明　細　書

発明の名称 ： 形質転換用プラスミド

技術分野

[0001] 本発明は、固形腫瘍等の嫌気的疾患治療用遺伝子輸送担体として有用な形質転換嫌気性菌作製に用いられる、嫌気性菌で機能する分泌シグナルペプチドを含む発現カセットを具有し、かつ非シャトルプラスミドである形質転換用プラスミドに関する。また本発明は、該形質転換用プラスミドで形質転換された嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体、該遺伝子輸送担体を含有する医薬組成物および該遺伝子輸送担体を含有する嫌気的疾患治療剤に関する。

[0002] さらに本発明は、該嫌気的疾患治療用形質転換菌作製に有用な、新規な分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるＤＮＡ断片に関する。

背景技術

[0003] 近年、悪性腫瘍の治療方法において、形質転換嫌気性菌を遺伝子輸送担体として用いる方法が注目され、例えば、形質転換したクロストリジウムを用いて、抗腫瘍物質のプロドラッグを抗腫瘍物質に変換する酵素のニトロリダクターゼの発現遺伝子を腫瘍部位へ輸送する方法などが提案されている。（特許文献１～３参照）

[0004] さらに、侵襲性の嫌気性細菌、例えば、サルモネラ菌、腸侵入性大腸菌、リステリア菌、シゲラ菌などを用いて、腫瘍細胞へのＲＮＡ干渉（RNA interfering, ＲＮＡｉ）により、嫌気的疾患因子に関与する遺伝子を消滅または発現阻害させる核酸（ｓｉＲＮＡｓ；小型干渉ＲＮＡｓ（small interfering RNAs）、短鎖干渉ＲＮＡｓ（short interfering RNAs）または短鎖ヘアピンＲＮＡｓ(short hairpin RNAs)）の発現遺伝子を輸送する方法も検討されている。（特許文献４～６参照）

[0005] ところが、これらの微生物はいずれも病原性の菌を低毒性に変異化したものであり、逆変異化して元の病原性菌に戻り、有害性を発揮する可能性が否定できず、さらに、運動性、侵襲性のため、疾患組織のみでなく正常組織に

おいても作用を発現して全身性の副作用症状を生じるおそれがあるなど、安全性において問題性が懸念される。

[0006] 本発明者らは、ヒトの腸内に存在してフローラを形成する非病原性の腸内細菌で、極めて安全な偏性嫌気性細菌であることが知られているビフィズス菌に注目して、このビフィズス菌の形質転換菌を用いる悪性腫瘍の治療方法の開発を行った。

そして、抗腫瘍物質の５－フルオロウラシル（以下、５－ＦＵという）のプロドラッグの５－フルオロシトシン（以下、５－ＦＣという）を５－ＦＵに変換する酵素のシトシン・デアミナーゼ（以下、ＣＤという）を発現するように形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａを開発した。（特許文献７、８参照）

[0007] この形質転換ビフィズス菌は、これを嫌気的疾患の固形腫瘍動物モデルに静脈内投与した場合、低酸素状態の嫌気的疾患組織特異的に生着、増殖し、嫌気的環境下にない正常組織では速やかに消失するという特長を有している。（非特許文献１、２参照）

さらに、この形質転換ビフィズス菌は、静脈内投与においても抗原性を示さないという特長も有しており、極めて優れた悪性腫瘍治療剤として期待できる。

[0008] これらの形質転換ビフィズス菌は、大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドのｐＢＬＥＳ１００－Ｓ－ｅＣＤやｐＡＶ００１－ＨＵ－ｅＣＤ－Ｍ９６８などを用いて形質転換されていることから、大腸菌に水平伝達した場合、その大腸菌で複製されるというおそれがあった。そこで本発明者らは、当該課題を解決すべくプラスミドの改良を行い、大腸菌で機能する複製開始点を具有しない非シャトルプラスミドのｐＢｉｆｉＣＤを開発した（特許文献９参照）。

[0009] 他方、これらの非シャトルプラスミドは分泌シグナルを具有していないため、これらの形質転換ビフィズス菌は発現したＣＤを菌体外に分泌することができなかった。

このことから、ビフィズス菌で機能し、発現蛋白質等を菌体外に分泌できる分泌シグナルペプチドの開発が求められていた。

ビフィズス菌の分泌タンパクとしては、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのアミラーゼやビフィドバクテリウム・ブレーベのＳｅｃ１、Ｓｅｃ２、Ｓｅｃ３などが報告されており、それらの分泌シグナルを導入したプラスミドも報告されている。

[0010] 例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのアミラーゼの分泌シグナルペプチド遺伝子を導入した、大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドのｐＹＢａｍｙ５９で形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガムＭＧ１が報告されている。（非特許文献３参照）

また、ビフィドバクテリウム・ブレーベのＳｅｃ２の分泌シグナルペプチドとヒト型繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ－２）の融合遺伝子を導入した、大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドのｐＥＳＨ８６、ｐＥＳＨ８７などで形質転換したビフィドバクテリウム・ブレーベＵＣＣ２００３なども報告されている。（非特許文献４参照）

[0011] さらには、ビフィドバクテリウム属細菌由来プロモーターおよびシグナル配列、特にＢＬ１１８１遺伝子産物のシグナルまたはａｍｙＢ遺伝子産物のシグナル配列を含む発現カセットも報告され、実際にビフィドバクテリウム・ブレーベおよびビフィドバクテリウム・ロンガムにおいて、発現タンパク質の顕著な分泌が確認された（特許文献１０）。

[0012] しかしながら、上記のプラスミドはいずれも大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドであり、本発明のような、大腸菌で機能する複製開始点を具有しない非シャトルプラスミドで、ビフィズス菌で機能する分泌シグナルを具有するプラスミドについては未だ知られていない。また、これらの分泌シグナルはいずれも、確認されている菌株以外の菌株において機能するかどうかが不明であり、形質転換した菌の目的タンパク質の分泌量も少ないものと推測された。そのため、優れた分泌機能を発揮させることができる、実用性の高い分泌シグナルペプチドの開発もまた望まれていた。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：米国特許第６４１６７５４号公報

特許文献2：米国特許第６６５２８４９号公報

特許文献3：米国特許公開２００３／０１０３９５２号公報

特許文献4：特表２００８－５１９００２号公報

特許文献5：特開２００８－９２９５６号公報；国際公開ＷＯ２００６－０６６０４８号公報

特許文献6：国際公開ＷＯ　２００８－０９１３７５号公報

特許文献7：特開２００２－９７１４４号公報

特許文献8：国際公開 ＷＯ ２００７－１３６１０７号公報

特許文献9：国際公開 ＷＯ ２００９－１２８２７２号公報

特許文献10：国際公開 ＷＯ ２０１０－１２６０７３号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Yazawa et al., Cancer Gene Therapy, Vol. 7, No. 2, 2000: pp 269-274

非特許文献2：Yazawa et al., Breast Cancer Research and Treatment, Vol. 66, 2001: pp 165-170

非特許文献3：Seong et al., Biotechnology Letters, 2006, Vol. 28: pp 163-168

非特許文献4：Shkoporov et al., Biotechnology Letters, 2008 Vol.30: pp 1983-1988

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明の課題は、形質転換嫌気性菌作製用の形質転換用プラスミドであって、嫌気性菌で機能する分泌シグナルを具有し、しかも、当該嫌気性菌以外の菌で機能する複製開始点を有しない非シャトルプラスミド、該形質転換用

プラスミドで形質転換された形質転換嫌気性菌、該形質転換嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体、該遺伝子輸送担体を含有する医薬組成物、及び該形質転換嫌気性菌を含有する嫌気的疾患治療剤を提供することにある。

[0016] また、本発明の他の課題は、該形質転換用プラスミドで形質転換された形質転換嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体、該遺伝子輸送担体を含有する医薬組成物、及び該耐性菌を含有する嫌気的疾患治療剤を提供することにある。

さらにまた、本発明の他の課題は、例えばビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａなどにおいても機能を発揮する、新規の分泌シグナルを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、先に、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質の中のＣＤを発現する遺伝子を組み込んだプラスミドのｐＢＬＥＳ１００－Ｓ－ｅＣＤ、ｐＡＶ００１－ＨＵ－ｅＣＤ－Ｍ９６８などを作製した。そして、これを用いて組換えた偏性嫌気性菌、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａ／ｐＢＬＥＳ１００－Ｓ－ｅＣＤ、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａ／ｐＡＶ００１－ＨＵ－ｅＣＤ－Ｍ９６８などが有用な悪性腫瘍の治療剤として期待できることを見出し、報告した。（特許文献７、８）

[0018] 上記特許文献７、８の形質転換菌の作製に用いられたプラスミドのｐＢＬＥＳ１００－Ｓ－ｅＣＤやｐＡＶ００１－ＨＵ－ｅＣＤ－Ｍ９６８は、いずれも大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドであることから、これが大腸菌に水平伝達した場合、当該大腸菌で複製されるというおそれがあった。

[0019] しかし、形質転換遺伝子輸送担体を用いる固形腫瘍の治療方法においては、用いる遺伝子輸送担体の形質転換遺伝子が、当該遺伝子輸送担体以外の、病原性菌または好気性若しくは通性嫌気性菌に水平伝達しないこと、さらに、例え水平伝達したとしても、その菌で複製されないことが極めて重要である。このことから、形質転換菌以外の菌で機能する複製開始点を有しない、すなわち、形質転換菌以外の菌とで相互複製することのない非シャトルプラ

スミドであることが求められる。

[0020] そこで本発明者らは、当該課題を解決すべくプラスミドの改良を行い、大腸菌で機能する複製開始点を具有しない非シャトルプラスミドのｐＢｉｆｉＣＤを開発した。（特許文献９）

一方、これらのプラスミドは何れも、分泌シグナルを具有していない形質転換用プラスミドであるため、これを用いて組換えた形質転換菌は発現したＣＤを菌体外に分泌せず、ＣＤの発現量がＣＤ酵素活性、すなわち薬効に直接反映しないという問題が依然として残っていた。

[0021] さらに、ＣＤのようなプロドラッグを抗腫瘍物質に変換する酵素ではなく、抗腫瘍性タンパク質や核酸などを産生する菌の場合には、産生した抗腫瘍物質を菌体外に放出させることが必要となり、そのためには嫌気的疾患組織で増殖した後、菌を殺破壊することが必要であった。このことから、偏性嫌気性菌、特にビフィズス菌で機能する分泌シグナルを具有した形質転換用プラスミドがより好ましいとの結論に至った。そして、鋭意研究を続けた結果、本発明を完成するに至った。

[0022] すなわち本発明は、

［１］形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドであって、嫌気性菌で機能する分泌シグナルを含む発現カセットを具有し、且つ、非シャトルプラスミドである形質転換用プラスミド、

［２］嫌気性菌が、ビフィズス菌である、［１］に記載のプラスミド、

［３］分泌シグナルペプチドが、ビフィズス菌由来である、［１］または［２］に記載の形質転換用プラスミド、

［４］分泌シグナルペプチドが、ビフィドバクテリウム・ロンガム菌由来である、［３］に記載の形質転換プラスミド、

[0023] ［５］分泌シグナルが、配列番号６～２８の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡである、［１］～［４］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

［６］分泌シグナルが、配列番号６、７、８、９、１２、１４、１５、１７、２１、２５若しくは２８の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列である、［５］に記載の形質転換用プラスミド、

[0024] ［７］分泌シグナルが、配列番号８若しくは２５の塩基配列のいずれかで示されるＤＮＡまたはその一塩基変異多型である、［６］に記載の形質転換用プラスミド、

［８］発現カセットに含まれるプロモーターをコードする遺伝子が、配列番号２９～４４のプロモーター領域の塩基配列若しくは配列番号４５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡである、［１］～［７］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

[0025] ［９］発現カセットに含まれるプロモーター遺伝子が、配列番号３５のプロモーター領域の塩基配列もしくは４５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列である、［８］に記載の形質転換用プラスミド、

［１０］発現カセットに含まれるターミネーター遺伝子が、配列番号４６の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡである、［１］～［９］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

[0026] ［１１］発現カセットに含まれる標的遺伝子が、蛍光蛋白質をコードする遺伝子である、［１］～［１０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

［１２］発現カセットに含まれる標的遺伝子が、抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、［１］～［１０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

[0027] ［１３］抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ

－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等のサイトカインおよび、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングル－１、クリングル－２、クリングル－３、クリングル－４、クリングル－５等の血管新生抑制物質からなる群から選ばれる一種である、［１２］に記載の形質転換用プラスミド、

[0028] ［１４］抗腫瘍活性を有する蛋白質が、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－αまたはＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）のいずれかである、［１３］に記載の形質転換用プラスミド、

［１５］標的遺伝子が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、［１］～［１０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

［１６］抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質がシトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよびβ－グルクロニダーゼからなる群から選ばれる一種である、［１５］に記載の形質転換用プラスミド、

[0029] ［１７］標的遺伝子が、虚血性疾患治療活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、［１］～［１０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

［１８］虚血性疾患治療活性を有する蛋白質が、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などの血管新生促進活性を有する蛋白質からなる群から選ばれる一種である、［１７］に記載の形質転換用プラスミド、

［１９］標的遺伝子が、嫌気的疾患の治療活性を有する核酸である、［１］

～［１０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド、

[0030] ［２０］嫌気的疾患の治療活性を有する核酸が、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などからなる群から選ばれる少なくとも1種の腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、［１９］に記載の形質転換用プラスミド、

［２１］配列番号５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡ配列を含む、［１］～［２０］のいずれかに記載の形質転換用プラスミド（pBifi-SP3B-TNF alpha）、

[0031] ［２２］［１］～［２１］のいずれかに記載の形質転換用プラスミドで形質転換された嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体、

［２３］嫌気性菌が、非病原性の腸内細菌である、［２２］に記載の遺伝子輸送担体、

［２４］嫌気性菌が、ビフィズス菌である、［２２］または［２３］に記載の遺伝子輸送担体、

[0032] ［２５］ビフィズス菌が、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アングラタム、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・アステロイデス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ボウム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム、ビフィドバクテリウム・コエリナム、ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ、ビフィドバクテリウム・クニクリ、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス、ビフィドバクテリウム・デンティウム、ビフィドバクテリウム・ガリクム、ビフィドバクテリウム・ガリナラム、ビフィドバクテリウム・グロボサム、ビフィドバクテリウム・インディクム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・イノピナタム、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス、ビフィドバクテリウム・リベロラム、ビフィドバク

テリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・マグナム、ビフィドバクテリウム・メリシクム、ビフィドバクテリウム・ミニマム、ビフィドバクテリウム・モンゴリエンス、ビフィドバクテリウム・パルブロラム、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サイクラエロフィラム、ビフィドバクテリウム・プロラム、ビフィドバクテリウム・ルミナレ、ビフィドバクテリウム・ルミナンチウム、ビフィドバクテリウム・サエクラレ、ビフィドバクテリウム・スカルドヴィ、ビフィドバクテリウム・サブタイル、ビフィドバクテリウム・スイス、ビフィドバクテリウム・テルマシドフィラム、およびビフィドバクテリウム・サーモフィラムからなる群より選ばれる１種である、［２４］に記載の遺伝子輸送担体、

[0033] ［２６］ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、［２５］に記載の遺伝子輸送担体、

［２７］嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、少なくとも１種の、嫌気的疾患の診断若しくは治療に有用な、蛋白質または核酸を発現し、分泌することができる、［２２］～［２６］のいずれかに記載の遺伝子輸送担体、

［２８］嫌気的疾患の診断に有用な蛋白質が、蛍光蛋白質である、［２７］に記載の遺伝子輸送担体、

［２９］嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍活性を有する蛋白質である、［２７］記載の遺伝子輸送担体、

[0034] ［３０］抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（

Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等のサイトカインおよび、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングルー１、クリングルー２、クリングルー３、クリングルー４、クリングルー５等の血管新生抑制物質からなる群から選ばれる一種である、［２８］に記載の遺伝子輸送担体、

[0035] ［３１］嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質である、［２７］に記載の遺伝子輸送担体、

［３２］抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質がシトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよびβ－グルクロニダーゼからなる群から選ばれる一種である、［３１］に記載の遺伝子輸送担体、

［３３］嫌気的疾患の治療に有用な核酸が、嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、［２７］に記載の遺伝子輸送担体、

[0036] ［３４］嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓが、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などからなる群から選ばれる少なくとも1種の腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、［３３］に記載の遺伝子輸送担体、

［３５］［２２］～［３４］のいずれかに記載の遺伝子輸送担体を含有する医薬組成物、

［３６］ビフィドバクテリウム・ロンガム菌由来の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、

[0037] ［３７］配列番号６～２８の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡ配列を含む、［３６］に記載の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、

［３８］［３６］または［３７］に記載のＤＮＡでコードされる分泌シグナルペプチド、

［３９］［３６］または［３７］に記載のＤＮＡを含む、形質転換用プラスミド、

[0038] ［４０］さらに、嫌気的疾患の診断または治療に有用なタンパク質または核酸をコードするＤＮＡを含む、［３９］に記載の形質転換用プラスミド、

［４１］嫌気的疾患の診断に有用な蛋白質が、蛍光蛋白質である、［４０］に記載の形質転換用プラスミド、

［４２］嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍活性を有する蛋白質である、［４０］記載の形質転換用プラスミド、

[0039] ［４３］抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等のサイトカインおよび、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングル－１、クリングル－２、クリングル－３、クリングル－４、クリングル－５等の血管新生抑制物質からなる群から選ばれる一種である、［４２］に記載の形質転換用プラスミド、

