

明 細 書

発明の名称：

マイナス鎖RNAウイルスベクターの製造方法および製造されたマイナス鎖RNAウイルスベクター

技術分野

[0001] 本発明は、マイナス鎖RNAウイルスベクターの製造方法および製造されたマイナス鎖RNAウイルスベクターに関する。

背景技術

[0002] センダイウイルスベクターに代表されるマイナス鎖RNAウイルスベクターは、遺伝子導入のため、またはサイトカイン誘導のために有益で有り得る。センダイウイルスベクターに代表されるマイナス鎖RNAウイルスベクターは、cDNAから産生させることによりパッケージング細胞内で有利に産生させることができる（特許文献1）。

[0003] ワクシニアウイルスのE3Lは、二本鎖RNA結合タンパク質であり、インターフェロン耐性や細胞内での増殖を促進させることが報告されている（非特許文献1）。ポックスウイルス、またはワクシニアウイルスの産生において、K3L、E3L、VA1 RNA、EBER、σ3、TRBP、およびこの組合せを用いてプロテインキナーゼR（PKR）を阻害すること、PKRが二本鎖RNA結合タンパク質であることが開示されている（特許文献2）。C8LおよびK3LがプロテインキナーゼR（PKR）の偽基質であることが開示されている（非特許文献2）。NS5AまたはNS5A（1-148）が、HCVに対する抗ウイルス活性を阻害する可能性が示唆されている（非特許文献3）。VA1 RNAを用いたウイルス産生方法が開示されている（特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2005/071092

特許文献2：WO98/040500

特許文献3：WO95/011983

非特許文献

[0005] 非特許文献1：T. Shors, et al., Virology, 239: 269-276, 1997

非特許文献2：M. K. Kobayashi et al., Virology, 276: 424-434, 2000

非特許文献3：T. Taguchi et al., J. Gen. Virol., 85: 959-969, 2004

発明の概要

[0006] 本発明は、マイナス鎖RNAウイルスベクターの製造方法および製造されたマイナス鎖RNAウイルスベクターを提供する。

[0007] 本発明者らは、マイナス鎖RNAウイルスの製造方法において、PKR阻害性の因子（例えば、PKR阻害性のウイルス性因子、ヒトnc886、ヒトp58^{IPK}、もしくはNS5A、またはこれらの組合せ）の存在下でパッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを発現させ、マイナス鎖RNAウイルスを形成させることが、パッケージング細胞内でのウイルス産生量を増加させることを見出した。

[0008] 本発明によれば、例えば、以下の発明が提供され得る。

（1）マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを製造する方法であって、

制御配列に作動可能に連結したプロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子（例えば、PKR阻害性のウイルス性因子、ヒトnc886、ヒトp58^{IPK}、もしくはNS5A、またはこれらの組合せ）をコードする遺伝子から当該因子を発現させてパッケージング細胞に供給することと、

パッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNAを発現させ、前記因子の存在下でマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを形成させることと（例えば、PKR阻害性の因子

、例えば、P K R 阻害性のウイルス性因子の存在下でパッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNAを発現させ、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを形成させることと、ここで、好ましくは、下記（13）に記載のDNAを用いて、ゲノムRNAおよび上記P K R 阻害性の因子を発現させることができる}、

形成されたマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを回収することと、
を含み、

好ましくは、前記ウイルスまたはウイルスベクターと前記P K R 阻害性の因子との関係が異種である、および／または、前記制御配列と前記P K R 阻害性の因子との関係が異種である、
方法。

（2）マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターが、センダイウイルスベクターである、上記（1）に記載の方法。

（3）前記P K R 阻害性の因子が、アデノウイルスのVA1 RNA、EBウイルスのEBER、ヒトnc886、HIVウイルスのTAR、ポリオウイルスの2A^{pro}、ワクシニアウイルスのE3L、レオウイルスのδ3、インフルエンザウイルスのNS1、ヒトp58^{IPK}、C型肝炎ウイルスのNS5A、ワクシニアウイルスのK3L、HIVウイルスのTat、単純ヘルペスウイルスのUs11、および単純ヘルペスウイルスのICP34.5、並びにこれらのオーソログからなる群から選択される1以上である、上記（1）または（2）に記載の方法。

