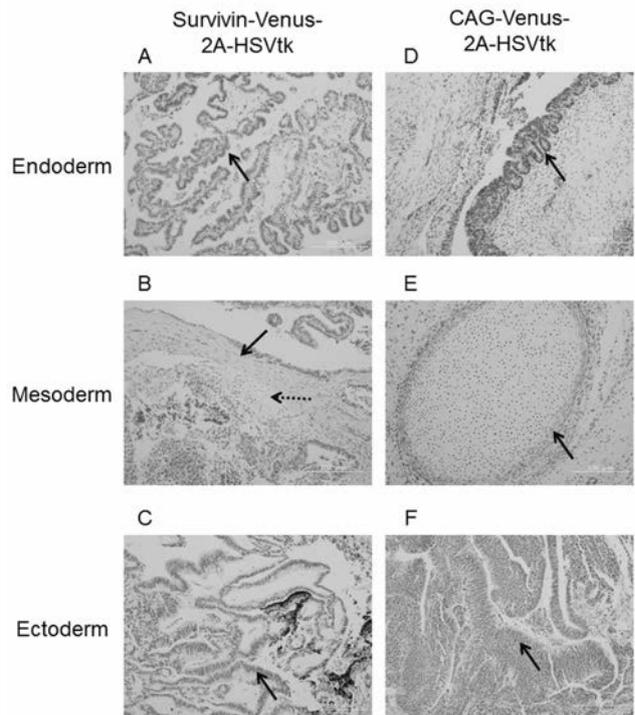


Figure.20

【配列表】

2015107888000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年6月23日(2015.6.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、プロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されているウイルスベクター。

【請求項2】

殺傷遺伝子が、自殺遺伝子である、請求項1に記載のウイルスベクター。

【請求項3】

自殺遺伝子が、薬剤依存性自殺遺伝子である、請求項2に記載のウイルスベクター。

【請求項4】

薬剤依存性自殺遺伝子が、HSV-tk、human-tmpk、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘ウイルスチミジンキナーゼ、又はCaspaseである、請求項3に記載のウイルスベクター。

【請求項5】

標識遺伝子が蛍光タンパク質である、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載のウイルスベクター。

【請求項6】

蛍光タンパク質が、赤色の蛍光蛋白質である、請求項5に記載のウイルスベクター。

【請求項7】

蛍光タンパク質が、mKate2である、請求項5に記載のウイルスベクター。

【請求項8】

一つのプロモーターにより前記2つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が、2A配列又はIRES配列である、請求項1～請求項7のいずれか1項に記載のウイルスベクター。

【請求項9】

レンチウイルスベクターである、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載のウイルスベクター。

【請求項10】

プロモーター領域が未分化細胞特異的プロモーター領域である、請求項1～請求項9のいずれか1項に記載のウイルスベクター。

【請求項11】

未分化細胞特異的プロモーターが、survivinプロモーター又はtertプロモーターである、請求項10に記載のウイルスベクター。

【請求項12】

未分化細胞特異的プロモーターが、survivinプロモーターである、請求項10に記載のウイルスベクター。

【請求項13】

A) 請求項1～請求項9のいずれか1項に記載のウイルスベクターのプロモーター部分に被験プロモーターを組み替えて被験プロモーターを有するウイルスベクターを作製するステップ、

- B) 被験プロモーターを有するウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
- C) 分化誘導処理後の前記細胞における前記標識遺伝子の発現を検出するステップ、
- D) 分化誘導処理後の前記細胞が未分化細胞であるか、分化細胞であるかを識別するステップ、及び
- E) 被験プロモーターが未分化細胞に特異的であるか否かを判定するステップを備える、未分化細胞特異的プロモーターのスクリーニング方法であって、

ここで、該判定が未分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が高く、かつ、分化細胞として識別された細胞において前記標識遺伝子の発現が検出される割合が低い場合、該被験プロモーターは未分化細胞に特異的であると判定することにより行われる方法。

【請求項 14】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
- B) 分化処理後の前記細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、
- C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

【請求項 15】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中の前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、
- B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が存在すると判定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の有無を判定する方法。

【請求項 16】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
- B) 分化処理後の前記細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、
- C) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

【請求項 17】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における前記標識遺伝子の発現産物を同定するステップ、及び、
- B) 前記標識遺伝子が発現している細胞が未分化細胞であると同定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞を同定する方法。

【請求項 18】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
- B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、
- C) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量又は割合を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量又は割合を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量又は割合を示す方法。

【請求項 19】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物のレベルを測定するステップ、及び、
- B) 測定された前記標識遺伝子の発現産物のレベルから、未分化細胞の量又は割合を決定するステップを備える、分化処理後の細胞における未分化細胞の量又は割合を決定する方法であって、

ここで、前記標識遺伝子の発現産物のレベルが、未分化細胞の量又は割合を示す方法。

【請求項 20】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
B) 分化処理後の前記細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、
C) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞数を決定する方法。

【請求項 21】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子が発現している細胞数を計数するステップ、及び、
B) 前記標識遺伝子が発現している細胞数が未分化細胞の数であると決定するステップを備える、分化処理後の細胞中における未分化細胞の数を決定する方法。

【請求項 22】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、
B) 分化処理後の細胞中における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、
C) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存し又は発生したと判定するステップを備える、分化処理後に残存又は発生する未分化細胞のモニタリング方法。

【請求項 23】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入され、分化誘導処理された細胞における、前記標識遺伝子の発現産物を検出するステップ、及び、
B) 前記標識遺伝子の発現産物が検出された場合には、未分化細胞が残存又は発生していると判定するステップを備える、幹細胞の分化処理後の未分化細胞のモニタリング方法。

【請求項 24】

- A) 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターを対象の細胞に感染させるステップ、及び、
B) 前記細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