[0040] ［４４］嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質である、［４０］に記載の形質転換用プラスミド、

［４５］抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質がシトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよびβ－グルクロニダーゼからなる群から選ばれる一種である、［４４］に記載の形質転換用プラスミド、

［４６］嫌気的疾患の治療に有用な核酸が、嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、［４０］に記載の形質転換用プラスミド、

[0041] ［４７］嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓが、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などからなる群から選ばれる少なくとも1種の腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、［４６］に記載の形質転換用プラスミド、

［４８］［３９］～［４７］のいずれかに記載の形質転換用プラスミドで形質転換された嫌気性菌である、遺伝子輸送担体、

［４９］嫌気性菌が、ビフィズス菌である、［４８］に記載の遺伝子輸送担体、

[0042] ［５０］ビフィズス菌が、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アングラタム、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・アステロイデス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ボウム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム、ビフィドバクテリウム・コエリナム、ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ、ビフィドバクテリウム・クニクリ、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス、ビフィドバクテリウム・デンティウム、ビフィドバクテリウム・ガリクム、ビフィドバクテリウム・ガリナラム、ビフィドバクテリウム・グロボサム、ビフィドバクテリウム・インディクム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・イノピナタム、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス、ビフィドバクテリウム・リベロラム、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・マグナム、ビフィドバクテリウム・メリシクム、ビフィドバクテリウム・ミニマム、ビフィドバクテリウム・モンゴリエンス、ビフィドバクテリウム・パルブロラム、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サイクラエロフィラム、ビフィドバクテリウム

・プロラム、ビフィドバクテリウム・ルミナレ、ビフィドバクテリウム・ルミナンチウム、ビフィドバクテリウム・サエクラレ、ビフィドバクテリウム・スカルドヴィ、ビフィドバクテリウム・サブタイル、ビフィドバクテリウム・スイス、ビフィドバクテリウム・テルマシドフィラム、およびビフィドバクテリウム・サーモフィラムからなる群より選ばれる１種である、［４９］に記載の遺伝子輸送担体、

[0043] ［５１］ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、［５０］に記載の遺伝子輸送担体、

［５２］［４８］～［５１］のいずれかに記載の遺伝子輸送担体を含有する、医薬組成物に関する。

発明の効果

[0044] 本発明のプラスミドは、分泌シグナルを有する発現カセットを具有し、かつ非シャトルプラスミドである、固形腫瘍等の嫌気的疾患治療用形質転換嫌気性菌作製に有用な新規プラスミドである。本発明のプラスミドは、形質転換菌以外の菌で機能する複製開始点を具有せず、形質転換菌以外の菌とで相互複製することのない非シャトルプラスミドであるため、極めて安全なベクターである。

[0045] そして、本発明の形質転換用プラスミドで形質転換した嫌気性菌は、嫌気的疾患組織特異的に生着、増殖し、当該疾患組織において、嫌気的疾患の治療活性を有する蛋白質または核酸を産生、分泌させることができ、嫌気的疾患治療剤として極めて有用で、高品質の遺伝子輸送担体として期待できる。

さらに、本発明の新規な分泌シグナルは、上記のように、プラスミドに挿入すること以外に、これを直接嫌気性菌のゲノムに組み込むことによって、嫌気的疾患治療用として有用な、形質転換嫌気性菌を作製することもできる。

図面の簡単な説明

[0046] [図1]図１は、分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSPxA-GFP）の構築概要を示すマップ図である。

[図2]図２は、分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSPxB-GFP）の構築概要を示すマップ図である。

[図3]図３は、分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSec2-GFP）の構築概要を示すマップ図である。

[図4]図４は、B.longum 105A/pSP3B-GFP、B.longum 105A/pSP7B-GFP、B.longum 105A/ pSP23B-GFP、B.longum 105A/pSP7A-GFPおよびB.longum 105A/pSec2-GFPのウェスタンブロッティングの結果を示す図である。図中、Ｃは細胞内タンパク抽出物のレーンを、Ｔは培養上清濃縮物のレーンを、縦軸の数値は分子量（kDa）を表す。

[0047] [図5]図５は、分泌型ＴＮＦα発現プラスミド（pSPxA-TNF alpha）の構築概要を示すマップ図である。

[図6]図６は、分泌型ＴＮＦα発現プラスミド（pSPxB-TNF alpha）の構築概要を示すマップ図である。

[図7]図７は、分泌型ＴＮＦα発現プラスミド（pSec2-TNF alpha）の構築概要を示すマップ図である。

[図8]図８は、B.longum 105A/pSP1B-TNF alpha、 B.longum 105A/pSP3B-TNF alpha、B.longum 105A/pSP4B-TNF alpha、B.longum 105A/pSP7B-TNF alpha、B.longum 105A/pSP12B-TNF alpha、 B.longum 105A/pSP16B-TNF alpha、B.longum 105A/pSP23B-TNF alpha、B.longum 105A/pSP7A-TNF alphaおよび B.longum 105A/pSec2-TNF alphaのウェスタンブロッティングを示す図である。図中、Ｃは細胞内タンパク質抽出物のレーンを、Ｔは培養上清濃縮物のレーンを、Ｓは培養上清のレーンを、縦軸の数値は分子量（kDa）を表す。

[0048] [図9]図９は、B.longum 105Aおよび B.longum 105A/pTNF3のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。縦軸の数値は分子量（kDa）を表す。

[図10]図１０は、プラスミドpBifi-SP3B-TNF alpha構築の概要を示すマップ図である。

[図11]図１１は、Bifidobacterium longum 105A/ pBifiSP3B-TNF alphaのウェスタンブロッティングを示す図である。レーン１の分子量マーカーは、下

からそれぞれ２０、３０、４０、５０、６０および８０ｋＤａである。

[図12]図１２は、ＴＮＦα発現プラスミド（pTNF3）の構築概要を示すマップ図である。

[0049] [図13]図１３は、インサートを含まないタンパク質発現ユニットを持つモックプラスミド（pBEshuttle）の構築概要を示すマップ図である。

[図14]図１４は、ＴＮＦαの細胞毒性試験の結果を示すグラフである。

[図15]図１５は、分泌型ＴＮＦα発現プラスミドB.longum 105A/pSP3B-TNF alphaおよびB.breve/pSP3B-TNF alphaの、マウスでのin vivo抗腫瘍効果測定実験における腫瘍体積の経日的変化の結果を示すグラフである。

[図16]図１６は、分泌型ＴＮＦα発現プラスミドB.longum 105A/pSP3B-TNF alphaの、アドリアマイシン併用下でのマウスでのin vivo抗腫瘍効果測定実験における腫瘍体積の経日的変化の結果を示すグラフである。

[図17]図１７は、非分泌型ヒトＩＬ－１８発現プラスミドphIL18mut-Hisの構築概要を示すマップ図である。

[図18]図１８は、分泌型ヒトＩＬ－１８発現プラスミドpSP3B-hIL18mutの構築概要を示すマップ図である。

発明を実施するための形態

[0050] 本願明細書において非シャトルプラスミドとは、形質転換対象の嫌気性菌で機能する複製開始点のみを具有し、それ以外の菌で機能する複製開始点を具有せず、形質転換嫌気性菌と形質転換嫌気性菌以外の菌とで相互複製することのないプラスミドを意味する。

本願明細書において分泌シグナルとは、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるＤＮＡ断片(単に、分泌シグナルペプチド遺伝子ということもある)を意味する。

[0051] 本願明細書においては、抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ、および、虚血性疾患治療活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡなどを、「目的蛋白質をコードするＤＮＡ」という場合もある。

[0052] 本願明細書において「ｓｉＲＮＡｓ」とは、小型干渉ＲＮＡ（small interfering RNA）または短鎖干渉ＲＮＡ（short interfering RNA）と呼ばれるｓｉＲＮＡおよび、標的細胞内でダイサー（Dicer）などの酵素によって切断されてｓｉＲＮＡになる短鎖ヘアピンＲＮＡ（short hairpin RNA、ｓｈＲＮＡ）のいずれも含むものを意味する。また、ｓｉＲＮＡ修飾体およびｓｉＲＮＡ複合体を含めて総称するときもある。

[0053] 本願明細書において「発現カセット」とは、プロモーター、発現蛋白質をコードする遺伝子（標的遺伝子）、ターミネーターなどの発現ユニットを含み、さらに任意に他の有用なユニットを含んでもよい、特定の蛋白質またはペプチド断片を発現させるための遺伝子のセットをいう。他の有用なユニットとしては、例えば分泌シグナルなどのシグナルペプチドをコードする遺伝子、標識蛋白質をコードする遺伝子などが挙げられる。

[0054] 本発明は、形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドであって、嫌気性菌で機能する分泌シグナルを含む発現カセットを具有し、且つ、非シャトルプラスミドである形質転換用プラスミドに関する。

固形腫瘍や虚血性疾患等の疾患部位が嫌気的環境下にある疾患（以下、嫌気的疾患という）の治療に用いる形質転換遺伝子輸送担体としては、安全性の観点から非病原性であることが求められる。

さらに、嫌気的状態にある疾患組織等だけにおいて生着、増殖し、嫌気的状態ではない正常な組織では生着、増殖しない偏性嫌気性菌であることがより好ましい。

[0055] 本発明者らは先に、偏性嫌気性菌のビフィズス菌を用いる悪性腫瘍の治療方法について研究を重ね、プロドラッグの５－ＦＣを抗腫瘍物質の５－ＦＵに変換する酵素のＣＤの遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａを開発した。（特許文献７、８）

これらの形質転換ビフィズス菌は、嫌気的疾患の固形腫瘍モデル動物に静脈内投与した場合、低酸素状態にある嫌気的疾患組織特異的に生着、増殖し、低酸素状態にない正常組織では速やかに消失することが確認されている。

（非特許文献１、２参照）

[0056] しかしながら、上記特許文献７、８の形質転換ビフィズス菌は、大腸菌－ビフィズス菌のシャトルプラスミドのｐＢＬＥＳ１００－Ｓ－ｅＣＤやｐＡＶ００１－ＨＵ－ｅＣＤ－Ｍ９６８などを用いて形質転換されていることから、大腸菌に水平伝達した場合、その大腸菌で複製されるというおそれがあった。

そこで本発明者らは、当該課題を解決すべくプラスミドの改良を行い、大腸菌で機能する複製開始点を具有しない非シャトルプラスミドのｐＢｉｆｉＣＤを開発した。（特許文献９）

[0057] これらの形質転換菌を用いる悪性腫瘍の治療方法、すなわち、酵素－プロドラッグ療法（ＣＤ－５－ＦＣ療法）においては、抗腫瘍物質の５－ＦＵの副作用をできる限り抑えるために、抗腫瘍物質の５－ＦＵが腫瘍組織特異的に作用することが望ましいことから、本発明者らは、産生したＣＤを菌体外に分泌することなく、菌体内に取り込まれた５－ＦＣを５－ＦＵに変換して菌体外に排出して、５－ＦＵの抗腫瘍作用を腫瘍組織のみで発揮するように、これらの形質転換ビフィズス菌をいずれも分泌シグナルを具有していないプラスミドで形質転換した。

[0058] これらの分泌シグナルを具有していないプラスミドで形質転換したビフィズス菌は、低酸素状態にある嫌気的疾患組織特異的に生着、増殖するという特長と、酵素のＣＤが嫌気的疾患組織特異的に生着、増殖した菌の内部に留まるという特長の両面から、抗腫瘍物質の５－ＦＵの全身的な副作用を解消できるという利点を有していたが、その一方で、５－ＦＵの生成量が、形質転換ビフィズス菌が産生するＣＤ量ではなく、菌体内に取り込まれる５－ＦＣ量と相関し、産生したＣＤの酵素機能が十分に発揮されないという問題点も同時に見出した。

[0059] さらには、ＣＤのようなプロドラッグを抗腫瘍物質に変換する酵素ではなく、抗腫瘍性タンパク質や核酸などを産生する菌の場合には、産生した抗腫瘍物質を菌体外に放出させるために、嫌気的疾患組織で増殖した後、菌を殺

破壊することが必要であった。

これらの問題点の解決のため、嫌気性菌、好ましくは非病原性の偏性嫌気性菌で機能し、産生した活性物質を分泌させるための分泌シグナルを具有するプラスミドの開発に着手し、当該プラスミド作製に有用な、少なくとも嫌気性菌で機能し、優れた発現蛋白質の分泌作用を示す、分泌シグナルペプチドの開発を行った。

[0060] また、形質転換遺伝子輸送担体を用いる固形腫瘍等の治療方法においては、上記のとおり、用いる遺伝子輸送担体の形質転換遺伝子が、当該遺伝子輸送担体以外の、病原性菌または好気性若しくは通性嫌気性菌に水平伝達しないこと、さらに、例え水平伝達したとしても、その菌で複製されないことも極めて重要である。

従って、上記、分泌シグナルを具有するプラスミドについては、形質転換菌以外の菌で機能する複製開始点を有しない非シャトルプラスミドであることが好ましい。

[0061] 本発明のプラスミドは、形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドであって、少なくとも嫌気性菌で機能する分泌シグナルを含む発現カセットを具有するプラスミドである。しかも、形質転換菌以外の菌で機能する複製開始点を具有せず、形質転換菌以外の菌とで相互複製しない非シャトルプラスミドである。

より具体的には、少なくともビフィズス菌で機能し、優れた分泌作用を示す分泌シグナルを有する発現カセットを具有しており、且つ、形質転換菌以外の菌で機能する複製開始点を具有せず、形質転換菌以外の菌とで相互複製することのない、形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドである。

[0062] 本発明の形質転換用プラスミドは、これを用いることにより、任意の目的蛋白質または核酸を発現し、さらに発現カセットに含まれる分泌シグナルペプチドの働きにより、優れた、実用性の高い分泌機能を発揮することができる形質転換嫌気性菌を作製できるという点に特徴を有するものである。

さらに本発明の形質転換用プラスミドは、形質転換菌以外の菌で機能する

複製開始点を具有せず、形質転換菌以外の菌とで相互複製することのない、非シャトルプラスミドベクターであるという点に特徴を有するものである。

[0063] これまでに、嫌気性菌、特にビフィズス菌で機能するシグナルペプチドとして、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのアミラーゼやビフィドバクテリウム・ブレーベのＳｅｃ１、Ｓｅｃ２、Ｓｅｃ３などが報告されており、それらの分泌シグナルを導入したプラスミドも報告されている。しかしながら、これらのプラスミドで形質転換したビフィズス菌は目的タンパクの分泌量が少ないものと推測された。

[0064] しかも、当該ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのアミラーゼの分泌シグナルおよびプロモーター領域をクローニングし、これらと、ＵＶ最適化緑色蛍光タンパク質変異体（ＧＦＰｕｖ；CLONTECH Laboratories, Inc.）をコードする遺伝子を組み合わせたプラスミドを作製し、そのプラスミドを用いて形質転換したビフィドバクテリウム・ロンガム菌について、発現蛋白質（ＧＦＰ）の分泌機能を確認したところ、ＧＦＰの分泌機能を示さず、この分泌シグナルペプチドは任意の目的タンパク質を分泌できるものではないものと推定された。

[0065] さらに、これまでに報告されている発現蛋白質を菌体外に分泌する形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドベクターは、大腸菌由来のプラスミドと形質転換菌由来のプラスミドを融合した、大腸菌と形質転換菌との双方で機能するシャトルベクターであり、大腸菌以外の形質転換菌のみで機能する形質転換用プラスミドは報告されていない。

[0066] 本発明の形質転換用プラスミドが具有する、嫌気性菌で機能する分泌シグナルペプチドは、少なくとも嫌気性菌で機能する分泌シグナルペプチドであればいかなるものでも用いることができるが、好ましくはビフィズス菌で機能するものである。形質転換菌への毒性や機能性の観点から、ビフィズス菌由来の分泌シグナルペプチドがより好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガム菌由来の分泌シグナルペプチドがさらに好ましい。ビフィドバクテリウム・ロンガム菌由来の分泌シグナルペプチドとしては、例えば、配列番号６

～２８のいずれかの塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡによってコードされる分泌シグナルペプチドなどを例示することができる。これらの中で、分泌機能の高さから、配列番号６、７、８、９、１２、１４、１５、１７、２１、２５または２８のいずれかの塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡでコードされる分泌シグナルペプチドが好ましく、配列番号８または２５のいずれかの塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡでコードされる分泌シグナルペプチドが最も好ましい。

[0067] また、本発明の形質転換用プラスミドが具有する、発現カセット中のプロモーターとしては、嫌気性菌で機能し、分泌シグナルペプチドのプロモーターとして機能するものであればいかなるものでもよく、例えば、ビフィズス菌由来の分泌シグナルペプチドの上流に隣接しているプロモーター（promoter X）またはビフィズス菌で機能するヒストン様ＤＮＡ結合蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター（HU promoter）などが挙げられる。具体的には、配列番号２９～４４のいずれかで示される塩基配列のプロモーター領域のＤＮＡおよび配列番号４５で示される塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のＤＮＡでコードされるプロモーターが挙げられる。これらの中で、配列番号３５で示される塩基配列のプロモーター領域のＤＮＡ若しくはその一塩基変異多型でコードされるプロモーターまたはＨＵプロモーターが好ましく、ＨＵプロモーターがより好ましく、配列番号４５の塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡでコードされるプロモーターが最も好ましい。

[0068] さらに、本発明の形質転換用プラスミドが具有するターミネーターとしては、ビフィズス菌で機能し、分泌シグナルペプチドのターミネーターとして機能するものであればいかなるものでもよいが、ビフィズス菌で機能するヒストン様ＤＮＡ結合蛋白質をコードする遺伝子のターミネーター（HU termin

ator）が好ましく、特に、配列番号４６の塩基配列またはその１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡが最も好ましい。