（4）ヘルパーウイルス非存在下でマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを製造する、上記（1）～（3）のいずれかに記載の方法。

（5）前記ゲノムRNAが、制御配列に作動可能に連結したP K R 阻害性の因子をコードする遺伝子をさらに有する、上記（1）～（4）のいずれかに記載の方法。

（6）前記パッケージング細胞が、制御配列に作動可能に連結したP K R 阻

害性の因子をコードする遺伝子を有するゲノムDNAを有する、上記（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（７）前記パッケージング細胞が、V e r o細胞またはL L C－M K 2細胞である、上記（１）～（６）のいずれかに記載の方法。

（８）前記パッケージング細胞が、V e r o細胞からなる細胞集団またはL L C－M K 2細胞からなる細胞集団であって、他の細胞を含まない細胞集団である、上記（１）～（７）のいずれかに記載の方法。

（９）P K R阻害性の因子のいずれか１以上をコードする遺伝子を発現可能に含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

（１０）上記（９）に記載のRNAゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

（１１）目的遺伝子をさらに含む、上記（１０）に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

（１２）上記（１０）または（１１）に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを含む、組成物。

（１３）上記（９）に記載のRNAゲノムをコードするDNA。

（１４）制御配列に作動可能に連結された上記（１３）に記載のDNAを含む、遺伝子発現ベクター。

[0009] （１５）上記（１２）に記載の組成物であって、感染力価が 1×10^5 C I U / m L 以上である、組成物。

（１６）上記（１２）に記載の組成物であって、感染力価が 1×10^6 C I U / m L 以上である、組成物。

（１７）上記（１２）に記載の組成物であって、感染力価が 1×10^7 C I U / m L 以上である、組成物。

（１８）前記P K R阻害性の因子が、配列番号４～３１のいずれかに記載の配列を有する、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（１９）前記P K R阻害性の因子が、配列番号４～３１のいずれかに記載の

配列を有する、上記（９）～（１１）のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

（２０）前記PKR阻害性の因子が、配列番号４～３１のいずれかに記載の配列を有する、上記（１２）に記載の組成物。

（２１）前記PKR阻害性の因子が、配列番号４～３１のいずれかに記載の配列を有する、上記（１３）に記載のDNA。

（２２）前記PKR阻害性の因子が、配列番号４～３１のいずれかに記載の配列を有する、上記（１４）に記載の遺伝子発現ベクター。

[0010] （２３）前記因子を発現させることが、第１の制御配列に作動可能に連結された前記因子をコードする遺伝子を有するプラスミドベクターをパッケージング細胞に導入することにより実施される、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（２４）前記ゲノムRNAを発現させることが、第２の制御配列に作動可能に連結された前記ゲノムRNAをコードする遺伝子を有するプラスミドベクターをパッケージング細胞に導入することにより実施される、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（２５）前記因子を発現させることが、第１の制御配列に作動可能に連結された前記因子をコードする遺伝子を有するプラスミドベクターをパッケージング細胞に導入することにより実施され、かつ、

前記ゲノムRNAを発現させることが、第２の制御配列に作動可能に連結された前記ゲノムRNAをコードする遺伝子を有するプラスミドベクターをパッケージング細胞に導入することにより実施される、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（２６）マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを形成させることが、パッケージング細胞に、第２の制御配列に作動可能に連結されたウイルスのゲノムRNAをコードする遺伝子を有するプラスミドと、第３の制御配列に作動可能に連結されたウイルスの構成要素をコードする遺伝子を有するプラスミドを導入し、当該細胞内でゲノムRNAとウイルスの構成要素と

を発現させることを含む、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（２７）第３の制御配列が、EF1 α プロモーターであり、ウイルスの構成要素が、Nタンパク質およびLタンパク質のいずれかまたは両方を含む、上記（２６）に記載の方法。（２８）第３の制御配列が、EF1 α プロモーターであり、ウイルスの構成要素が、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質からなる群から選択される１以上、またはすべてである、上記（２６）に記載の方法。