【請求項 25】

- 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターであって、殺傷遺伝子が薬剤依存性殺傷遺伝子であるウイルスベクターが導入された細胞に前記薬剤依存性殺傷遺伝子が毒性を発揮可能な薬剤を投与するステップを備える、未分化細胞を殺傷する方法。

【請求項 26】

- 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞標識剤。

【請求項 27】

- 請求項 10 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含む、未分化細胞殺傷剤。

【請求項 28】

- 請求項 1 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターが導入された細胞。

【請求項 29】

- 幹細胞である請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 30】

- 幹細胞が、ES細胞、iPS細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、又は生殖幹細胞である、請求項 29 に記載の細胞。

【請求項 3 1】

幹細胞を分化誘導処理することにより得られた細胞である、請求項 2 8 に記載の細胞。

【請求項 3 2】

一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が、2 A 配列である、請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター

【請求項 3 3】

殺傷遺伝子が HSV - tk、human - tmpk、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘ウイルスチミジンキナーゼ又は Caspase であり、蛍光タンパク質が赤色の蛍光蛋白質であり、かつ、未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、請求項 3 2 に記載のウイルスベクター。

【請求項 3 4】

殺傷遺伝子が HSV - tk であり、蛍光タンパク質が mKate 2 である、請求項 3 3 に記載のウイルスベクター。

【請求項 3 5】

殺傷遺伝子が HSV - tk であり、蛍光タンパク質が Venus であり、かつ、未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、請求項 3 2 に記載のウイルスベクター。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 1 2、及び請求項 3 2 ~ 請求項 3 5 から選択される 1 の請求項に記載されたウイルスベクター、及び、目的のプロモーター領域を有する当該ベクターのリコンビネーションカセットに使用した遺伝子配列に対応するシャトルベクターをリコンビナーゼを用いてリコンビネーション法を用いることを含む、標識遺伝子と殺傷遺伝子とが、一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列を介して結合した核酸配列、及び、目的のプロモーター領域を含むリコンビネーションカセットを有するウイルスベクターであって、該プロモーター領域が、該標識遺伝子及び該殺傷遺伝子を発現可能に連結されるウイルスベクターの製造方法。

【請求項 3 7】

一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が 2 A 配列であり、殺傷遺伝子が HSV - tk、human - tmpk、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘ウイルスチミジンキナーゼ又は Caspase であり、蛍光タンパク質が赤色の蛍光蛋白質であり、かつ、未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、請求項 3 4 に記載の製造方法。

【請求項 3 8】

一つのプロモーターにより前記 2 つの遺伝子を同時に発現させることが可能な配列が、2 A 配列であり、殺傷遺伝子が HSV - tk であり、蛍光タンパク質が Venus であり、かつ、未分化細胞特異的プロモーターが、survivin プロモーターである、請求項 3 4 に記載の製造方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/000138
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02, C12Q1/04, C12Q1/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/BIOTECHDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Song-Tao Yu, et al., Cancer, 2011.08.25, Vol. 118, Issue. 7, PP. 1884-1893, [online], <URL: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.26476/full >	1-11, 26-28, 31 <u>12-31</u>
Y	WO 2012/133674 A1 (Kagoshima University), 04 October 2012 (04.10.2012), paragraphs [0019] to [0030], [0059] (Family: none)	12-31
Y	JP 2013-530699 A (Cellular Dynamics International, Inc.), 01 August 2013 (01.08.2013), paragraphs [0239] to [0249] & US 2011/0312001 A1 & EP 2582793 A & WO 2011/159797 A2 & CA 2802087 A	13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 March 2015 (16.03.15)		Date of mailing of the international search report 24 March 2015 (24.03.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/000138

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-541768 A (California Institute of Technology), 27 November 2008 (27.11.2008), paragraphs [0099], [0169], [0200] & US 2007/0020238 A1 & US 2011/0212530 A1 & EP 1885186 A & WO 2006/130855 A2 & CA 2611056 A & AU 2006252406 A	1-9, 26-31
A	JP 2005-95027 A (ReproCELL Inc.), 14 April 2005 (14.04.2005), paragraphs [0305] to [0309], [0320] to [0324] (Family: none)	1-31

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 0 1 3 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02, C12Q1/04, C12Q1/68											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/BIOTECHDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	Song-Tao Yu, et al., Cancer, 2011.08.25, Vol. 118, Issue. 7, PP. 1884-1893, [online], <URL: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.26476/full>	1-11, 26-28, 31									
Y		<u>12-31</u>									
Y	W0 2012/133674 A1 (国立大学法人 鹿児島大学) 2012.10.04, 段落 [0019] - [0030], [0059] (ファミリーなし)	12-31									
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 16.03.2015		国際調査報告の発送日 24.03.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 水野 浩之	4 B 4 8 6 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/000138
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-530699 A (セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド) 2013.08.01, 段落【0239】 - 【0249】 & US 2011/0312001 A1 & EP 2582793 A & WO 2011/159797 A2 & CA 2802087 A	13
X	JP 2008-541768 A (カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー) 2008.11.27, 段落【0099】, 【0169】, 【0200】 & US 2007/0020238 A1 & US 2011/0212530 A1 & EP 1885186 A & WO 2006/130855 A2 & CA 2611056 A & AU 2006252406 A	1-9, 26-31
A	JP 2005-95027 A (株式会社リプロセル) 2005.04.14, 段落【0305】 - 【0309】, 【0320】 - 【0324】 (ファミリーなし)	1-31

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 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21		

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

(72) 発明者 井手 佳菜子

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号国立大学法人鹿児島大学内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35
 QR55 QR62 QS25 QS32 QX02
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 BA02 CA44 CA46
 4C084 AA17 NA20 ZC412

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