[0069] なお、本発明で言う「一塩基変異体」とは、少なくとも１箇所の塩基が変異した一塩基変異多型（以下、ＳＮＰという）を意味し、１箇所のみでのＳＮＰだけでなく、複数個所でのＳＮＰを含む。したがって、「１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列」と相互に置き換え可能である。

[0070] 本発明の形質転換用プラスミドが具有する分泌させる目的の蛋白質または核酸をコードする遺伝子（すなわち標的遺伝子）としては、例えば、蛍光蛋白質をコードする遺伝子、抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、虚血性疾患治療活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子などの遺伝子であれば、いかなるものでも用いることができる。

蛍光蛋白質としては、各種の緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）などを挙げることができる。

[0071] また、抗腫瘍活性を有する蛋白質としては、例えばサイトカインが挙げられ、具体的なサイトカインとしては、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、β、γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、１β、２、３、４、６、７、１０、１２、１３、１５、１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等が挙げられる。

[0072] また、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングル－１、２、３、４、５等の血管新生抑制物質も挙げられる。

抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質としては、５－フルオロシトシン（以下、５－ＦＣという）を抗腫瘍活性物質の５－フルオロウラシル（以下、５－ＦＵという）に変換する酵素のシトシン・デアミナーゼ（以下、ＣＤという）や、５－アジリジノ－２，４－ジニトロベンズアミド（以下、ＣＢ１９４５という）を抗腫瘍活性アルキル化剤に変換する酵素のニトロリダクターゼや、ガンシクロビルを抗腫瘍活性代謝物に変換する酵素の単純ヘルペスウイルス１型チミジンキナーゼ（以下、ＨＳＶ１－ＴＫという）や、グルクロン酸抱合抗腫瘍活性物質を抗腫瘍活性物質に変換する酵素のβ－グルクロニダーゼなどを挙げることができる。

[0073] さらに、虚血性疾患治療活性を有する蛋白質としては、虚血性疾患治療に有用な血管新生促進活性を有する蛋白質挙げることができ、具体的には、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などを挙げることができる。

これらの蛋白質の配列は様々な生物において知られており、その配列情報に基づいてＰＣＲ法や人工遺伝子合成等の公知の手法を利用することにより、目的の蛋白質をコードするＤＮＡを入手することができる。

[0074] また、嫌気的環境下にある疾患の治療活性を有する核酸としては、嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓを挙げることができ、より具体的には、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などの腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓを挙げることができる。

同様に、これらの核酸の配列も知られており、その配列情報に基づいてＰＣＲ法等の公知の手法を利用することにより、入手することができる。

[0075] 本発明のプラスミドは、例えば、以下のようにして作製することができる。

例えば、通常の手法に従って、形質転換菌と形質転換菌以外の菌、例えば大腸菌でそれぞれ機能する複製開始点を有するシャトルプラスミドに、少な

くともビフィズス菌で機能する分泌シグナルおよびそのプロモーター遺伝子と、その下流に、少なくとも１種の、所望の嫌気的疾患の診断または治療に有用な蛋白質をコードする遺伝子または核酸（標的遺伝子）と、さらにその下流に、嫌気性菌で機能するターミネーター遺伝子を挿入する事により、シャトルプラスミドを作製することができる。

[0076] さらに、所望に応じて、このシャトルプラスミドから形質転換菌以外の菌の複製開始点を除去することにより、非シャトルプラスミドを作製することができる。

なお、各工程における操作は、文献記載等の公知の方法に準じて行うことができる。

本発明の嫌気的疾患治療用遺伝子輸送担体は、形質転換する任意の嫌気性菌を、上記本発明の形質転換用プラスミドを用いて、遺伝子工学分野の公知の方法にしたがって形質転換する事により作製することができる。

[0077] 本発明の形質転換用プラスミドで形質転換された嫌気性菌は、固形腫瘍等の嫌気的疾患の治療剤に用いるものであるから、偏性嫌気性で且つ非病原性であることが必須であり、クロストリジウムやサルモネラなどの病原性の菌であっても非病原性化したものであればよく、また、ラクトバチルスなどの通性嫌気性菌であっても偏性嫌気性に変異化したものであればよい。

好ましくは非病原性の嫌気性バクテリアが挙げられ、より好ましくは非病原性の腸内細菌が挙げられ、中でも、ビフィドバクテリウム属細菌が最も好ましい。

[0078] ビフィドバクテリウム属細菌としては、例えばビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アングラタム、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・アステロイデス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ボウム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム、ビフィドバクテリウム・コエリナム、ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ、ビフィドバクテリウム・クニクリ、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス、ビフィ

ドバクテリウム・デンティウム、ビフィドバクテリウム・ガリクム、ビフィドバクテリウム・ガリナラム、ビフィドバクテリウム・グロボサム、ビフィドバクテリウム・インディクム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・イノピナタム、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス、ビフィドバクテリウム・リベロラム、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・マグナム、ビフィドバクテリウム・メリシクム、ビフィドバクテリウム・ミニマム、ビフィドバクテリウム・モンゴリエンス、ビフィドバクテリウム・パルブロラム、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サイクラエロフィラム、ビフィドバクテリウム・プロラム、ビフィドバクテリウム・ルミナレ、ビフィドバクテリウム・ルミナンチウム、ビフィドバクテリウム・サエクラレ、ビフィドバクテリウム・スカルドヴィ、ビフィドバクテリウム・サブタイル、ビフィドバクテリウム・スイス、ビフィドバクテリウム・テルマシドフィラム、ビフィドバクテリウム・サーモフィラムなどが挙げられ、ビフィドバクテリウム・ロンガムが最も好ましい。

[0079] これらの菌は、いずれも市販されているか、又は寄託機関から容易に入手することができる。例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムＡＴＣＣ－１５７０７、ビフィドバクテリウム・ビフィダムＡＴＣＣ－１１８６３、ビフィドバクテリウム・インファンティスＡＴＣＣ－１５６９７等は、ＡＴＣＣ（The American Type Culture Collection ）から容易に入手することができる。

また、それぞれの菌の株についても特に限定されず、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムの株については、ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株、ビフィドバクテリウム・ロンガムａＥ－１９４ｂ株、ビフィドバクテリウム・ロンガムｂｓ－６０１株、ビフィドバクテリウム・ロンガムＭ１０１－２株を挙げることができ、中でもビフィドバクテリウム・ロンガム１０５－Ａ株が好ましい。

[0080] ビフィドバクテリウム・ブレーベの株については、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株（ＪＣＭ１１９２）、ビフィドバクテリウム・ブレーベａＳ－１株、ビフィドバクテリウム・ブレーベＩ－５３－８W株を挙げることができ、中でも、ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株、ビフィドバクテリウム・ブレーベａＳ－１株が好ましい。

ビフィドバクテリウム・インファンティスの株については、例えば、ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株（ＪＣＭ１２２２）、ビフィドバクテリウム・インファンティスＩ－１０－５株を挙げることができ、中でも、ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株、ビフィドバクテリウム・インファンティスＩ－１０－５株が好ましい。

[0081] また、ビフィドバクテリウム・ラクテンティスの株については、例えば、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス標準株（ＪＣＭ１２１０）を挙げることができる。

本発明の遺伝子輸送担体は、本発明の形質転換用プラスミドで形質転換された上記の嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体であり、嫌気的環境下にある組織内で生育でき、且つ、目的とする活性を有する蛋白質を発現することができ、さらに、形質転換菌以外の、特に病原性又は好気性菌若しくは通性嫌気性菌への水平伝達のおそれのないものである。

[0082] 本発明の遺伝子輸送担体の作製は、市販の実験書、例えば、遺伝子マニュアル（講談社）、高木康敬編遺伝子操作実験法（講談社）、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）（1982）、モレキュラー・クローニング第２版（Molecular Cloning, 2nd ed.）コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）（1989）、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymol.）, 194（1991）、等に記載された方法に従って行うことができる。

[0083] 本発明の医薬組成物は、本発明の遺伝子輸送担体を含有している限り特に制限はされない。また、本発明の嫌気的疾患治療剤は、本発明の遺伝子輸送

担体を含有している限り特に制限はされない。

また、本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤は、本発明の遺伝子輸送担体の２種以上を含有していてもよい。

[0084] さらに、本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤は、本発明の遺伝子輸送担体以外の嫌気的疾患治療効果を示す化合物を含有する医薬組成物や嫌気性疾患治療剤と組み合わせて用いることができる。

また、本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤は、本発明の効果を妨げない限り、本発明の遺伝子輸送担体のほかに任意の成分を含有していてもよい。そのような任意成分として、例えば、薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。

[0085] 本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤の剤型は特に制限されないが、例えば、本発明の遺伝子輸送担体を含有する液剤あるいは固形製剤を挙げることができる。液剤は、本発明の遺伝子輸送担体の嫌気性菌の培養液を精製し、これに必要に応じて適当な生理食塩液若しくは補液又は医薬添加物を加えてアンプル又はバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。また、固形製剤は、液剤に適当な保護剤を添加してアンプル又はバイアル瓶などに充填した後凍結乾燥又はＬ乾燥するか、液剤に適当な保護剤を添加して凍結乾燥又はＬ乾燥した後これをアンプル又はバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤の投与方法としては、経口投与、非経口投与共に可能であるが、非経口投与が好ましく、例えば静脈注射、皮下注射、局所注入、脳室内投与等を行うことができ、静脈注射が最も好ましい。

[0086] 本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤の遺伝子輸送担体の投与量は、疾患部位において生育でき、且つ、有効治療量の活性蛋白質を発現するのに十分な量である限り特に制限はされないが、経済上の観点及び副作用を可能な限り回避する観点から、必要な治療効果が得られる範囲においてできる限り少ない方が好ましい。

本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤における遺伝子輸送担体の投与量

は、疾患の程度、患者の体重、年齢、性別に応じて適宜選択し、改善の度合いに応じて適宜増減することができる。

[0087] 例えば、本発明の嫌気的疾患治療剤を固形腫瘍治療剤として用いる際には、用いる嫌気性菌の菌自体が示す抗腫瘍活性、用いる嫌気性菌が産生する抗腫瘍活性を有する蛋白質等の種類、抗腫瘍物質前駆体から変換される抗腫瘍物質の有効治療量、および用いる嫌気性菌の当該活性蛋白質の産生量などによって、適宜設定する。

[0088] 具体的には、例えば静脈内投与の場合には、特に、菌塊による塞栓等のリスクを低減することが求められるため、できるだけ低濃度の注射用製剤を複数回に分けて分注するか、または適当な補液で希釈して持続注入することが好ましい。例えば、成人の場合、本発明の嫌気性菌の菌体を、体重１ｋｇ当たり10^{6}～10^{12}ｃｆｕを１日１～複数回に分け、１～複数日間、連続してまたは適宜、間隔をおいて投与する。より具体的には、本発明のビフィズス菌の菌体を10^{4}～10^{10}ｃｆｕ／ｍＬ含有する製剤を、成人１人あたり１～１０００ｍＬを直接、または適当な補液で希釈して、１日１～数回に分け、１～数日連続して投与する。

[0089] また、疾患組織へ直接投与する局所投与の場合は、できるだけ疾患組織全体へ菌が生着、増殖することが求められるため、高濃度の注射剤を、疾患組織の複数個所に投与することが望ましい。例えば、成人の場合、本発明のビフィズス菌の菌体を、体重１ｋｇ当たり10^{6}～10^{12}ｃｆｕを１日１～複数回、必要に応じ１～複数日間、連続してまたは適宜、間隔をおいて投与する。より具体的には、本発明のビフィズス菌の菌体を10^{4}～10^{10}ｃｆｕ／ｍＬ含有する製剤を、成人１人あたり１～１０００ｍＬを直接、１日数回、必要に応じ１～数日連続して投与する。

[0090] 治療期間中に疾患組織中の菌が消失していることが確認された場合は、一旦治療を中断し、上記と同様にして菌を投与する。

なお、本発明における「ＸとＹと組み合わせてなる」には、ＸとＹを別の形態としたもの、ＸとＹを同一の形態（例えばＸとＹを含有する形態）とし

たもののいずれの場合も含む。また、ＸとＹを別の形態としたものの場合、Ｘ、Ｙのいずれも他の成分をさらに含有している場合も含まれる。

[0091] 本発明の医薬組成物や嫌気的疾患治療剤は、嫌気的環境下にある疾患、好ましくは各種固形癌に適用できる。固形癌としては、例えば大腸癌、脳腫瘍、頭頚部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、膵島細胞癌、絨毛癌、結腸癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、精巣癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫、メラノーマ、扁平上皮癌などが挙げられる。

[0092] また、嫌気的環境下にある他の疾患としては、虚血性疾患、例えば、心筋梗塞または閉塞性動脈硬化症や、バージャー病などの下肢虚血疾患等を挙げることができる。

また、本発明は、特に上記のプラスミド、遺伝子輸送担体または医薬組成物に用いるのに有用な、新規な分泌シグナルペプチドもまた包含する。本発明者らはまず、ビフィズス菌で機能し、優れた発現蛋白質の分泌作用を示す、分泌シグナルペプチドを見出すべく、上記形質転換ビフィズス菌の親株であるビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａのゲノム解析を行い、分泌シグナルを有し、且つ、膜貫通領域を持たない分泌タンパク質と推測されるタンパク質を２５種選び出した。２５種のタンパク質の中で、分泌シグナルがプロモーターと隣接しているものが１６種、分泌シグナルがプロモーターと隣接していないものが９種であった。

[0093] ２５種のタンパク質のコード領域の塩基配列を精査して、２５種の分泌タンパク質のうち、不完全なタンパク質コード配列（ＣＤＳ）と推測される３個（No.17、18、20）を除いた２２個(No.1～16、19、21～25）について、分泌シグナルおよびプロモーターと推定される領域のクローニングを以下のようにして行った。

[0094] 分泌シグナルがプロモーターと隣接している１６種のタンパク質については、そのプロモーター（promoter X）および分泌シグナル（以下、ＳＰｘＡ

）と推定される領域をクローニングし、これらと、ＵＶ最適化緑色蛍光タンパク質変異体（ＧＦＰｕｖ；CLONTECH Laboratories, Inc.）をコードする遺伝子、および、上記特許文献７～９記載のプラスミド作製で用いたビフィズス菌のヒストン様ペプチド（ＨＵ）のターミネーター（HU terminator）を組み合わせたプラスミドを作製し、そのプラスミド（ｐＳＰｘＡ）を用いて形質転換したビフィズス菌について、発現蛋白質（ＧＦＰ）の分泌機能を確認した。

[0095] また、分泌シグナルがプロモーターと隣接していない残り９種のタンパク質を含む２２種のタンパク質全部について、プロモーター領域を含まない分泌シグナル（以下、ＳＰｘＢ）領域をクローニングし、上記ビフィズス菌のヒストン様ペプチド（HU）のプロモーター（HU promoter）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする遺伝子、および、上記ビフィズス菌のヒストン様ペプチド（ＨＵ）のターミネーター（HU terminator）と組み合わせたプラスミドを作製し、上記と同様に、そのプラスミド（ｐＳＰｘＢ）を用いて形質転換したビフィズス菌について、発現蛋白質（ＧＦＰ）の分泌機能を確認した。

[0096] その結果、１２種のプラスミド（ｐＳＰ７Ａ-GFP, ｐＳＰ１２Ａ-GFP, ｐＳＰ１Ｂ-GFP, ｐＳＰ２Ｂ-GFP, ｐＳＰ３Ｂ-GFP, ｐＳＰ４Ｂ-GFP, ｐＳＰ７Ｂ-GFP, ｐＳＰ９Ｂ-GFP, ｐＳＰ１０Ｂ-GFP, ｐＳＰ１２Ｂ-GFP, ｐＳＰ１６Ｂ-GFP, ｐＳＰ２３Ｂ-GFP）で分泌傾向が認められ、４種のプラスミド（ｐＳＰ７Ａ-GFP, ｐＳＰ３Ｂ-GFP, ｐＳＰ７Ｂ-GFP, ｐＳＰ２３Ｂ-GFP）で優れた発現蛋白質の分泌機能を示すことを確認した。

[0097] また、そのほかに、該ビフィドバクテリウム・ロンガム１０５Ａのゲノム解析において、ビフィドバクテリウム・ブレーベで分泌が報告されているＳｅｃ２の遺伝子(Laura E. MacConaill et al., Applied and Environmental Microbiology, 2003 Vol. 69: pp6994-7001)と、アミノ酸レベルで相同性の高い塩基配列を示す蛋白質の検索を行い、その分泌シグナルペプチドについても、検討を行った。すなわち、当該分泌シグナルペプチドをコードする遺

伝子と上記ビフィズス菌のヒストン様ペプチド（ＨＵ）のプロモーター（HU promoter）遺伝子を組み合わせてクローニングし、これらと、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする遺伝子、および、上記ビフィズス菌のヒストン様ペプチド（ＨＵ）のターミネーター（HU terminator）を組み合わせたプラスミドを作製し、上記と同様に、そのプラスミド（ｐＳｅｃ２－GFP）を用いて形質転換したビフィズス菌について、発現蛋白質（ＧＦＰ）の分泌機能を確認したところ、優れた発現蛋白質の分泌機能を示すことを確認した。

[0098] 次に、上記で分泌傾向が認められた１３種のプラスミドについて、ＧＦＰをコードする遺伝子に代えて別の目的タンパク質のヒトＴＮＦ－αをコードする遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、それらのプラスミドを用いてビフィズス菌を形質転換し、その発現蛋白質分泌機能を確認した。