（２９）パッケージング細胞が、Vero細胞である、上記（２８）に記載の方法。

（３０）第３の制御配列が、EF1 α プロモーターであり、ウイルスの構成要素が、Pタンパク質およびLタンパク質のいずれかまたは両方を含む、上記（２６）に記載の方法。（３１）第３の制御配列が、EF1 α プロモーターであり、ウイルスの構成要素が、Lタンパク質である、上記（２６）に記載の方法。

（３２）パッケージング細胞が、LLC-MK2細胞である、上記（３０）に記載の方法。

（３３）パッケージング細胞が、LLC-MK2細胞である、上記（３１）に記載の方法。

[0011] （３４）PKR阻害性の因子が、

（ｉ）E3Lまたはその一部、好ましくは、E3Lの少なくともC末端の107アミノ酸を含むペプチドと

（ｉｉ）K3Lと

を含む、上記のいずれかに記載の方法。

（３５）PKR阻害性の因子が、

（ｉ）E3Lまたはその一部、好ましくは、E3Lの少なくともC末端の107アミノ酸を含むペプチドと

（ｉｉｉ）Y3と

を含む、上記のいずれかに記載の方法。

(36) P K R 阻害性の因子が、V A I をさらに含む、上記 (34) に記載の方法。

(37) P K R 阻害性の因子が、V A I をさらに含む、上記 (35) に記載の方法。

(38) P K R 阻害性の因子が、V A I を含み、V A I が配列番号 17 に記載の配列を有する分子である、上記いずれかに記載の方法。

(39) P K R 阻害性の因子が、V A I を含み、P K R 阻害性の因子が配列番号 19 に記載の配列を有する分子である、上記いずれかに記載の方法。

(40) P K R 阻害性の因子が、配列番号 18、21～26 のいずれかに記載の配列を有する分子である、上記のいずれかに記載の方法。

(41) P K R 阻害性の因子が、n c 886 を含む、上記のいずれかに記載の方法。

(42) P K R 阻害性の因子が、配列番号 13 または 14 に記載の配列を有する分子である、上記のいずれかに記載の方法。

[0012] (43) 上記 (5) に記載の方法であって、前記ゲノム R N A が目的タンパク質をコードする遺伝子を有し、P K R 阻害性の因子が、V A I または配列番号 17～26 のいずれかに記載の配列を有する R N A 分子であり、V A I が、前記目的タンパク質をコードする遺伝子の 3' U T R に含まれている、方法。

(44) 前記パッケージング細胞が、制御配列に作動可能に連結した P K R 阻害性の因子をコードする遺伝子を有するゲノム D N A を有する、上記 (43) のいずれかに記載の方法。

(45) 前記パッケージング細胞が、V e r o 細胞または L L C - M K 2 細胞である、上記 (44) または (45) に記載の方法。

(46) 前記パッケージング細胞が、V e r o 細胞からなる細胞集団または L L C - M K 2 細胞からなる細胞集団であって、他の細胞を含まない細胞集団である、上記 (44) ～ (46) のいずれかに記載の方法。

[0013] (47) 上記 (9) に記載の R N A ゲノムであって、目的タンパク質をコー

ドする遺伝子を有し、P K R 阻害性の因子が、V A I または配列番号 1 7 ～ 2 6 のいずれかに記載の配列を有する R N A 分子であり、V A I または配列番号 1 7 ～ 2 6 のいずれかに記載の配列を有する R N A 分子が、前記目的タンパク質をコードする遺伝子の 3' U T R に含まれている、R N A ゲノム。

(4 8) 上記 (4 7) に記載の R N A ゲノムを含む、マイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクター。

[0014] (4 9) マイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターを製造する方法であって、

制御配列に作動可能に連結した N S 5 A をコードする遺伝子から当該因子を発現させてパッケージング細胞に供給することと、

N S 5 A の存在下でパッケージング細胞にマイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターのゲノム R N A を発現させ、マイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターを形成させることと、

形成されたマイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターを回収することと、

を含み、

前記ウィルスまたはウィルスベクターと前記 N S 5 A との関係が異種である、および／または、前記制御配列と前記 N S 5 A との関係が異種である、方法。

(5 0) マイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターを製造する方法であって、

制御配列に作動可能に連結した P K R 阻害性の因子をコードする遺伝子から当該因子を発現させてパッケージング細胞に供給することと、ここで、P K R 阻害性の因子は、ヒト n c 8 8 6 (V T R N A 2 - 1) およびヒト p 5 8 ¹ P K のいずれか、または両方であり、

前記 P K R 阻害性の因子の存在下でパッケージング細胞にマイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターのゲノム R N A を発現させ、マイナス鎖 R N A ウィルスまたはウィルスベクターを形成させることと、

形成されたマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを回収することと、

を含む、

ここで、前記制御配列と前記PKR阻害性の因子との関係が異種であってもよい、

方法。

(51) マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターが、センダイウイルスベクターである、上記(49)または(50)に記載の方法。

(52) 前記ゲノムRNAが、制御配列に作動可能に連結したPKR阻害性の因子をコードする遺伝子をさらに有する、上記(49)～(51)のいずれかに記載の方法。

(53) 前記パッケージング細胞が、制御配列に作動可能に連結したPKR阻害性の因子をコードする遺伝子を有するゲノムDNAを有する、上記(49)～(52)のいずれかに記載の方法。

(54) 前記パッケージング細胞が、Vero細胞またはLLC-MK2細胞である、上記(49)～(53)のいずれかに記載の方法。

(55) 前記パッケージング細胞が、Vero細胞からなる細胞集団またはLLC-MK2細胞からなる細胞集団であって、他の細胞を含まない細胞集団である、上記(49)～(54)のいずれかに記載の方法。

(56) PKR阻害性の因子のいずれか1以上をコードする遺伝子を発現可能に含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

(57) 上記(56)に記載のRNAゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

(58) 目的遺伝子をさらに含む、上記(57)に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

(59) 上記(57)または(58)に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを含む、組成物。

(60) 上記(56)に記載のRNAゲノムをコードするDNA。

(61) 制御配列に作動可能に連結された上記(60)に記載のDNAを含む、遺伝子発現ベクター。

[0015] (71) 制御配列(好ましくは、プロモーター配列)と第一のDNAと第二のDNAをこの順番で含む、当該RNAゲノムの遺伝子発現ベクター(好ましくは、プラスミド)であって、

前記第一のDNAは、RNAウイルスのRNAゲノムをコードし、

前記第二のDNAは、プロテインキナーゼR(PKR)阻害性の因子(例えば、PKR阻害性のウイルス性因子(好ましくは、VAI RNA、EBER、nc886、およびTAR、並びにこれらのオーソログ))をコードし、

第一のDNAと第二のDNAを含む一つながりの領域を形成し、当該領域は、制御配列に作動可能に連結されており、これにより、第一のDNAと第二のDNAは、一本のRNA内に転写される、遺伝子発現ベクター。

(72) プロテインキナーゼR(PKR)阻害性の因子が、VAIである、上記(71)に記載の遺伝子発現ベクター。

(73) 第一のDNAと第二のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(71)に記載の遺伝子発現ベクター。

(74) 第一のDNAと第二のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(72)に記載の遺伝子発現ベクター。

(75) 制御配列と第一のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(71)に記載の遺伝子発現ベクター。

(76) 制御配列と第一のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(72)に記載の遺伝子発現ベクター。

(77) 制御配列と第一のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(73)に記載の遺伝子発現ベクター。

(78) 制御配列と第一のDNAとの間に、自己切断型リボザイムの配列をさらに含む、上記(74)に記載の遺伝子発現ベクター。

(79) VAI RNAが、配列番号19、20、および23～26の一部であって、配列番号17に記載のヌクレオチド配列を含む配列を有しているもよい、上記いずれかに記載の発明。

(80) VAI RNAが、配列番号19、20、および23～26の一部であって、配列番号17に記載のヌクレオチド配列を含む配列に対応する、(i) VAI RNAと、(ii) VAI RNAの5'側の配列および3'側の配列のいずれかまたは両方を含む配列を有する、上記いずれかに記載の発明。