その結果、９種のプラスミド（ｐＳＰ７Ａ-TNFα，ｐＳＰ１Ｂ-TNFα，ｐＳＰ３Ｂ-TNFα，ｐＳＰ４Ｂ-TNFα，ｐＳＰ７Ｂ-TNFα，ｐＳＰ１２Ｂ-TNFα，ｐＳＰ１６Ｂ-TNFα，ｐＳＰ２３Ｂ-TNFα，ｐＳｅｃ２B-TNFα）で分泌機能を示し、２種のプラスミド（ｐＳＰ３Ｂ-TNFα，ｐＳＰ２３Ｂ-TNFα）で、特に優れた発現蛋白質の分泌機能を示すことを確認した。

[0099] さらに、これらのプラスミドから、ビフィズス菌以外の菌で機能する複製開始点、例えば、ｐＵＣ　Ｏｒｉを取り除いたプラスミドを作製した。そして、そのプラスミドを用いて形質転換したビフィズス菌について、発現蛋白質の分泌機能を確認したところ、ビフィズス菌以外の菌で機能する複製開始点のｐＵＣ　Ｏｒｉを取り除いたプラスミドも、同様に優れた発現蛋白質の分泌機能を発揮させ得ることを確認できた。

[0100] かくして、少なくともビフィズス菌で機能し、優れた発現蛋白質の分泌作用を示す、新規な分泌シグナルペプチドを見出した。

上述のように、本発明の分泌シグナルペプチドは優れた分泌活性を有し、また非病原性の偏性嫌気性菌であるビフィズス菌で機能するため、上記のプラスミド、遺伝子輸送担体または医薬組成物に用いるのに特に好適である。したがって、分泌シグナルペプチドとして本発明の新規分泌シグナルペプチ

ドを含む、あらゆる態様の上記プラスミド、遺伝子輸送担体または医薬組成物もまた、本発明に包含される。

実施例

[0101] 以下、製造例及び実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0102] 参考例１：分泌シグナルのin Silicoスクリーニング

Bifidobacterium longum 105Aの全ゲノム配列より推定した全翻訳領域のアミノ酸配列１９４１個に対して、PrediSiを用いたシグナルペプチド予測を行ない、１８８個のシグナルペプチドを推定した。予測に際しては、Gram Positive Bacteriaのパラメータセットを用いた。

推測した１８８個のシグナルペプチドのうち、膜貫通領域を持たない２５個を分泌タンパク質候補として選定した。この推定分泌タンパク質コード領域を表１に示した。

[0103]

[表1]

表１　分泌タンパク候補のゲノム上の位置及び方向

Candidate No.	Operon	Position, direction
1	head	20020 -> 20982
2	head	762462 -> 763787
3	head	781649 -> 782512
4	head	842877 -> 844577
5	head	1433216 -> 1433650
6	head	1662965 -> 1664209
7	head	1917150 -> 1917836
8	head	164213 <- 165142
9	head	636847 <- 637464
10	head	752108 <- 752839
11	head	839663 <- 841006
12	head	1201317 <- 1202642
13	head	1744372 <- 1744605
14	head	1958176 <- 1958493
15	head	2225694 <- 2227349
16	head	2258216 <- 2258665
17	not head	58769 -> 59881
18	not head	471365 -> 472411
19	not head	768637 -> 768834
20	not head	695274 <- 696701
21	not head	708157 <- 708966
22	not head	930317 <- 931657
23	not head	1115148 <- 1116155
24	not head	1326094 <- 1327137
25	not head	1867821 <- 1868807

[0104] 製造例１：分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSPxA-GFP）の構築

シグナルペプチド候補のプロモーターにて分泌型ＧＦＰを発現させるプラスミドを構築した。概要を図１に示す。詳細は以下のとおりである。

[0105] インサート調製

上記２５個の分泌タンパク質候補のうち、その遺伝子がオペロンの先頭に位置する１６種類（表１Ｎｏ．１～１６）に関して、以下のようにプロモーター領域を含む推定シグナルペプチド部分及びその下流部分の６０～９０塩基をＰＣＲ法にて増幅した。

翻訳開始点の３００ｂｐ上流にforward primerを設計し、シグナルペプチドをコードするDNAの６０～９０ｂｐ下流にreverse primerを設計した。Bifidobacterium longum 105AのゲノムＤＮＡ３０ｎｇを鋳型とし、２×Phusion Flash PCR Master mix (FINNZYMES)を用いてＰＣＲを行なった。

[0106] ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒の後、９８℃で１秒、５５℃で５秒、７２℃で９秒を３０サイクル、７２℃で１分とした。各シグナルペプチドのＰＣＲプライマーを表２．１に示した。各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する。

[0107]

[表2]

表 2.1 シグナルペプチド増幅時のプライマー (SPsA)

No.	Primer Name	Sequence (5' -> 3')	PCR product name
1	SP1_F1_primer	ctttctacggatccTCTCGTGTACGCGAATACG	SP1A
	SP1_R1_primer	ctcctcgcccttggaTTCCACGCGCTCCTTGG	
2	SP1_F2_primer	ctttctacggatccCGCGCTGCAATGGCGTCGG	SP2A
	SP1_R2_primer	ctcctcgcccttggaCAAAAACAGCACGCGGGTG	
3	SP1_F3_primer	ctttctacggatccGGCGTCTGGCAGCGCACAG	SP3A
	SP1_R3_primer	ctcctcgcccttggaGGCGATGGTCAGCTTGC	
4	SP1_F4_primer	ctttctacggatccATCAGAGGAGCCGGTGC	SP4A
	SP1_R4_primer	ctcctcgcccttggaGCCGAACAGACGCGGGGG	
5	SP1_F5_primer	ctttctacggatccCTCGCGGGCTTGGCGGTC	SP5A
	SP1_R5_primer	ctcctcgcccttggaTTGGTCGATGATGGCCTTG	
6	SP1_F6_primer	ctttctacggatccGTTCGGGTCCGGGTGCGG	SP6A
	SP1_R6_primer	ctcctcgcccttggaATCGACAATAGGACTTTTCC	
7	SP1_F7_primer	ctttctacggatccAGGCGGTCCATGGTGGATG	SP7A
	SP1_R7_primer	ctcctcgcccttggaGGTGGAGGTGGATTCGG	
8	SP1_F8_primer	ctttctacggatccAACCATTCGGACGCGCAG	SP8A
	SP1_R8_primer	ctcctcgcccttggaCATCGTTGCCTCGCCCG	
9	SP1_F9_primer	ctttctacggatccCCAGGGCCCGAAGGAAGAG	SP9A
	SP1_R9_primer	ctcctcgcccttggaGACGATCTGATGCGCCAGC	
10	SP1_F10_primer	ctttctacggatccCAGCCCATCGCTATGGAG	SP10A
	SP1_R10_primer	ctcctcgcccttggaTCGCTGCTTGAGTTTGCCG	
11	SP1_F11_primer	ctttctacggatccTCTGTAGCGGGAGGTTGCG	SP11A
	SP1_R11_primer	ctcctcgcccttggaCAGCGTGGGCTCCCAAGCC	
12	SP1_F12_primer	ctttctacggatccGCGTTACTTCCATGTTCGC	SP12A
	SP1_R12_primer	ctcctcgcccttggaGGAACGGGTCCACAGGGTG	
13	SP1_F13_primer	ctttctacggatccCCTTCTCAACGCCAGCGGC	SP13A
	SP1_R13_primer	ctcctcgcccttggaAGACTCGCTAGCACAGCAC	
14	SP1_F14_primer	ctttctacggatccGACATAGCGCGGTTTCATACC	SP14A
	SP1_R14_primer	ctcctcgcccttggaTTGGGCCACTATTGTCTTC	
15	SP1_F15_primer	ctttctacggatccACCGGCACCTGCGCCGGCG	SP15A
	SP1_R15_primer	ctcctcgcccttggaCTTGCCTGAGGCATCTTG	
16	SP1_F16_primer	ctttctacggatccATCGCAACACCTCCATATTGTTCC	SP16A
	SP1_R16_primer	ctcctcgcccttggaGGCCAACGGAGTCGTCTCG	

[0108] ＰＣＲ産物の一部を２%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）を用いて解析を行い、推定されるサイズのシングルバンドである事を確認した。

シングルバンドでない場合には、アニーリング温度を５５℃から６０℃に変更して再度ＰＣＲを行なった。

ＰＣＲ産物をＰＣＲ産物精製キット(QIAquick PCR purification kit, QIAGEN)を用いて精製し、精製ＰＣＲ産物量を吸光光度計にて定量した。

この自身のプロモーター領域を含むシグナルペプチド断片を、シグナルペプチドｘＡ（SPxA）（ｘ＝１～１６）とした。

[0109] ベクター調製

SPxAクローニング用ベクターを以下のように調製した。調製の概要を図１に示す。プラスミドpAmyB-GFPuvベクター(図１、上段の右図；配列番号１)を、ＢａｍＨＩ及びＥｃｏ１４７Ｉ（何れもFermentas）にて完全分解した。反応条件は、酵素の使用説明書に従った。消化後のプラスミドを、０．８%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約４．２ｋｂｐのLarge fragmentを切り出し、ゲルからのＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。精製ＤＮＡ断片（ベクター）を０．８%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

なお、pAmyB-GFPuvベクター中のGFPuvコード配列は、ビフィズス菌用にコドンを最適化（GenScript）したものである。

[0110] Recombination反応

上記で調製したベクターとインサートを１：３～１０のモル比にて混合し、組換え反応により連結した（CloneEZ Kit, GenScript）。反応条件は製品説明書に従った。

[0111] 大腸菌の形質転換

上記Recombination反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行い、LB（75μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有)プレートに塗布後３７℃で一晩培養した。形質転換条件は、製品説明書に従った。

形質転換した大腸菌コロニーをLB(７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有)液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドのインサート配列を決定し、プラスミド名を、pSPxA-GFP（ｘ＝１～１６）とした。

[0112] ビフィズス菌の形質転換

上記形質転換した大腸菌より抽出したプラスミドＤＮＡを３～５μＬ用いて、ビフィズス菌Bifidobacterium longum 105Aの形質転換をエレクトロポレーションシステム（ジーンパルサーＩＩ、バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）により行なった。電気ショック後は、キュベットにＩＭＲ液体培地８００μＬとビタミンＣ添加液５０μＬの混合液を即時に加え、これを滅菌済みの２ｍＬマイクロチューブに回収した。各チューブについて同様の操作を行い、これら２ｍＬチューブの蓋をゆるめてデシケータに入れた。デシケータ内の空気を真空ポンプにて脱気したのち、炭酸ガスを封入した。この操作を３回繰り返してデシケータ内の空気を炭酸ガスに置換した後、デシケータを３７℃に設定したインキュベータに入れ、３時間保温した。

[0113] 保温後の各菌懸濁液をよく混ぜた後、その１００μＬを量り取り、ＩＭＲ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ　ＳＰＣＭを含有）２枚にそれぞれ塗抹した。これらのプレートを脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック(R)・ケンキ、三菱ガス化学株式会社）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて２日間培養した。

[0114] 製造例２：分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSPxB-GFP）の構築

ビフィズス菌のヒストン様プロモーター（Ｈｕプロモーター）にて分泌型ＧＦＰを発現させるプラスミドを構築した。概要を図２に示す。詳細は以下のとおりである。

[0115] インサート調製

上記２５個の分泌タンパク質候補のうち、不完全なタンパク質コード配列（ＣＤＳ）と推測される３個（Ｎｏ．１７、１８、２０）を除いた２２個（Ｎｏ．１～１６、１９、２１～２５）について、推定シグナルペプチドコード部分及びその下流６０～９０塩基を含むＤＮＡ断片をＰＣＲ法にて増幅した。

翻訳開始点にforward primerを設計し、シグナルペプチドをコードするＤＮＡの６０～９０ｂｐ下流にreverse primerを設計した。各シグナルペプチドのＰＣＲプライマーを表２．２に示した。各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する。

[0116]

[表3-1]

表 2.2 シグナルペプチド増幅時のプライマー (SPx)

	Primer Name	Sequence (5' -> 3')	PCR product
1	SP1_F2_primer	caagaaggatgcttATGGCGGAAACTACCGTTAAGC	SP1
	SP1_R1_primer	ctcctgcccttggaTTCCACGCGCTCCTTGG	
2	SP2_F2_primer	caagaaggatgcttGTGGGTATGACTGAGAACG	SP2
	SP1_R2_primer	ctcctgcccttggaCAAAAACAGCACGCGGGTG	
3	SP3_F2_primer	caagaaggatgcttATGTTCAATAAGCGACAC	SP3
	SP1_R3_primer	ctcctgcccttggaGGCGATGGTCAGCTTGC	
4	SP4_F2_primer	caagaaggatgcttATGACCACTCACAACAGC	SP4
	SP1_R4_primer	ctcctgcccttggaGCCGAACAGACGCGGGGG	
5	SP5_F2_primer	caagaaggatgcttATGACCGCGATTGACGAG	SP5
	SP1_R5_primer	ctcctgcccttggaTTGGTCGATGATGGCCTTG	
6	SP6_F2_primer	caagaaggatgcttATGAAGATTGCGGTTGCAGG	SP6
	SP1_R6_primer	ctcctgcccttggaATCGACAATAGGACTTTTCC	
7	SP7_F2_primer	caagaaggatgcttATGTTTGCGTGCGTAGCC	SP7
	SP1_R7_primer	ctcctgcccttggaGGTGGAGGTGGATTCGG	
8	SP8_F2_primer	caagaaggatgcttATGGTTGGTGACGACACC	SP8
	SP1_R8_primer	ctcctgcccttggaCATCGTTGCCTCGCCCG	
9	SP9_F2_primer	caagaaggatgcttATGGGCACCATGATGCG	SP9
	SP1_R9_primer	ctcctgcccttggaGACGATCTGATGCGCCAGC	
10	SP10_F2_primer	caagaaggatgcttATGATGACTGGTGCACAGG	SP10
	SP1_R10_primer	ctcctgcccttggaTCGCTGCTTGAGTTTGCCG	
11	SP11_F2_primer	caagaaggatgcttATGAAGTTCACCGTTGC	SP11
	SP1_R11_primer	ctcctgcccttggaCAGCGTGGGCTCCCAAGCC	
12	SP12_F2_primer	caagaaggatgcttATGGTGTCTTTCAATAAACTGACC	SP12
	SP1_R12_primer	ctcctgcccttggaGGAACGGGTCCACAGGGTG	

[0117]

[表3-2]

13	SP13_F2_primer	caagaaggatgcttuATGGTCGCCGTCCTCAGG	SP13
	SP1_R13_primer	ctcctcgcccttggaAGACTCGCTAGCACAGCAC	
14	SP14_F2_primer	caagaaggatgcttuTTGCCGGGACCTATATGTCC	SP14
	SP1_R14_primer	ctcctcgcccttggaTTGGGCCACTATTGTCTTC	
15	SP15_F2_primer	caagaaggatgcttuATGAAACGTAGCGATTATATGTTGG	SP15
	SP1_R15_primer	ctcctcgcccttggaCTTGCCTGAGGCATCTTG	
16	SP16_F2_primer	caagaaggatgcttuATGAGCAATAGTGCATCATCG	SP16
	SP1_R16_primer	ctcctcgcccttggaGGCCAACGGAGTCGTCTCG	
19	SP19_F2_primer	caagaaggatgctttTTGGCAAGATGGGTCACTC	SP19
	SP19_R2_primer	ctcctcgcccttggaGCCCATGACCGGCATGAAC	
21	SP21_F2_primer	caagaaggatgctttATGGCATTGACTGATGAACAGG	SP21
	SP21_R2_primer	ctcctcgcccttggaACGTGCAGTGGTATGGATG	
22	SP22_F2_primer	caagaaggatgctttTTGGTGTCTATGAGAAGC	SP22
	SP22_R2_primer	ctcctcgcccttggaGATGCGCTCACGCTTGG	
23	SP23_F2A_primer	caaggatgctttATGAACAAGCGATGGAAG	SP23
	SP23_R2_primer	ctcctcgcccttggaGATCGTCTTGAGAATCTTCAGAC	
24	SP24_F2_primer	caagaaggatgctttATGGTCGGCATGCGCGAC	SP24
	SP24_R2_primer	ctcctcgcccttggaGTTGGTGCGGTTCCGGTAG	
25	SP25_F2_primer	caagaaggatgctttGTGATGTTATCCACACC	SP25
	SP25_R2_primer	ctcctcgcccttggaCTGCTCATGATCGGCCCAG	

[0118] 上記製造例１と同様にＰＣＲを行い、調製したＰＣＲ産物をＳＰｘ（ｘ＝１～１６、１９、２１～２５）とした。

[0119] ベクター調製

ＳＰｘクローニング用ベクターを以下のように調製した。調製の概要を図２に示す。プラスミドpScHuGFPuvベクター（図２、上段の右図；配列番号２）を、ＨｉｎｄＩＩＩ（Fermentas）にて完全分解した。反応条件は、酵素の使用説明書に従った。消化後のプラスミドを、０．８%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約４．６ｋｂｐの直鎖ＤＮＡｄ断片を切り出し、ゲルからのＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。精製ＤＮＡ断片（ベクター）を０．８%アガ

ロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

なお、pScHuGFPuvベクター中のGFPuvコード配列は、ビフィズス菌用にコドンを最適化（GenScript）したものである。

[0120] Recombination反応

上記で調製したベクターとインサートを１：３～１０のモル比にて混合し、組換え反応により連結した（CloneEZ Kit, GenScript）。反応条件は製品説明書に従った。