図面の簡単な説明

[0016] [図1A]図1Aは、VAI RNAの二次構造である。74塩基目を矢印で示した。

[図1B]図1Bは、VAI RNAを含む配列、およびその変異導入配列である。

[図2]図2は、VAIの存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図3]図3は、図2で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの感染力価を確認した実験の結果である。

[図4]図4は、nc886の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図5]図5は、PKR阻害性のウイルス性因子の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図6]図6は、図5で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの感染力価を確認した実験の結果である。

[図7]図7は、PKR阻害因子の融合配列の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図8]図8は、LLC-MK2-F細胞で発現用プロモーターの比較を行い、

P K R 阻害因子の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図9]図9は、V e r o - F 細胞で発現用プロモーターの比較を行い、P K R 阻害因子の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図10]図10は、複数のP K R 阻害因子の存在下または非存在下で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図11]図11は、図10で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの感染力価を確認した実験の結果である。

[図12]図12は、P K R 阻害因子をウイルスゲノムに搭載または非搭載で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した実験の結果である。

[図13]図13は、図12で製造したマイナス鎖RNAウイルスベクターの感染力価を確認した実験の結果である。

[図14]図14は、5' 側および3' 側に伸長したV A I RNAによるマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成効率を確認した結果である。

[図15]図15は、T 7 プロモーターとS e V ゲノムをコードするDNAの間へのハンマーヘッドリボザイムの導入と、P K R 阻害因子を恒常的に発現したパッケージング細胞を用いたS e V の再構成効率に与える効果を示す。

[図16]図16は、T 7 プロモーターとS e V ゲノムをコードするDNAとの間へのハンマーヘッドリボザイムの導入と、S e V ゲノムをコードするDNAとV A I RNAとの間へのHDVリボザイムの導入が、S e V の再構成効率に与える効果を示す。

[図17]図17は、HDVリボザイムがS e V ゲノムからV A I RNA自己切断していることを示すPCR実験の結果である。

[図18]図18は、S e V の再構成用プラスミドへのV A I (330bp) 74cの導入が、S e V の再構成効率に与える効果を示す。

[図19]図19は、SeVの再構成用プラスミドへのVAI（330bp）74cの導入とE3Y3の併用が、SeVの再構成効率に与える効果を示す。

[図20]図20は、SeVの再構成用プラスミドへのVAI（330bp）74cの導入とE3Y3の併用が、SeVの感染力価に与える効果を示す。

[図21A]図21Aは、実験に用いたpCAG-SeVとpEF1-SeV構築物のマップを示す。

[図21B]図21Bは、pCAG-SeVとpEF1-SeVの再構成効率を示す。

[図22]図22は、VAI RNAのムンプスウイルス（MuV；パラミクソウイルス科ブラウイルス属）の再構成効率に与える効果を示す。

[図23]図23は、VAI RNAの麻疹ウイルス（MeV；パラミクソウイルス科モルビリウイルス属）の再構成効率に与える効果を示す。

[図24]図24は、E3Y3の水疱性口内炎ウイルス（VSV；ラブドウイルス科ベシクロウイルス属）の再構成効率に与える効果を示す。

[図25]図25は、異種RNAポリメラーゼを用いたSeV、MeV、MuVの再構成効率を示す。

[図26]図26は、異種RNAポリメラーゼを用いたVSVの再構成効率を示す。

[図27A]図27Aは、実験に用いたp3vLPNP構築物のマップを示す。

[図27B]図27Bは、pCAG-SeVあるいはpEF1-SeVとp3vLPNPを用いたSeVの再構成の結果を示す。

発明の具体的な説明

[0017] 本明細書では、「マイナス鎖RNAウイルスベクター」とは、マイナス鎖RNAをゲノムとして有するウイルス（すなわち、マイナス鎖RNAウイルス）を目的遺伝子導入用に改変して得られた組換えウイルスである。マイナス鎖RNAウイルスとしては、オルソミクソウイルス科（インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス）、パラミクソウイルス科（モルビリウイルス属などのパラミクソウイルス）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルス

などのラブドウイルス)、フィロウイルス科(エボラとマールブルグウイルスなどのフィロウイルス)、およびブニavirus科(ハンタウイルスなどのブニavirus)が挙げられる。パラミクソウイルスとしては、オルソパラミクソウイルス亜科のウイルスが挙げられる。オルソパラミクソウイルス亜科のウイルスとしては、レスピロウイルス属のウイルス、例えば、センダイウイルスが挙げられる。

[0018] 本明細書では、「プロテインキナーゼR」(PKR)とは、二本鎖RNAによって活性化されるタンパク質リン酸化酵素である。PKRは、ヒトではEIF2AK2遺伝子によりコードされる。PKRは、N末端側の二本鎖RNA結合ドメインとC末端側のキナーゼドメインを含む。キナーゼドメインは、アポトーシス誘導機能を有する。PKRは、二本鎖RNAと結合することにより二量体化し、引き続いて自己リン酸化を引き起こして活性化する。活性化したPKRは、真核生物翻訳開始因子eIF2 α をリン酸化する。eIF2 α のリン酸化により細胞内のmRNAの翻訳が阻害される。活性化したPKRは、ウイルスの拡散を防ぐために細胞にアポトーシスを誘導することもできる。一部のウイルスは、PKRに対抗する因子(すなわち、PKR阻害性のウイルス性因子)を有している。例えば、ある種のウイルスは、PKRに結合して活性化を防ぐデコイRNAを産生する。デコイRNAとしては、アデノウイルスのVA1 RNA(例えば、配列番号17に記載の配列を有する)、EBウイルスのEBER(例えば、配列番号4に記載の配列を有する)、およびHIVのTAR(例えば、配列番号5に記載の配列を有する)が挙げられる。PKRの分解を誘導する分子として、ポリオウイルスの2A^{pro}(例えば、配列番号6に記載の配列を有する)が知られている。RNA性の因子に関しては、当該RNAをコードするヌクレオチドの3'末端にターミネーター(例えば、T7ポリメラーゼに対してはT7ターミネーター)が連結されていてもよい。ウイルスの二本鎖RNAをマスクしてPKRの活性化を防ぐ因子として、ワクシニアウイルスのE3L(例えば、配列番号7に記載の配列を有する)、レオウイルスの σ 3(例えば、配列番号8に記

載の配列を有する)、単純ヘルペスウイルスのU s 1 1 (例えば、配列番号29に記載の配列を有する)、およびインフルエンザウイルスのN S 1 (例えば、配列番号28に記載の配列を有する)が挙げられる。偽基質として、ワクシニアウイルスのK 3 L (例えば、配列番号10に記載の配列を有する)およびH I VのT a t (例えば、配列番号11に記載の配列を有する)が挙げられる。基質の脱リン酸化を誘導する分子として、単純ヘルペスウイルスのI C P 3 4 . 5 (例えば、配列番号12に記載の配列を有する)が挙げられる。これらの因子は、P K R阻害性のウイルス性因子である。これらの因子は、天然型であり得る。

[0019] 本明細書では、「n c 8 8 6」は、ノンコーディングRNAであり、V T RNA 2-1、C B L 3、およびh v g-5とも呼ばれる。n c 8 8 6は、P K Rの直接的な阻害剤として機能する。n c 8 8 6は、例えば、配列番号13に記載の配列を有し得る。本明細書では、「p 5 8^{IPK}」は、細胞質タンパク質として発見され、P K Rの阻害剤として機能するタンパク質である。p 5 8^{IPK}は、例えば、ヒトp 5 8^{IPK}であり得、例えば、配列番号9の配列を有し得る。これらの因子は、天然型であり得る。

[0020] 本明細書では、「N S 5 A」は、C型肝炎ウイルス(H C V)が有する非構造タンパク質である。N S 5 Aは、リン酸化タンパク質であり、H C Vのゲノム複製に必須であるとされている。また、N S 5 A (例えば、配列番号15に記載の配列を有する)は、H C Vや脳心筋ウイルスに対する抗ウイルス活性を阻害し得る(M e d i c a l J o u r n a l o f K o b e U n i v e r s i t y , 2 0 0 3 , 6 4 (1 / 2) : 7 - 1 5 参照)。N S 5 Aは、そのC末端側(例えば、149番目のアミノ酸以降)を欠失していてもよい。例えば、N S 5 Aは、その1~148番目のアミノ酸を有するN S 5 A (1~148) (例えば、配列番号16に記載の配列を有する)であり得る。これらの因子は、天然型であり得る。