[0121] 大腸菌の形質転換

上記Recombination反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行い、ＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）プレートに塗布後３７℃で一晩培養した。形質転換条件は、製品説明書に従った。

形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドのインサート配列を決定し、プラスミド名をpSPxB-GFP（ｘ＝１～１６、１９、２１～２５）とした。

[0122] ビフィズス菌の形質転換

上記製造例１と同様の方法にてビフィズス菌の形質転換を行った。

[0123] 製造例３：分泌型ＧＦＰ発現プラスミド（pSec2-GFP）の構築

Bifidobacterium breve UCC2003 にて分泌ペプチドSec2が報告されている（Laura E. MacConaill et al., Applied and Environmental Microbiology, 2003 Vol. 69: pp6994-7001）。B.longum 105Aのゲノム配列よりSec2と相同性の高い配列を検索し、これの分泌シグナルをＧＦＰのコード配列とつなげた。これをHuプロモーターにて発現させるプラスミドを、製造例２のプラスミドpScHuGFPuvベクターを用いて構築した。概要を図３に示す。詳細は以下のとおりである。

[0124] インサート調製

B.longum 105AのSec2遺伝子の翻訳開始点にSec2-F1プライマー、シグナルペプチドコード配列の１２３ｂｐ下流にSec2-R2プライマーを設計した。プライマー配列を表２．３に示す。各プライマーの５’側の１５塩基は、以下に示すベクターと相同な配列を有する。

[0125] [表4]

表 2.3 シグナルペプチド増幅時のプライマー (Sec2)

	Primer Name	Sequence (5' -> 3')	PCR product
Sec2	Sec2-F1 primer caagaaggatgcgttTTGGAACATATGAAGATGTTCC		Sec2
	Sec2-R2 primer ctcctcgcccttggaGTCGAGTTTCATTGTATCG		

[0126] 上記製造例１と同様にＰＣＲを行い、調製したＰＣＲ産物をSec2とした。

[0127] ベクター調製

プラスミドpScHuGFPuvベクター（図３、上段の右図；配列番号２）を用いて上記製造例２と同様に調製した。

[0128] Recombination反応

上記で調製したベクターとインサートを１：　１０のモル比にて混合し、組換え反応により連結した（CloneEZ Kit, GenScript）。反応条件は製品説明書に従った。

大腸菌の形質転換

上記Recombination反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。

[0129] 形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドのインサート配列を決定し、プラスミド名をpSec2-GFP（配列番号３）とした。

[0130] ビフィズス菌の形質転換

上記製造例１と同様の方法にてビフィズス菌の形質転換を行った。

[0131] 実施例１：組換えビフィズス菌のＧＦＰタンパク質発現

製造例１～３で得た組換えビフィズス菌（Bifidobacterium longum 105A/pSPxA-GFP（ｘ＝１～１６）、 Bifidobacterium longum 105A/pSPxB-GFP（ｘ＝１～１６、１９、２１～２５）及びBifidobacterium longum 105A/ pSec2-GFP）のグリセリンストックを、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。

[0132] 次に、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬあたり１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。

この培養液を用いて、培養上清及び細胞内タンパク質を以下のように調製した。

[0133] 培養液を遠心分離後、培養上清を回収した。この培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）により沈殿させ、アセトンにて洗浄後、電気泳動用バッファーに溶解し、培養上清中のタンパク質を濃縮した。別に、細胞内タンパク質を以下のように抽出した。培養液１ｍＬを４ｍＬのＰＢＳと混合し、１２，０００ｒｐｍ、５分、４℃にて遠心分離後、上清を除去し、この沈殿に５ｍＬのＰＢＳを加え懸濁、遠心分離し上清を除去する操作を２回行なった。洗浄後の菌体にＰＢＳを加え全量を１ｍＬとした後、超音波処理により菌体を破砕した。これを遠心分離後、上清を回収し、これを細胞内抽出物とした。

[0134] 同様の操作を野生株Bifidobacterium longum 105Aについても行い、陰性コントロールとした。ＧＦＰタンパク質の陽性コントロールには、recombinant GFPuv(クロンテック)を用いた。

上記培養上清濃縮物（培養液１ｍＬ相当）、細胞内タンパク抽出物（培養液７．５μＬ相当）を１２．５%トリスーグリシンゲル（アトー株式会社,ｅーパジェル）にて電気泳動した。これをＰＶＤＦ膜（Invitrogen、iBlot T

ransfer Stacks) にiBlot Transfer Device (Invitrogen) を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキングした後、一次抗体にウサギＧＦＰ抗体 (Clontech, A.v. peptide Antibody Living Colors) 、二次抗体にanti-Rabbit IgG HRP Conjugate (Santa Cruz Biotechnology)を使用して反応を行ない、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare) にて発光させた。これをイメージングアナライザー (Fluor S Max, バイオラッド) にて解析した。

[0135] その結果、１３種の菌 (B.longum 105A/pSP1B-GFP、 B.longum 105A/pSP2B-GFP、 B.longum 105A/pSP3B-GFP、B.longum 105A/pSP4B-GFP、B.longum 105A/pSP7B-GFP、B.longum 105A/pSP9B-GFP、 B.longum 105A/pSP10B-GFP、 B.longum 105A/pSP12B-GFP、 B.longum 105A/pSP16B-GFP、B.longum 105A/pSP23B-GFP、B.longum 105A/pSP7A-GFP、 B.longum 105A/pSP12A-GFP、 B.longum 105A/pSec2-GFP) で分泌傾向が認められた。同様な試験を２回行い、特に、５種 (B.longum 105A/pSP3B-GFP、B.longum 105A/pSP7B-GFP、B.longum 105A / pSP23B-GFP、B.longum 105A/pSP7A-GFP、B.longum 105A/pSec2-GFP) について顕著な分泌作用が確認された（図４）。

[0136] 製造例４：分泌型TNF alpha発現ビフィズス菌の作製 (pSPxA-TNF alpha及びpSPxB-TNF alpha)

プラスミドベクターpTNF1の構築

ヒトＴＮＦα(Accession No. X01394)のコード配列をビフィズス菌用にコドン最適化しpUC57ベクターに挿入したプラスミド (GenScript社に合成委託) を鋳型にしてTNF-F1プライマー及びTNF-R1プライマー（表３）にてＴＮＦαコード領域をターゲットとしたＰＣＲを行なった (PrimeSTAR(R) HS Premix, タカラバイオ株式会社）。ＰＣＲ産物を精製 (QIAquick PCR purificaton Kit, キアゲン) にて精製後、０．８％アガロースゲルにて電気泳動を行い、約０．７ｋｂｐのＤＮＡ断片を切り出した。このゲルよりＤＮＡを抽出 (QIAquick Gel Extraction Kit, キアゲン) し、インサートとした。

[0137]

[表5]

表３　プラスミドベクターpTNF1の構築用プライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')
TNF-F1 primer	gaaggatgcttATGTCCACCGAATCCATGATCCG
TNF R1 primer	acgagcagaaggTCACAGGGCGATGATGCCGAAG

[0138] 別に、以下のようにベクターを調製した。プラスミドpCDshuttle （特許文献９；WO2009/128272A1）１０μｇに制限酵素FastDigest Bsp119 I, FastDigest Pst I, FastDigest Nde I, FastDigest AcI I（Fermentas社）を各１０μＬ加え３７℃にて４．５時間加温し、プラスミドを完全分解した。これを、０．８％アガロースゲルにて電気泳動を行い、約３．９ｋｂｐのＤＮＡ断片を切り出した。このゲルよりＤＮＡを抽出（QIAquick Gel Extraction Kit，キアゲン）し、ベクターとした。

[0139] 上記ベクター２０ｎｇ及びインサート３６ｎｇをCloneEZ Kit （GenScript社）を用いて末端配列の組換えを行いつなげた。詳細はCloneEZ Kitの製品説明書に従った。このＤＮＡ２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。

形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドをpTNF1（図５、上段の右図；　配列番号４）とした。

[0140] プラスミドpSPxA-GFP及びpSPxB-GFPのＧＦＰ部分をTNF alphaに替えたプラスミド pSPxA-TNF alpha及びpSPxB-TNF alphaの構築概要を図５及び図６にそれぞれ示す。

プラスミドpTNF1を鋳型として、TNFvec F1プライマー及びTNFvec R1プライマー（表4）にてＰＣＲを行ない（PrimeSTAR(R) HS Premix, タカラバイオ株式会社）約3.8 kbpのPCR産物を取得し、これをベクターとした。

[0141] [表6]

表４　pSPxA-TNF alpha 及び pSPxB-TNF alpha 構築用ベクタープライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')
TNFvec_F1_primer	GTGCGCTCCTCCTCCCGTAC
TNFvec_R1_primer	GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG

[0142] 別に、実施例１で分泌傾向を示したプラスミドpSPxA-GFP（ｘ＝７、１２）またはpSPxB-GFP（ｘ＝１～４，７，９，１０，１２，１６，２３）を鋳型として、表５のプライマーにてインサートのＰＣＲ増幅を行ない（PrimeSTAR(R) HS Premix, タカラバイオ株式会社）、これをインサートとした。

[0143]

[表7]

表５　pSPxA-TNF alpha 、pSPxB-TNF alpha 及び pSec2-TNF alpha 構築用

インサートプライマー

PCR product for	Primers	Sequence (5' -> 3')	Template Plasmid
pSP7A-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP7A -GFP
	SP7-TNF_ R1 primer	ggaggcggagcggcacGGTGGAGGTGGATTCG GCGAAC	
pSP12A-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP12A -GFP
	SP12-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacGGAACGGGTCCACAGG GTGAT	
pSP1B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP1B -GFP
	SP1B-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacTTCCACGCGCTCCTTG GCGATG	
pSP2B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP2B-GFP
	SP2B-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacCAAAAACAGCACGCG GGTG	
pSP3B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP3B -GFP
	SP3B-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacGGCGATGGTCAGCTTG C	
pSP4B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP4B -GFP
	SP4B-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacGCCGAACAGACGCGG GGGAA	
pSP7B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP7B -GFP
	SP7-TNF_ R1 primer	ggaggcggagcggcacGGTGGAGGTGGATTCG GCGAAC	
pSP9B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP9B -GFP
	SP9B-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacGACGATCTGATGCGCC AGCGCATC	
pSP10B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP10B -GFP
	SP10B-TNF_R1 primer	ggaggcggagcggcacTCGCTGCTTGAGTTTG CCGGAAATC	
pSP12B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP12B -GFP
	SP12-TNF _R1 primer	ggaggcggagcggcacGGAACGGGTCCACAGG GTGAT	
pSP16B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP16B -GFP
	SP16B-TNF_R1 primer	ggaggcggagcggcacGGCCAACGGAGTCGTC TC	
pSP23B-TNF	pUC_ori_F 2 primer	tggcctaactacggctacac	pSP23B -GFP
	SP23B-TNF_R1 primer	ggaggcggagcggcacGATCGTCTTGAGAATC TTCAGACG	
pSec2-TNF	Sec2_ecoRI _primer	tacGGATCCgtctcctgctg	pSec2 -GFP
	Sec2a_R1_ primer	GTACGGGAGGAGGAGCGCACGTCGAG TTTCATTGTATCG	
pSec2-TNF	Sec2a_F1_ primer	CGATACAATGAAACTCGACGTGCGCTC CTCCTCCCGTAC	pTNF1
	TNF_ecoRI _primer	aggACTAGTccggaatmatscgg	

[0144]　上記ベクター１００ｎｇとインサート４０ｎｇをIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit（タカラバイオ株式会社)にて連結させた。このＤＮＡ２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った

。

[0145] 形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドの全長配列を決定し、プラスミド名を、pSP7A-TNF alpha, pSP12A-TNF alpha, pSP1B-TNF alpha, pSP2B-TNF alpha, pSP3B-TNF alpha, pSP4B-TNF alpha, pSP7B-TNF alpha, pSP9B-TNFalpha, pSP10B-TNF alpha, pSP12B-TNF alpha, pSP16B-TNF alpha, pSP23B-TNF alphaとした。

[0146] ビフィズス菌のpSPxA-TNF alpha及びpSPxB-TNF alphaによる形質転換

プラスミドpSPxA-TNF alpha及びpSPxB-TNF alphaを用いてB.longum 105Aの形質転換を製造例１と同様の方法を用いて行なった。

[0147] 参考例２：プラスミドpTNF3の構築

ビフィズス菌由来のＨｕプロモーター下流に成熟ヒトＴＮＦαコード配列を配したシャトルベクター（ビフィズス菌-大腸菌）を構築した。概要を図１２に示す。詳細は以下のとおりである。

[0148] インサート調製

ヒトＴＮＦα(Accession No:X01394、１５３番目から８５４番目の未成熟ＴＮＦαコード配列)のコドンをビフィズス菌用に最適化した人工ＤＮＡ、その上流及び下流にビフィズス菌由来のＨｕプロモーター及びＨｕターミネーターを配したプラスミド:human TNFalpha_in_pUC57を合成した（GenScriptにカスタム合成依頼）。

プラスミドhuman TNFalpha_in_pUC57　１ｎｇを鋳型として、ＴＮＦαのコード領域の成熟ＴＮＦα部分をPrimeSTAR(R) HS Premix（タカラバイオ株式会社）にてＰＣＲ増幅した。プライマーは、TNF F3プライマー及びTNF R1プライマー用い、各プライマーの５’側１５塩基は、ベクターの末端と相同な配列を配した（表６）。ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒、６０℃で５秒、７２℃で３０秒を３０サイクル行った後、７２℃で３０秒とした。

ＰＣＲ産物の一部を、ＤＮＡ濃度マーカーとともに２％アガロースゲル（

１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）に電気泳動し、約０．５ｋｂｐのシングルバンドである事を確認し、またその濃度を見積もった。

[0149] ベクター調製

プラスミドpCDshuttle １ｎｇを鋳型として、ベクター骨格をPrimeSTAR(R) HS Premix（タカラバイオ株式会社）にてＰＣＲ増幅した。プライマーは、pCDshuttle F1プライマー及びpCDshuttle R1プライマー用い、各プライマーの５’側１５塩基は、インサートの末端と相同な配列とした(表６)。ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で４分を３０サイクル行った後、７２℃で３０秒とした。

ＰＣＲ産物の一部を、ＤＮＡ濃度マーカーとともに０．８%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にて電気泳動し、約３．９ｋｂｐのシングルバンドである事を確認し、またその濃度を見積もった。

[0150] [表8]

表 6: pTNF3 構築プライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')	PCR product
TNF_F3_primer	GAAGGATGCTTTATGGTGCGCTCCTCCTCCCG	insert
TNF_R1_primer	ACGAGCAGAAGGTCACAGGGCGATGATGCCGAAG	insert
pCDshuttle_F1_primer	TGACCTTCTGCTCGTAGCG	vector
pCDshuttle_R1_primer	CATAAAGCATCCTTCTTGGGTCAG	vector

[0151] クローニング

上記ベクター１００ｎｇ及びインサート５０ｎｇをIn-Fusion Advantage PCR Cloning Kit （タカラバイオ株式会社）を用いて末端配列の組換えを行いつなげた。この時、Cloning Enhancer（タカラバイオ株式会社）も反応液に加え、インサート及びベクター中に含まれる鋳型プラスミドの分解も同時に行った。詳細は、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kitの製品説明書に従った。

上記インフュージョン反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitrogen 社）の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン株式会社）。このプラスミドの全長配列を決定し、pTNF3 とした（配列番号５１）。

[0152] ビフィズス菌の形質転換

プラスミドpTNF3を用いてB.longum 105A の形質転換を製造例１と同様の方法を用いて行った。

[0153] 製造例５：分泌型ＴＮＦα発現ビフィズス菌の作製（pSec2-TNF alpha）

プラスミドpSec2-GFPのGFP部分をTNF alphaに替えたプラスミド pSec2-TNF alphaの構築概要を図７に示す。

[0154] ベクター調製

プラスミドpCDshullteをＢａｍＨＩ、ＢｃｕＩ及びＰｓｔＩ（何れもFermentas）にて完全分解した。反応条件は、酵素の使用説明書に従った。消化後のプラスミドを、１%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約３．４ｋｂｐのLarge fragmentを切り出し、ＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。精製ＤＮＡ断片（ベクター）を０．８%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

[0155] インサート調製

プラスミドpSec2-GFPを鋳型として、Sec2_out1 primer及びSec2a_R1 primer（表５）にてHuプロモーターを含むSec2シグナルペプチドコード配列をＰＣＲ増幅した（ＰＣＲ産物１）。別に、プラスミドpTNF１を鋳型として、Sec2a_F1 primer及びTNF_out1 primer（表５）にてHuターミネーターを含むTNF alphaのコード配列をＰＣＲ増幅した（ＰＣＲ産物２）。ＰＣＲ産物１及び２を

ＰＣＲ産物精製キット（QIAquick PCR purification kit, キアゲン株式会社）にて精製後、吸光度測定によりＰＣＲ産物量を見積もった。ＰＣＲ産物１及びＰＣＲ産物２を等モル量混ぜた。このＰＣＲ産物混合溶液１ｎｇ、２×PCR Solution PrimeSTAR HS（タカラバイオ株式会社)に、０．１×ＴＥバッファーを加え49μＬとした。この溶液をサーマルサイクラーにセットし、９８℃で１０秒、７２℃で３６秒を１サイクルとして５サイクル反応を行い、２つのＰＣＲ断片を連結した。さらに、これにSec2_out1プライマー及びTNF_out1プライマーを加えて、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で７０秒を１サイクルとして２５サイクル反応させた後、７２℃で３０秒伸長反応を行い、連結ＰＣＲ産物を増幅した。