[0021] ある態様において、V A I RNAは、(i) 配列番号17に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号17に記載の配列において1、

2、3、4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号17に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸であり得、または(i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒトP K RおよびサルP K RなどのP K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。後述する実施例によれば、パッケージング細胞においてP K Rを阻害することによりウイルスの再構成率が向上する。したがって、阻害するP K Rは、好ましくは、パッケージング細胞が由来する動物種である。例えば、V e r o細胞は、アフリカミドリザルに由来し、L C-MK 2細胞は、アカゲザルに由来する。したがって、これらの細胞においては、それぞれアフリカミドリザル、およびアカゲザルのP K Rを阻害することが好ましい。

[0022] ある好ましい態様では、V A I RNAは、その5' 末端に、V A I RNAの5' 側の配列を付加されていてもよい。ある好ましい態様では、V A I RNAは、5' 側の隣接領域を含むように、5' 側に伸びていてもよい。5' 末端に付加される配列としては、配列番号19、20、および23～26の位置1～84の配列、またはV A I RNAと連続して存在するその一部が挙げられる。例えば、V A I RNAは、配列番号34に記載のヌクレオチド配列を有していてもよい。

[0023] ある好ましい態様では、V A I RNAは、その3' 末端に、V A I RNAの3' 側の配列を付加されていてもよい。ある好ましい態様では、V A I RNAは、3' 側の隣接領域を含むように、3' 側に伸びていてもよい。3' 末端に付加される配列としては、配列番号19、20、および23～26の位置265～330の配列、またはV A I RNAと連続して存在するその一部が挙げられる。例えば、V A I RNAは、配列番号35に記載のヌクレオチド配列を有していてもよい。

[0024] ある好ましい態様では、V A I RNAは、その5' 末端に、V A I RNAの5' 側の配列を付加され、かつ、その3' 末端に、V A I RNAの

3'側の配列を付加されていてもよい。ある好ましい態様では、V A I RNAは、5'側の隣接領域および3'側の隣接領域を含むように、それぞれ5'側および3'側に伸びていてもよい。5'末端に付加される配列としては、配列番号19、20、および23～26の位置1～84の配列、またはV A I RNAと連続して存在するその一部が挙げられる。3'末端に付加される配列としては、配列番号19、20、および23～26の位置265～330の配列、またはV A I RNAと連続して存在するその一部が挙げられる。

[0025] ある好ましい態様では、V A I RNAは、配列番号19、20、および23～26の一部であり、かつ配列番号17に記載のヌクレオチド配列を含む配列に対応する配列であって、(i) V A I RNAと、(ii) V A I RNAの5'側の配列および3'側の配列のいずれかまたは両方を含む配列を有していてもよい。例えば、V A I RNAは、配列番号19、20、および23～26の一部であって、配列番号17に記載のヌクレオチド配列を含む配列を有していてもよい。

[0026] ある態様において、E B E Rは、(i) 配列番号4に記載の配列を含む核酸であり得、(ii) 配列番号4に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(iii) 配列番号4に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸であり得、または(iv) これらの断片であり得、かつ、

P K R（例えば、ヒトP K RおよびサルP K RなどのP K R）を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0027] ある態様において、T A Rは、(i) 配列番号5に記載の配列を含む核酸であり得、(ii) 配列番号5に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(iii) 配列番号5に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸であり得、ま

たは (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0028] ある態様では、2 A_{pr}は、(i) 配列番号 6 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 6 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 6 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0029] ある態様では、E 3 L は、(i) 配列番号 7 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 7 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 7 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0030] ある態様では、σ 3 は、(i) 配列番号 8 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 8 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 8 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0031] ある態様では、p 5 8¹PK は、(i) 配列番号 9 に記載の配列を含むペプ