[0156] これを、１%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約１．２ｋｂｐの断片を切り出し、ＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。この精製ＤＮＡ断片をＢａｍＨＩ及びＢｃｕＩにて完全分解した。反応条件は、酵素の使用説明書に従った。消化後のプラスミドを、１%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を切り出し、ＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。この精製ＰＣＲ産物をBamHZおよびBculで完全分解後、これを１%精製用アガロースゲルにて分離精製した。精製ＤＮＡ断片（インサート）を０．８%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

[0157] ライゲーション

上記ベクター及びインサートを１：３（モル比）にて混合し、ライゲーションを行なった（Rapid DNA Ligation Kit、Fermentas）。詳細は、製品説明書に従った。

[0158] 大腸菌の形質転換

上記ライゲーション反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（ライフテクノロジーズジャパン株式会社)の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。

形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミドのインサート部分について全長配列を決定し、ＰＣＲエラーがない事を確認し、プラスミド名を、pSec2-TNF alphaとした。

[0159] ビフィズス菌のｐSec2-TNF alphaによる形質転換

プラスミドｐSec2-TNF alphaを用いてB.longum 105Aの形質転換を製造例１と同様の方法を用いて行なった。

[0160] 実施例２：組換えビフィズス菌のTNF alphaタンパク質発現

製造例４及び製造例５で得た組換えビフィズス菌（Bifidobacterium longum 105A/ pSPxA-TNF alpha（ｘ＝７，１２）、Bifidobacterium longum 105A/ pSPxB-TNF alpha（ｘ＝１～４，７，９，１０，１２，１６，２３）及びBifidobacterium longum 105A/pSec2-TNF alphaのグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５　μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。

[0161] 次に、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬあたり１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。

培養液を遠心分離後、培養上清を回収した。この培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）により沈殿させ、アセトンにて洗浄後、電気泳動用バッファーに溶解し、培養上清中のタンパク質を濃縮した。

[0162] 別に、細胞内タンパク質を以下のように抽出した。培養液１ｍＬを４ｍＬのＰＢＳと混合し、１２，０００ｒｐｍ、５分、４℃にて遠心分離後、上清を除去し、この沈殿に５ｍＬのＰＢＳを加え懸濁、遠心分離し上清を除去す

る操作を２回行なった。洗浄後の菌体にＰＢＳを加え全量を１ｍＬとした後超音波処理を行い、菌体を破砕した。これを遠心分離後、上清を回収し、これを細胞内抽出物としてウェスタンブロッティング解析に供した。

[0163] 同様の操作を野生株Bifidobacterium longum 105Aについても行い、陰性コントロールとした。TNF alphaの陽性コントロールには、ヒト組換えTNF alpha（PEPRO TECH, INC.）を用いた。

[0164] 上記培養上清（培養液７．５μＬ相当）、培養上清濃縮物（培養液１ｍＬ相当）、細胞内タンパク抽出物（培養液７．５μＬ相当）を16%Tris-Glycineゲル(Invitrogen)にて電気泳動した。ただし、以下のサンプルについてはゲルへのアプライ量を次のように調整した。SP3B-TNF alphaの上清を培養液０．１５μＬ相当、SP16B-TNF alphaの細胞内抽出物を０．１５μＬ相当、SP23B-TNF alphaの細胞内抽出物を０．７５μＬ相当、同培養上清濃縮物を２０μＬ及び１００μＬ相当を電気泳動に供した。これをＰＶＤＦ膜（Invitrogen、iBlot Transfer Stacks）にiBlot Transfer Device（Invitrogen）を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキングした後、一次抗体にanti-human TNF-alpha(goat)（R&D Systems)、二次抗体にanti-Goat IgG HRP Conjugate（Santa Cruz Biotechnology)を使用して反応を行ない、ECL Advance Western Blotting Detection Kit（GE Healthcare)にて発光させた。これをイメージングアナライザー（Fluor S Max、バイオラッド）にて解析した。解析結果を図８に示した。

[0165] その結果、９種（B.longum 105A/pSP1B- TNF alpha、 B.longum 105A/pSP3B- TNF alpha、B.longum 105A/pSP4B- TNF alpha、B.longum 105A/pSP7B- TNF alpha、B.longum 105A/pSP12B- TNF alpha、 B.longum 105A/pSP16B- TNF alpha、B.longum 105A/pSP23B- TNF alpha、B.longum 105A/pSP7A- TNF alpha、 B.longum 105A/pSec2-TNF alpha）について分泌が確認され、２種（B.longum 105A/SP3B-TNF alpha 及びB.longum 105A/SP23B-TNF alpha）の培養上清への発現が特に強かった。

[0166] 参考例３：ＴＮＦα非分泌型の菌であるB. longum 105A/pTNF 3の分泌確認

参考例２で得た、B. longum 105A/pTNF3と野生株であるB. longum 105Aグリセリンストックを APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。APS-2S-2.5SE 液体培地２０ｍＬに１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。ただし、野生株はスペクチノマイシンを添加しない培地にて培養した。この培養液を遠心分離し、培養上清を回収した。また、細胞内抽出物を以下のように調製した。培養液１ｍＬをＰＢＳバッファーにて洗浄後、菌体をＰＢＳバッファーにて懸濁して１ｍＬとし、超音波破砕を行った。これを遠心分離後、その上清を回収し、これを細胞内抽出物とした。

[0167] 野生株より得た試料を陰性コントロールとした。陽性コントロールには、ヒト由来組換えTNF alpha（PEPRO TECH, INC.）を用いた。上記培養上清（培養液７．５μＬ相当）、細胞内抽出物（培養液０．０７５μＬ相当）を１５%ポリアクリルアミゲル（アトー株式会社）にて電気泳動した。これをＰＶＤＦ膜（Invitrogen、iBlotTransfer Stacks）にiBlot Transfer Device（Invitrogen）を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキングした後、一次抗体にanti-human TNF-alpha(goat)（R&D Systems）、二次抗体にanti-Goat IgG HRP Conjugate（Santa Cruz Biotechnology）を使用して反応を行ない、ECL Advance Western Blotting Detection Kit（GE Healthcare）にて発光させた。これをイメージングアナライザー（Fluor S Max、バイオラッド）にて解析した。解析結果を図９に示した。

[0168] その結果、B. longum 105A/pTNF3と野生株のB. longum 105Aの細胞内抽出物を比較すると、B. longum 105A/pTNF3ではＴＮＦαの発現を示すバンドが確認されたが、野生株のB. longum 105Aでは確認できなかった。したがって、プラスミドpTNF3で形質転換された菌株は、ＴＮＦαを正常に発現することがわかった。しかしながら、両者の培養上清を比較してみると、どちらの培養上清中にもＴＮＦαは確認されず、B. longum 105A/pTNF3からはＴＮＦα

が細胞外に分泌されていないことがわかった。

[0169] 製造例６：pBifi-SP3B-TNFの構築

製造例４で得たプラスミド pSP3B-TNF alpha（大腸菌―ビフィズス菌シャトルベクター）より大腸菌中での複製起点を除去したプラスミド pBifi-SP3B-TNFを構築した。構築の概要を図１０に示す。

[0170] pUCori除去断片の調製

組換え大腸菌TOP10/pSP3B-TNF alpha(シャトルベクター)より抽出したプラスミド２．４μｇにＢａｍＨＩ及びＢｇＩＩＩを加え３７℃にて消化した。これを、０．８%精製用アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、約３．８ｋｂｐのＤＮＡ断片を切り出した。切り出したゲルからＤＮＡを抽出・精製し（QIAquick Gel Extraction Kit、QIAGEN）、吸光度測定によりＤＮＡ濃度を測定した。

[0171] pUCori除去断片のセルフライゲーション

上記pUCori除去断片のセルフライゲーションをチューブ６本にて行なった。１チューブあたり、pUCori除去断片５０ｎｇを用いて５０μＬの反応系にて２２℃にて５分間セルフライゲーションを行なった（RAPID DNA LIGATION KIT, Fermentas）後、６５℃にて５分間加熱してLigaseを失活させた。ライゲーション反応液６本を１本にまとめ、Proteinase Kによるタンパク質の分解次いで、フェノール・クロロホルム抽出による除タンパク質後、エタノール沈殿を行なった。ＤＮＡの溶解は、１０μＬの０．１×ＴＥにて行なった。

[0172] ビフィズス菌の形質転換

Bifidobacterium longum 105Aコンピテントセルの形質転換（エレクトロポレーション、ジーンパルサーＩＩ、バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）を、上記ライゲーション反応後の精製物１５０ｎｇ（５μＬ）を用いて行なった。電気ショック後、キュベットにＩＭＲ液体培地８００μＬとビタミンＣ添加液５０μＬの混合液を即時に加え、これを滅菌済みの２ｍＬマイクロチューブに回収した。このチューブの蓋を緩めた状態でデシケータに入れ

、真空ポンプにて脱気したのち、炭酸ガスを封入した。この操作を３回繰り返してデシケータ内の空気を炭酸ガスに置換した後、デシケータを３７℃に設定したインキュベータに入れ、３時間保温した。

[0173] 保温後の菌懸濁液をよく混ぜた後、ＩＭＲ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ　ＳＰＣＭを含有）に塗抹した。このプレートを脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック(R)・ケンキ、三菱ガス化学株式会社）とともに密閉容器に入れ、３７℃に設定したインキュベータにて２日間培養した。

[0174] 形質転換体の確認および組換えビフィズス菌のグリセリンストック作製

上記ＩＭＲ寒天培地（７５μｇ／ｍＬ　ＳＰＣＭを含有）上に形成した組換え体候補コロニーを、ＢＬ－ｂＳ寒天培地（スペクチノマイシンを含むＢＬ寒天培地、ただし馬脱繊血を含まない）に画線し、脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック(R)・ケンキ、三菱ガス化学株式会社）とともに密閉容器に入れ、３７℃にて１日間培養した。画線培養したビフィズス菌をAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地にて３７℃で１日間嫌気培養し、これよりプラスミドＤＮＡ（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）を抽出した。抽出ＤＮＡを鋳型として、Check primer F1（AAD9カセット上）及びCheck primer R2（Ｈｕプロモーター上）にてＰＣＲ増幅を行い、ＰＣＲ産物の大きさをアガロースゲル電気泳動にて確認した。プライマー配列を表７に示す。ＰＣＲプライマーの位置を図１０に示す。ＰＣＲ産物サイズは、約０．５ｋｂｐであり、pUC ori断片が除去されている事を確認した。これより、この組換えビフィズス菌は、プラスミドpSP3B-TNF alphaよりpUC oriが除かれたプラスミド、pBifi-SP3B-TNF alpha を有することを確認した。

[0175]

[表9]

表７　シャトル及び非シャトルベクターの確認用プライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')
Check primer F1	TGACTTAGAGGAATTACTACCTG
Check primer R2	AAAGTGGCGGAAAGCGCCAC

[0176] ＢＬ－ｂＳ寒天培地上の画線培養物を、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した。この培養液に最終濃度２０%になるようにグリセリン溶液を混合し、グリセリンストックとした。

[0177] プラスミドpBifi-SP3B-TNFの塩基配列決定

Bifidobacterium longum 105A/ pBifi-SP3B-TNFグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地にて嫌気的に培養した。培養液より遠心分離により菌体を回収し、３０ｍM GTA bufferで懸濁後、Ｎ－アセチルムラミダーゼ処理を行なった。さらに、Proteinase K（キアゲン株式会社)処理を行なった後、プラスミドＤＮＡ精製キットによる精製を行った（QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN）。このプラスミドＤＮＡを用いて全塩基配列を決定し、pUCoriを含んでいないことを確認した（配列番号５）。

[0178] 実施例３：組換えビフィズス菌のＴＮＦ alphaタンパク質分泌確認

製造例６で得た、Bifidobacterium longum 105A/ pBifi-SP3B-TNF alphaグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬに１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。この培養液を遠心分離し、培養上清を回収した。また、細胞内抽出物を以下のように調製した。培養液１ｍＬをＰＢＳにて洗浄後、ＰＢＳにて懸濁して１ｍＬと

し、超音波破砕を行った。これを遠心分離後、その上清を回収し、これを細胞内抽出物とした。同様の操作をシャトルベクターであるBifidobacterium longum 105A/ pSP3B-TNF alpha及び野生株Bifidobacterium longum 105A(野生株)についても行った。ただし、野生株はスペクチノマイシンを添加しない培地にて培養した。野生株より得た試料を陰性コントロールとした。陽性コントロールには、ヒト由来組換えTNF alpha（PEPRO TECH, INC.）を用いた。

[0179] 上記培養上清（培養液０．７５μＬ相当）、細胞内タンパク抽出物（培養液１．５μＬ相当）を１５%ポリアクリルアミゲル（アトー株式会社）にて電気泳動した。これをＰＶＤＦ膜（Invitrogen、iBlot Transfer Stacks）にiBlot Transfer Device（Invitrogen）を用いて転写した。ブロッティング終了後の膜をブロッキングした後、一次抗体にanti-human TNF-alpha(goat)（R&D Systems)、二次抗体にanti-Goat IgG HRP Conjugate (Santa Cruz Biotechnology)を使用して反応を行ない、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)にて発光させた。これをイメージングアナライザー（Fluor S Max, バイオラッド）にて解析した。解析結果を図１１に示した。

[0180] 実施例４：pBifi-SP3B-TNF alpha及びpSP3B-TNFでの大腸菌形質転換

製造例６で得たプラスミド（pBifi-SP3B-TNF alpha及びpSP3B-TNF alpha）を用いて、大腸菌TOP10株の形質転換を行った。

大腸菌TOP10コンピテントセル（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）の製品説明書に従い形質転換を行い、ＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）寒天培地に１００μＬずつ２枚塗布し、３７℃にて１晩培養した。コロニーは、シャトルベクターpSP3B-TNF alphaを導入した場合のみで形成され（２６６ｃｆｕ及び２２６ｃｆｕ）、pBifi-SP3B-TNF alphaを導入した大腸菌は選択培地上でコロニーを形成しなかった。

[0181] 参考例４：プラスミドpBEshuttleの構築

インサートを含まないタンパク質発現ユニットを持つモックベクターとして、pBEshuttleを以下のように構築した。概要を図１３に示した。

[0182] ＰＣＲ断片の調製

プラスミドpCDshuttle　５ｎｇを鋳型として、２つのＰＣＲ断片Ａ及びＢをPrimeSTAR(R) HS Premix（タカラバイオ株式会社）を用いて増幅した。ＰＣＲ断片Ａの増幅には、MCS F1 primer及びTNFvec R1 primerを、ＰＣＲ断片Ｂの増幅には、pUC ori F2 primer及びMCS R1 primerを用いた(表８)。

ＰＣＲ断片Ａ増幅用プライマーの５’側１５塩基は、ＰＣＲ断片Ｂの末端と相同な配列を、ＰＣＲ断片Ｂ増幅用プライマーの５’側１５塩基は、ＰＣＲ断片Ａの末端と相同な配列をもつよう設計した。

ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃でＸ秒（ＰＣＲ断片Ａ増幅：Ｘ＝３分２０秒、ＰＣＲ断片Ｂ増幅：Ｘ＝３５秒）を３０サイクル行った後、７２℃で３０秒とした。

ＰＣＲ産物の一部をアガロースゲル（１×TBE buffer, エチジウムブロマイド入り。ＰＣＲ産物Ａ用：０．８%アガロースゲル、ＰＣＲ産物Ｂ用：２%アガロースゲル）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、シングルバンド（ＰＣＲ産物Ａ：約３．３ｋｂｐ、ＰＣＲ産物Ｂ：約０．６ｋｂｐ）である事を確認し、またその濃度を見積もった。

[0183] [表10]

表８　pBEshuttleの構築用プライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')	PCR product
MCS_F1 primer	AAGCTTATCCTGCAGTGACCTTCTGCTCGTAGCGA	A
TNFvec_R1_primer	GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG	A
pUC_ori_F2_primer	TGGCCTAACTACGGCTACAC	B
MCS_R1 primer	CTGCAGGATAAGCTTCATAAAGCATCCTTCTTG	B

[0184] クローニング

上記ＰＣＲ産物Ａ　１００ｎｇ及びＰＣＲ産物Ｂ　３５ｎｇをIn-Fusion Advantage PCR Cloning Kit（タカラバイオ株式会社）を用いて末端配列の組換えを行いつなげた。この時、Cloning Enhancer（タカラバイオ株式会社）も反応液に加え、インサート及びベクター中に含まれる鋳型プラスミドの分解も同時に行った。詳細は、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kitの製品説

明書に従った。

上記インフュージョン反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitorogen社）の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン株式会社）。このプラスミドの全長配列を決定し、pBEshuttleとした（配列番号５０）。

[0185] ビフィズス菌の形質転換

プラスミドpBEshuttleを用いてB.longum 105Aの形質転換を製造例１と同様の方法を用いて行った。

[0186] 製造例７：組換えビフィズス菌B.breve/pSP3B-TNF alphaの作製

製造例１の、ビフィズス菌の形質転換と同様の方法にて、プラスミドpSP3B-TNF alphaによるBifidobacterium breve JCM1192の形質転換を行った。

[0187] 実施例５：組換えビフィズス菌のＴＮＦαタンパク質の発現量確認

参考例４で得たB. longum 105A/pBEshuttle、製造例４で得た、B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha、製造例６で得たB. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alpha及び製造例７で得たB. breve/pSP3B-TNF alphaグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養）。APS-2S-2.5SE液体培地２０ｍＬに１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。この培養液を遠心分離し、培養上清を回収した。培養上清をＥＬＩＳＡ法(Quantikine Human TNF alpha/TNFSF1A Immunoassay, R&D Systems, Inc.)により培養上清中のＴＮＦα量を測定した。測定結果を表９に示した。

[0188]

[表11]

表 9

sample name	culture time (hrs)	OD(600nm)	TNFalpha conc. (μg/mL)
B. longum 105A/pBEshuttle	18	2.539	0
B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha	18	1.806	0.69
B. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alpha	18	1.509	0.42
B. breve/pSP3B-TNF alpha	12	6.864	1.94

[0189] B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha、B. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alphaおよびB. breve/pSP3B-TNF alphaのいずれも培養上清中にＴＮＦαが分泌されていたが、B. longum 105A/pBEshuttleでは観察されなかった。

[0190] 実施例６：組換えビフィズス菌で分泌したＴＮＦαタンパク質の生理活性と抗ｈＴＮＦα抗体による生理活性の中和

被験菌の培養及び培養上清の調製

参考例４で得たB. longum 105A/pBEshuttle、製造例４で得た、B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha及び製造例６で得たB. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alphaグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養）。APS-2S-2.5SE液体培地２０ｍＬに１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した。この培養液を遠心分離し、培養上清を回収した。

[0191] ＴＮＦαの細胞毒性試験

ｒｈＴＮＦαの生理活性と中和は、ＴＮＦαの生理活性であるＴＮＦα受容体を介した細胞毒性を調べる事により判定した。被験細胞としてヒト乳癌細胞株のＫＰＬ－１細胞を用いた。ＫＰＬ－１細胞はＤＭＥＭ培地（１０%（ｖ／ｖ）ＦＢＳ及び０．１%（ｖ／ｖ）ペニシリン（５００００Ｕ／ｍＬ）・ストレプトマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）液を添加したＤＭＥＭ培地）にて３７℃、５%CO_2の条件下で培養した。この細胞１×１０^{4}個／ウェルを９６ウェルプレートに播種し３７℃、５%CO_2で２４時間培養しコンフルエ

ントの細胞を得た。この細胞より古い培地を吸引除去し、新しく終濃度５μｇ／ｍＬアクチノマイシンＤとなるように、アクチノマイシンＤを添加した１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ及び０．１％ペニシリン（５００００Ｕ／ｍＬ）・ストレプトマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）液添加ＤＭＥＭ培地を８０μＬ／ウェルずつ添加した。次に、測定試料としてビフィズス菌用培地（APS-2S-2.5SE培地）、ｒｈＴＮＦα標準品として１００ｎｇ／ｍＬに調製したrhTNF alpha、B. longum 105A/pBEshuttle培養上清５倍希釈液、B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha培養上清５倍希釈液及びB. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alpha培養上清５倍希釈液を１０μＬ／ウェルずつ添加した。ここに、ｒｈＴＮＦα生理活性の中和能測定のため、抗ｈＴＮＦα抗体（anti-human TNF alpha, R&D Systems、０．０１２５～０．１ｍｇ／ｍＬ）、正常ヤギＩｇＧ（normal Goat IgG, R&D Sytems、０．０１２５～０．１ｍｇ／ｍＬ）及び１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ及び０．１％（ｖ／ｖ）ペニシリン（５００００Ｕ／ｍＬ）・ストレプトマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）液を添加したＤＭＥＭ培地の各１０μＬ／ウェルを添加した。このプレートを３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。

[0192] 細胞毒性の測定はCell Counting Kit-8（DOJINDO）を使用し、この液１０μＬ／ウェルずつを各ウェルに添加後、さらに４時間３７℃、５％CO_2にてインキュベートし、波長４５０ｎｍと６３０ｎｍで吸光度を測定した（６３０ｎｍを参照波長とした）。解析結果を図１４に示した。これにより、組換え菌B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha及びB. longum 105A/pBifiSP3B-TNF alphaの培養上清は、ＫＰＬ－１細胞に対し細胞毒性を示し、なおかつ抗ＴＮＦα抗体により中和されたことから、培養上清中に分泌された組換えｈＴＮＦαが生理活性を有するものであることを確認した。

[0193] 実施例７：B.longum 105A/pSP3B-TNF alphaおよびB.breve/pSP3B-TNF alphaの抗腫瘍効果測定

製造例４で作製したB.longum 105A/pSP3B-TNF alphaおよび製造例７で作製したB.breve/pSP3B-TNF alphaの抗腫瘍効果を測定した。

[0194] （１）移植腫瘍細胞の培養

ヒト乳癌細胞株のＫＰＬ－１細胞は、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ及び０．１％（ｖ／ｖ）ペニシリン（５００００Ｕ／ｍＬ）・ストレプトマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）液を添加したＤＭＥＭ培地にて３７℃、５％CO_2の条件下で培養した。

コンフルエントとなった時点で１×ＰＢＳ（－）で洗浄後１×トリプシン－ＥＤＴＡを加えて細胞を剥がし、遠心操作（１０００回転／５分間）で回収した細胞を、ＤＭＥＭ培地にて適宜希釈して継代培養した。

移植実験には５回継代後の細胞を用いた。トリパンブルーで染色されない生細胞数をThoma血球計算盤(Thoma deep 0.1 mm ERMA、東京)で計数し、ハンクス液に懸濁して細胞数を２．５×10^6個／ｍＬに調製した。

[0195] （２）担癌ヌードマウス作製と腫瘍体積の測定

調製したＫＰＬ－１細胞懸濁液０．２ｍＬをヌードマウスの右前肢背部側の皮下に移植した（５×10^5個／マウス）。

移植後の腫瘍体積は、腫瘍径（長径、短径、厚み）をノギスで測定し、下式により求めた。

腫瘍体積（mm^3）＝長径（ｍｍ）×短径（ｍｍ）×厚み（ｍｍ）／２

[0196] （３）群分けおよび群構成

ＫＰＬ－１担癌ヌードマウスの腫瘍体積がおよそ８０～１３５mm^3程度のマウス２４匹を選別して、平均腫瘍体積が同程度になるように３群（１群８匹）に分けた。この日をDay 0と設定した。

試験群構成は表１０に示すとおりである。すなわち、第一群：無処理群、第二群：B.longum 105A/pSP3B-TNF alpha投与群、第三群：B.breve/pSP3B-TNF alpha投与群とした。

[0197]

[表12]

表 10：群構成

群	投与物質	投与量	投与回数（回/日）	投与日（Day）	動物数
第Ⅰ群	—	—	—	—	8
	—	—	—	—	
第Ⅱ群	B.longum 105A/pSP3B-TNF alpha	0.2 mL/body/time	2	1,4,8,11	8
	マルトース	200 mg/body/day	2	1～21	
第Ⅲ群	B.breve/pSP3B-TNF alpha	0.2 mL/body/time	2	1,4,8,11	8
	マルトース	200 mg/body/day	2	1～21	

[0198] （４）菌の培養及び投与用菌液の調製

菌の培養

製造例４で作製したビフィズス菌B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha及び製造例７で得たB. breve/pSP3B-TNF alphaのグリセリンストックを、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２３．５時間嫌気培養した（活性化培養液）。次に、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬに活性化培養液の１%を植菌し、３７℃で１８時間嫌気培養した（本培養液）。

[0199] 投与用培養生菌の調製（B. longum 105A/pSP3B-TNF alpha）

上記で得られた本培養液の１０ｍＬをメスピペットで量りとり、４０ｍＬのよく冷やしたＰＢＳバッファーの入ったコニカルチューブに加え、転倒混和にて穏やかに混ぜた後、４℃に冷却した遠心機にて８０００ｒｐｍで１０分間遠心した。遠心後、上清を除き新しいＰＢＳバッファーを４０ｍＬ加え、ボルテックスにて穏やかに混ぜた。この操作を４回繰り返し菌体の洗浄を

行った。洗浄した菌体を５ｍＬのＰＢＳバッファーに懸濁し、これを投与用培養生菌とした。

[0200] 投与用培養生菌の調製（B. breve/pSP3B-TNF alpha）

上記で得られた本培養液の１０ｍＬをメスピペットで量りとり、４０ｍＬのよく冷やしたＰＢＳバッファーの入ったコニカルチューブに加え、転倒混和にて穏やかに混ぜた後、４℃に冷却した遠心機にて８０００ｒｐｍで１０分間遠心した。遠心後、上清を除き新しいＰＢＳバッファーを４０ｍＬ加え、ボルテックスにて穏やかに混ぜた。この操作を４回繰り返し菌体の洗浄を行った。洗浄した菌体を１０ｍＬのＰＢＳバッファーに懸濁し、これを投与用培養生菌とした。

[0201] （５）菌およびマルトースの投与

菌の投与

第二群および第三群にマウスあたり０．２ｍＬの各培養生菌（第二群：B.lonum 105A/pSP3B-TNF alpha、第三群：B.breve/pSP3B-TNF alpha）を１日２回（ＡＭ／ＰＭ）、週に２回（Day 1,4,8,11）のペースで２週間に渡って静脈内投与した。培養生菌は、総投与容量として１．６ｍＬ、総投与菌数としてB.lonum 105A/pSP3B-TNF alphaでは３．１×１０^{9}ｃｆｕ／マウス、B.breve/pSP3B-TNF alphaでは４．８×１０^{9}ｃｆｕ／マウスを投与した。投与生菌数は以下のようにして測定した。

[0202] 生菌数測定

培養生菌を嫌気性希釈液で１０^{6}倍に希釈し、その１００μＬをＢＬＦＳプレート各３枚に塗布し、密閉容器（アネロパック角型ジャー、三菱ガス化学）内に脱酸素・炭酸ガス発生剤と共に３７℃の恒温器で３日間嫌気培養した。コロニー数が３０～３００程度検出されるプレートから下式により投与菌数を算出した。

投与菌数（ｃｆｕ）＝コロニー数（ａ）×プレート塗布時の希釈率（ｂ）×培養生菌１ｍＬ当たりの換算係数（ｃ）×投与量（ｍＬ）

（ａ）：（Ｐ１＋Ｐ２＋Ｐ３）／３　〔３プレート（Ｐ１，Ｐ２，Ｐ３）の

平均コロニー数〕

（ｂ）：×１０^{6}　〔１０^{6}倍希釈〕

（ｃ）：×１０　〔１プレートあたり１００μＬを塗布〕

[0203] マルトースの投与

第二、三群に、菌の糖源として１０%マルトース溶液１ｍＬをマウスに１日に２回（２００ｍｇ／ｂｏｄｙ／ｄａｙ）腹腔内投与した。投与期間は培養生菌投与日から２１日間（Day 1～21）とした。

[0204] （６）腫瘍増殖抑制効果の確認

全てのマウスについて、治療開始前（群分け時）および治療開始後２２日間、３～４日に１回の頻度で腫瘍径を測定し、腫瘍増殖に対する効果を確認した。

各群のマウスの腫瘍体積の平均値±ＳＤを算出し、対照群（第一群）に対する相対腫瘍体積比率〔Ｔ／Ｃ（%）〕を指標として抗腫瘍効果を判定した。また第一群と第二群、第一群と第三群の間での統計学的解析（２群間比較：ｔ－ｔｅｓｔ）を実施した。

各群の腫瘍体積（平均値±ＳＤ）を以下の表１１に示す。

またこの時の経日的な腫瘍体積の変動を図１５に示す。

[0205]

[表13]

表11:各群の平均腫瘍体積

群 投与量	動物数	群分け（Day0）後の腫瘍体積（mm³）								T/C (%)#1 at Day22	Two tailed t-test (p-value) 第一群 vs
		測定日 (Day)	0	3	7	10	14	18	22		
一） 無処置	8	平均	107.2	168.6	284.4	426.6	658.3	1347.7	2128.8	-	-
		S.D.	19.6	38.0	62.1	139.0	248.3	647.2	1040.1		
二） B.lonum 105A /pSP3B-TNF alpha	8	平均	105.9	146.7	196.6	274.4	420.0	680.2	1026.8	48.3	0.021
		S.D.	18.1	23.6	33.8	64.7	127.5	225.9	548.6		
三） B.breve /pSP3b-TNF alpha	8	平均	105.6	142.4	181.7	181.9	291.6	387.3	579.4	27.2	0.004
		S.D.	18.6	45.8	56.7	64.5	61.3	146.6	282.3		

#1：T／C（%）＝第二群あるいは第三群の平均腫瘍体積／第一群の平均腫瘍体積×１００

[0206] B.lonum 105A/pSP3B-TNF alphaおよびB.breve/pSP3B-TNF alphaのどちらを投与した群においても、無処理群と比較して、有意な腫瘍体積の減少が観察された。

[0207] 実施例８：B.longum 105A/pSP3B-TNF alphaの抗腫瘍効果測定

製造例４で作製したB.longum 105A/pSP3B-TNF alphaのアドリアマイシン併用における抗腫瘍効果を測定した。

（１）移植腫瘍細胞の培養

ヒト乳癌細胞株のＫＰＬ－１細胞は、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ及び０．１％（ｖ／ｖ）ペニシリン（５００００Ｕ／ｍＬ）・ストレプトマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）液を添加したＤＭＥＭ培地にて３７℃、５％CO_2の条件下で培養した。

コンフルエントとなった時点で１×ＰＢＳ（－）で洗浄後１×トリプシン－ＥＤＴＡを加えて細胞を剥がし、遠心操作（１０００回転／５分間）で回

収した細胞を、ＤＭＥＭ培地にて適宜希釈して継代培養した。

移植実験には５回継代後の細胞を用いた。トリパンブルーで染色されない生細胞数をThoma血球計算盤(Thoma deep 0.1 mm ERMA、東京)で計数し、ハンクス液に懸濁して細胞数を２．５×１０^{6}個／ｍＬに調製した。

[0208] （２）担癌ヌードマウス作製と腫瘍体積の測定

調製したＫＰＬ－１細胞懸濁液０．２ｍＬをヌードマウスの右前肢背部側の皮下に移植した（５×１０^{5}個／マウス）。移植後の腫瘍体積は、腫瘍径（長径、短径、厚み）をノギスで測定し、下式により求めた。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝長径（ｍｍ）×短径（ｍｍ）×厚み（ｍｍ）／２

[0209] （３）群分けおよび群構成

ＫＰＬ－１担癌ヌードマウスの腫瘍体積がおよそ８０～１２０ｍｍ^{3}程度のマウス１８匹を選別して、平均腫瘍体積が同程度になるように４群（１群６匹）に分けた。この日をDay 0と設定した。

試験群構成は表１２に示すとおりである。すなわち、第一群：無処理群、第二群：アドリアマイシン単独投与群、第三群：菌(B.longum 105A/pSP3B-TNF alpha)＋アドリアマイシン併用投与群とした。

[0210]

[表14]

表１２：群構成

群	投与物質	投与量	投与回数（回/日）	投与日（Day）	動物数
第Ⅰ群	菌	—	—	—	6
	マルトース	—	—	—	
	アドリアマイシン	—	—	—	
第Ⅱ群	菌	—	—	—	6
	マルトース	—	—	—	
	アドリアマイシン	5 mg/kg	1	0 *	
第Ⅲ群	菌	0.2 mL/body/time	2	1,5,8,12	6
	マルトース	200 mg/body/day	2	1 to 20	
	アドリアマイシン	5 mg/kg	1	0 *	

[0211] （４）菌(B.longum 105A/pSP3B-TNF alpha)の培養

製造例４で作製したビフィズス菌B. longum 105A/pSP3B-TNF alphaのグリセリンストックを、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２３．５時間嫌気培養した（活性化培養液）。次に、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬに活性化培養液の１%を植菌し、３７℃で１８時間嫌気培養した（本培養液）。

[0212] 投与用培養生菌の調製

上記本培養液の５ｍＬをメスピペットで量りとり、２０ｍＬのよく冷やしたＰＢＳバッファーの入ったコニカルチューブに加え、転倒混和にて穏やかに混ぜた後、４℃に冷却した遠心機にて８０００ｒｐｍで１０分間遠心した。遠心後、上清を除き新しいＰＢＳバッファーを２０ｍＬ加え、ボルテックスにて穏やかに混ぜた。この操作を４回繰り返し菌体の洗浄を行った。洗浄

した菌体を２．５ｍＬのＰＢＳバッファーに懸濁し、これを投与用培養生菌とした。

[0213] （５）菌、マルトースおよびアドリアマイシンの投与

菌の投与

第三群に、マウスあたり０．２ｍＬの培養生菌（被験薬）を１日に２回（ＡＭ／ＰＭ）、週に２回（Day 1, 5, 8, 12）静脈内投与した。培養生菌は、総投与容量として１．６ｍＬ、総投与菌数として３．０×１０^{9}ｃｆｕ／マウスを投与した。投与生菌数は以下のようにして測定した。

[0214] 生菌数測定

培養生菌を嫌気性希釈液で１０^{6}倍に希釈し、その１００μＬをＢＬプレート各３枚に塗布し、密閉容器（アネロパック角型ジャー、三菱ガス化学）内に脱酸素・炭酸ガス発生剤と共に入れ３７℃の恒温器で３日間嫌気培養した。コロニー数が３０～３００程度検出されるプレートから下式により投与菌数を算出した。

投与菌数（ｃｆｕ）＝コロニー数（ａ）×プレート塗布時の希釈率（ｂ）×培養生菌１ｍＬ当たりの換算係数（ｃ）×投与量（ｍＬ）

（ａ）：（Ｐ１＋Ｐ２＋Ｐ３）／３　〔３プレート（Ｐ１，Ｐ２，Ｐ３）の平均コロニー数〕

（ｂ）：×１０^{6}　〔１０^{6}倍希釈〕

（ｃ）：×１０　〔１プレートあたり１００μＬを塗布〕

[0215] マルトースの投与

第三群に、菌の糖源として１０％マルトース溶液１ｍＬをマウスに１日に２回（２００ｍｇ／ｂｏｄｙ／ｄａｙ）腹腔内投与した。投与期間は培養生菌投与日から２０日間（Day 1～20）とした。

アドリアマイシンの投与

第二群および第三群に、アドリアマイシン溶液（１．０ｍｇ／ｍＬ）０．１ｍＬを初回菌投与の前日（Day0）のみマウスに静脈内投与した。

[0216] （６）腫瘍増殖抑制効果の確認

全てのマウスについて、治療開始前（群分け時）および治療開始後２１日間、３～４日に１回の頻度で腫瘍径を測定し、腫瘍増殖に対する効果を確認した。

各群のマウスの腫瘍体積の平均値±ＳＤを算出し、対照群（第一群）に対する相対腫瘍体積比率〔Ｔ／Ｃ（％）〕を指標として抗腫瘍効果を判定した。またＴＮＦαを分泌する本菌の抗腫瘍能を判定するため、第二群と第三群の間で統計学的解析（２群間比較：ｔ－ｔｅｓｔ）を実施した。

各群の腫瘍体積（平均値±ＳＤ）を以下の表１３に示す。

またこの時の経日的な腫瘍体積の変動を図１６に示す。

[0217] [表15]

表 13: 各群の平均腫瘍体積

群 投与薬	動物数	群分け (Day0) 後の腫瘍体積 (mm³)								T/C (%)#2 at Day21	Two tail t-test (p-value) 一)vs 二)vs 三)
		測定日 (Day)	0	4	7	11	15	19	21		
一) 無処置	8	平均	100.3	156.5	236.5	347.4	613.5	1002.2	1337.0	-	-
		S.D.	13.8	44.4	77.5	157.2	274.9	561.6	726.0		-
二) ｱﾄﾞﾘｱﾏｲｼﾝ#1 投与	8	平均	97.7	133.6	145.4	207.9	415.2	625.2	852.6	63.8	0.168
		S.D.	14.0	21.5	25.3	42.5	92.4	137.5	199.0		-
三) 菌＋ｱﾄﾞﾘｱﾏｲｼﾝ#1 投与	8	平均	97.8	96.9	100.7	120.4	148.5	220.4	265.0	19.8	0.015
		S.D.	12.6	30.0	29.1	26.8	57.8	57.7	104.6		0.0003

＃１）：アドリアマイシン５．０ｍｇ／ｋｇ

＃２）：Ｔ／Ｃ（％）＝第二群あるいは第三群の平均腫瘍体積／第一群の平均腫瘍体積×１００

[0218] B.longum 105A/pSP3B-TNF alphaとアドリアマイシンとを併用した群は、無処理の群のみならず、アドリアマイシンのみを投与した群と比較しても有意

に腫瘍体積が減少していた。これはすなわち、アドリアマイシンとB.longum 105A/pSP3B-TNF alphaを併用することで効果を高めることができることを意味する。

[0219] 製造例８：非分泌型ヒトＩＬ－１８発現ビフィズス菌の作製

プラスミドphIL18mut-Hisの構築

ビフィズス菌由来のＨｕプロモーター下流にヒトＩＬ－１８のみを配し、分泌シグナルを有していないシャトルベクター（ビフィズス菌－大腸菌）を構築した。概要を図１７に示す。詳細は以下のとおりである。

[0220] インサート調製

ヒトＩＬ－１８（Accession No: NM_001562、成熟タンパク質コード領域３２９番目から７９９番目の塩基配列）のコドンをビフィズス菌用に最適化した人工ＤＮＡ、その上流及び下流にビフィズス菌由来のＨｕプロモーター及びＨｕターミネーターを配したプラスミド：human IL18_opt_in_pUC57（GenScriptにカスタム合成依頼）を使用した。人工ＤＮＡ合成の際には、成熟ヒトＩＬ－１８の７番目のアミノ酸（Ｅ→Ａ）及び５４番目のアミノ酸（Ｋ→Ａ）の２ヶ所にアミノ酸置換を導入し、ＩＬ－１８結合タンパクによる中和を減少させ、Ｃ末端にヒスチジンタグを付加した（成熟ヒトＩＬ－１８のアミノ酸配列：配列番号４７）。

[0221] プラスミドhuman IL18_opt_in_pUC57　２μｇにＢａｍＨＩ　２５ｕｎｉｔ及びＢｃｕＩ　１５ｕｎｉｔ（酵素は何れもFermentas）を添加し、３７ｏＣにて３時間保温し完全分解した。消化後のプラスミドを、１%精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にて電気泳動してＤＮＡ断片を分離した。約１ｋｂｐの小断片を切り出し、ＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。精製ＤＮＡ断片（インサート）を０．８%アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

[0222] ベクター調製

プラスミドpCDshuttleをＢａｍＨＩ、ＢｃｕＩ、ＰｓｔＩ、Ｂｓｐ１１９Ｉ（何れもFermentas、ＰｓｔＩ及びＢｓｐ１１９Ｉは、ＣＤ上に認識部位がある）にて完全分解した。反応条件は、酵素の使用説明書に従った。消化後のプラスミドを、１％精製用アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）電気泳動にて分離し、約３．４ｋｂｐの大断片を切り出し、ＤＮＡ抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit、キアゲン株式会社）にてアガロースゲルからＤＮＡを抽出及び精製した。精製ＤＮＡ断片（ベクター）を０．８％アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にＤＮＡ濃度マーカーとともに電気泳動し、その濃度を見積もった。

[0223] クローニング

上記ベクター及びインサートを１：３（モル比）にて混合し、ライゲーションを行なった（Rapid DNA Ligation Kit、Fermentas）。詳細は、製品説明書に従った。

上記ライゲーション反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitorogen社)の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７oCで一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit, キアゲン株式会社）。このプラスミド名を、phIL18mut-His とした(配列番号４８)。

[0224] pSP3B-hIL18mutの構築

ビフィズス菌由来のＨｕプロモーター下流にシグナルペプチドと融合したhuman IL18mutを配したシャトルベクター（ビフィズス菌－大腸菌）を構築した。概要を図１８に示す。詳細は以下のとおりである。

インサート調製

プラスミドphIL18mut-His　５ｎｇを鋳型として、hIL18mutコード領域をPrimeSTAR（Ｒ） HS Premix（タカラバイオ株式会社）にてＰＣＲ増幅した。プライマーは、IL18 F2プライマー及びIL18 R2プライマーを用い、各プライマ

一の５’側１５塩基は、ベクターの末端と相同な配列とした（表１４）。ＰＣＲ産物にＩＬ－１８のＣ末端のヒスチジンタグが含まれないようプライマー設計を行った。ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で３０秒を３０サイクル行った後、７２℃で３０秒とした。

ＰＣＲ産物の一部を、ＤＮＡ濃度マーカーとともに２％アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にて電気泳動し、約０．５ｋｂｐのシングルバンドである事を確認し、またその濃度を見積もった。

[0225] ベクター調製

プラスミドpSP3B-TNFalpha　５ｎｇを鋳型として、シグナルペプチドSP3及びベクター骨格をPrimeSTAR(R) HS Premix（タカラバイオ株式会社）にてＰＣＲ増幅した。プライマーは、vector F3プライマー及びvector R2プライマー（表１４）を用い、各プライマーの５’側１５塩基は、インサートの末端と相同な配列とした。ＰＣＲのプログラムは、９８℃で１０秒、５５℃で５秒、７２℃で４分を３０サイクル行った後、７２℃で３０秒とした。

ＰＣＲ産物の一部を、ＤＮＡ濃度マーカーとともに０．８％アガロースゲル（１×ＴＢＥ　ｂｕｆｆｅｒ、エチジウムブロマイド入り）にて電気泳動を行い、約４ｋｂｐのシングルバンドである事を確認し、またその濃度を見積もった。

[0226] [表16]

表 14　pSP3B-hIL18mut の構築用プライマー

Primers	Sequence (5' -> 3')	PCR product
IL18 F2 primer	TACTTCGGCAAGCTGGC	insert
IL18 R2 primer	GAGCAGAAGGTCATCAATCCTCGTTCTGGACGGTG	insert
vector_F3 primer	GATGACCTTCTGCTCGTAGCG	vector
vector_R2 primer	CAGCTTGCCGAAGTAGGCGATGGTCAGCTTGCC	vector

[0227] クローニング

上記ベクター１００ｎｇ及びインサート４０ｎｇをIn-Fusion Advantage PCR Cloning Kit（タカラバイオ株式会社）を用いて末端配列の組換えを行いつなげた。この時、Cloning Enhancer（タカラバイオ株式会社）も反応液に加え、インサート及びベクター中に含まれる鋳型プラスミドの分解も同時に行った。詳細は、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kitの製品説明書に従った。

[0228] 上記インフュージョン反応液２μＬを用いて大腸菌TOP10 chemically Competent Cell（Invitorogen 社）の形質転換を行った。形質転換条件は、製品説明書に従った。形質転換した大腸菌コロニーをＬＢ（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン含有）液体培地にて３７℃で一晩培養し、これよりプラスミドを抽出した（QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン株式会社）。このプラスミドの全長配列を決定し、pSP3B-hIL18mut とした（配列番号４９）。

[0229] ビフィズス菌の形質転換

プラスミドpSP3B-hIL18mutを用いてB.longum 105A及びB. breve JCM1192の形質転換を製造例１と同様の方法を用いて行なった。

[0230] 実施例９：組換えビフィズス菌のヒトＩＬ－１８タンパク質発現

試料調製

製造例８で得た組換えビフィズス菌:Bifidobacterium longum 105A/ pSP3B-hIL18mut及び参考例４で得たBifidobacterium longum 105A/ pBEshuttleのグリセリンストックをAPS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地に１%植菌し、３７℃で２４時間嫌気培養した（活性化培養液）。次に、APS-2S-2.5SE（７５μｇ／ｍＬスペクチノマイシン）液体培地２０ｍＬあたり１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．８）４ｍＬを添加した培地に、活性化培養液０．５%を植菌した。これを３７℃で１８時間嫌気培養した（本培養液）。

[0231] 上記と同様の方法にて、Bifidobacterium breve JCM1192/ pSP3B-hIL18mutの培養を行なった。ただし、本培養は１４時間培養とした。

本培養液を、１．５ｍＬ容チューブに１．３ｍＬとり、遠心分離（１４，

０００ｒｐｍ、５分、４℃）した後、その上清を回収し、これをＩＬ－１８測定用試料とした。

[0232] ＩＬ－１８測定

Human IL-18 ELISAキット（MBL）を用いて各上清のヒトＩＬ－１８タンパク量を測定した。その結果、Bifidobacterium longum 105A/ pSP3B-hIL18で９８６ｐｇ／ｍＬ、Bifidobacterium breve JCM1192/ pSP3B-hIL18mutで１６３２ｐｇ／ｍＬのＩＬ－１８が検出されたが、モックでは検出されなかった。

産業上の利用性

[0233] 本発明の分泌シグナルペプチドを、発現ユニットに導入することにより、生理活性を失うことなく発現タンパク質を効率的に形質転換菌体外に分泌させることが可能となる。したがって、本発明のベクターおよび該ベクターで形質転換された嫌気性微生物は従来のものと比較して、嫌気性疾患組織において、治療剤を効率的に疾患部位に供給することができるため、高い治療効果を得ることができる。

請求の範囲

[請求項1] 形質転換嫌気性菌作製用のプラスミドであって、嫌気性菌で機能する分泌シグナルを含む発現カセットを具有し、且つ、非シャトルプラスミドである形質転換用プラスミド。

[請求項2] 嫌気性菌が、ビフィズス菌である、請求項１に記載のプラスミド。

[請求項3] 分泌シグナルペプチドが、ビフィズス菌由来である、請求項１または２に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項4] 分泌シグナルペプチドが、ビフィドバクテリウム・ロンガム菌由来である、請求項３に記載の形質転換プラスミド。

[請求項5] 分泌シグナルが、配列番号６～２８の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡである、請求項１～４のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項6] 分泌シグナルが、配列番号６、７、８、９、１２、１４、１５、１７、２１、２５若しくは２８の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列である、請求項５に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項7] 分泌シグナルが、配列番号８若しくは２５の塩基配列のいずれかで示されるＤＮＡまたはその一塩基変異多型である、請求項６に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項8] 発現カセットに含まれるプロモーターをコードする遺伝子が、配列番号２９～４４のプロモーター領域の塩基配列若しくは配列番号４５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡである、請求項１～７のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項9] 発現カセットに含まれるプロモーター遺伝子が、配列番号３５のプロモーター領域の塩基配列もしくは４５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列である、

請求項８に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項10] 発現カセットに含まれるターミネーター遺伝子が、配列番号４６の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるＤＮＡである、請求項１～９のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項11] 発現カセットに含まれる標的遺伝子が、蛍光蛋白質をコードする遺伝子である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項12] 発現カセットに含まれる標的遺伝子が、抗腫瘍活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項13] 抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等のサイトカインおよび、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングルー１、クリングルー２、クリングルー３、クリングルー４、クリングルー５等の血管新生抑制物質からなる群から選ばれる一種である、請求項１２に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項14] 抗腫瘍活性を有する蛋白質が、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－αまたはＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）のいずれかであ

る、請求項１３に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項15] 標的遺伝子が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項16] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質がシトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよびβ－グルクロニダーゼからなる群から選ばれる一種である、請求項１５に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項17] 標的遺伝子が、虚血性疾患治療活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項18] 虚血性疾患治療活性を有する蛋白質が、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などの血管新生促進活性を有する蛋白質からなる群から選ばれる一種である、請求項１７に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項19] 標的遺伝子が、嫌気的疾患の治療活性を有する核酸である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項20] 嫌気的疾患の治療活性を有する核酸が、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などからなる群から選ばれる少なくとも１種の腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、請求項１９に記載の形質転換用プラスミド。

[請求項21] 配列番号５の塩基配列またはその配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列のいずれかで示されるＤＮＡ配列を含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミド（pBifi-SP3B-TNF alpha）。

[請求項22] 請求項１～２１のいずれか一項に記載の形質転換用プラスミドで形

質転換された嫌気性菌からなる遺伝子輸送担体。

[請求項23] 嫌気性菌が、非病原性の腸内細菌である、請求項２２に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項24] 嫌気性菌が、ビフィズス菌である、請求項２２または請求項２３に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項25] ビフィズス菌が、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アングラタム、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・アステロイデス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ボウム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム、ビフィドバクテリウム・コエリナム、ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ、ビフィドバクテリウム・クニクリ、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス、ビフィドバクテリウム・デンティウム、ビフィドバクテリウム・ガリクム、ビフィドバクテリウム・ガリナラム、ビフィドバクテリウム・グロボサム、ビフィドバクテリウム・インディクム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・イノピナタム、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス、ビフィドバクテリウム・リベロラム、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・マグナム、ビフィドバクテリウム・メリシクム、ビフィドバクテリウム・ミニマム、ビフィドバクテリウム・モンゴリエンス、ビフィドバクテリウム・パルブロラム、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サイクラエロフィラム、ビフィドバクテリウム・プロラム、ビフィドバクテリウム・ルミナレ、ビフィドバクテリウム・ルミナンチウム、ビフィドバクテリウム・サエクラレ、ビフィドバクテリウム・スカルドヴィ、ビフィドバクテリウム・サブタイル、ビフィドバクテリウム・スイス、ビフィドバクテリウム・テルマシドフィラム、およびビフィドバク

テリウム・サーモフィラムからなる群より選ばれる１種である、請求項２４に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項26] ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、請求項２５に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項27] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、少なくとも１種の、嫌気的疾患の診断若しくは治療に有用な、蛋白質または核酸を発現し、分泌することができる、請求項２２～２６のいずれか一項に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項28] 嫌気的疾患の診断に有用な蛋白質が、蛍光蛋白質である、請求項２７に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項29] 嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍活性を有する蛋白質である、請求項２７に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項30] 抗腫瘍活性を有する蛋白質が、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、リンホトキシン（ＬＴ）－β、ＴＮＦ関連アポトーシス誘発リガンド（ＴＲＡＩＬ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、白血病阻止因子（ＬＩＦ）、Ｔ細胞活性化共刺激因子Ｂ７（ＣＤ８０）及びＢ７－２（ＣＤ８６）、キット・リガンド、オンコスタチンM等のサイトカインおよび、エンドスタチン、アンジオスタチン、クリングルー１、クリングルー２、クリングルー３、クリングルー４、クリングルー５等の血管新生抑制物質からなる群から選ばれる一種である、請求項２８に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項31] 嫌気的疾患の治療に有用な蛋白質が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物

質に変換する活性を有する蛋白質である、請求項２７に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項32] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質がシトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよびβ－グルクロニダーゼからなる群から選ばれる一種である、請求項３１に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項33] 嫌気的疾患の治療に有用な核酸が、嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、請求項２７に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項34] 嫌気的疾患因子に関与するｓｉＲＮＡｓが、線維芽細胞増殖因子２（ＦＧＦ２）、内皮細胞増殖因子（ＥＣＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）および肝実質細胞増殖因子（ＨＧＦ）などからなる群から選ばれる少なくとも１種の腫瘍細胞増殖因子に関与するｓｉＲＮＡｓである、請求項３３に記載の遺伝子輸送担体。

[請求項35] 請求項２２～３４のいずれか一項に記載の遺伝子輸送担体を含有する医薬組成物。