チドであり得、(i i) 配列番号9に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号9に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含むペプチドであり得、または(i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒトP K RおよびサルP K RなどのP K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0032] ある態様では、K 3 Lは、(i) 配列番号10に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号10に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号10に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含むペプチドであり得、または(i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒトP K RおよびサルP K RなどのP K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0033] ある態様では、T a tは、(i) 配列番号11に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号11に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号11に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含むペプチドであり得、または(i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒトP K RおよびサルP K RなどのP K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0034] ある態様では、I C P 3 4, 5は、(i) 配列番号12に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号12に記載の配列において1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号12に記載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列

を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、
PKR (例えば、ヒトPKRおよびサルPKRなどのPKR) を阻害する
機能を有するペプチドであり得る。

[0035] ある態様では、nc886は、(i) 配列番号13に記載の配列を含む
核酸であり得、(ii) 配列番号13に記載の配列において1、2、3、
4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された
配列からなる核酸であり得、もしくは、(iii) 配列番号13に記載の
配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸であり
得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

PKR (例えば、ヒトPKRおよびサルPKRなどのPKR) を阻害する
機能を有する核酸であり得る。

[0036] ある態様では、nc886は、(i) 配列番号14に記載の配列を含む
核酸であり得、(ii) 配列番号14に記載の配列において1、2、3、
4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された
配列からなる核酸であり得、もしくは、(iii) 配列番号14に記載の
配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸であり
得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

PKR (例えば、ヒトPKRおよびサルPKRなどのPKR) を阻害する
機能を有する核酸であり得る。

[0037] ある態様では、VAL RNAは、(i) 配列番号18に記載の配列を
含む核酸であり得、(ii) 配列番号18に記載の配列において1、2、
3、4、もしくは5個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加さ
れた配列からなる核酸であり得、もしくは、(iii) 配列番号18に記
載の配列との同一性が90%以上または95%以上である配列を含む核酸で
あり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

PKR (例えば、ヒトPKRおよびサルPKRなどのPKR) を阻害する
機能を有する核酸であり得る。

[0038] ある態様では、VAL RNAは、(i) 配列番号19に記載の配列を

含む核酸であり得、(i i) 配列番号 19 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 19 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0039] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 20 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 20 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 20 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0040] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 21 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 21 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 21 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0041] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 22 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 22 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 22 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含む核酸で

あり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0042] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 2 3 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 2 3 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 2 3 に記載の配列との同一性が 9 0 % 以上または 9 5 % 以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0043] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 2 4 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 2 4 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 2 4 に記載の配列との同一性が 9 0 % 以上または 9 5 % 以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0044] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 2 5 に記載の配列を含む核酸であり得、(i i) 配列番号 2 5 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 2 5 に記載の配列との同一性が 9 0 % 以上または 9 5 % 以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0045] ある態様では、V A I RNA は、(i) 配列番号 2 6 に記載の配列を

含む核酸であり得、(i i) 配列番号 26 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個の核酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなる核酸であり得、もしくは、(i i i) 配列番号 26 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含む核酸であり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有する核酸であり得る。

[0046] ある態様では、N S 1 は、(i) 配列番号 28 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 28 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 28 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0047] ある態様では、U s 11 は、(i) 配列番号 29 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 29 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 29 に記載の配列との同一性が 90%以上または 95%以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

[0048] ある態様では、E 3 K 3 は、E 3 L の一部 (例えば、E 3 L の C 末端側 107 アミノ酸配列) または全部と K 3 の一部または全部の融合配列であり得、好ましくは、E 3 L の一部 (より好ましくは、E 3 L の C 末端側 107 アミノ酸配列) と K 3 の融合配列であり得、かつ、P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり

得る。ある態様では、E 3 K 3 は、(i) 配列番号 3 0 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 3 0 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 3 0 に記載の配列との同一性が 9 0 % 以上または 9 5 % 以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

- [0049] ある態様では、E 3 Y 3 は、E 3 L の一部 (例えば、E 3 L の C 末端側 1 0 7 アミノ酸配列) または全部と Y 3 の一部または全部の融合配列であり得、好ましくは、E 3 L の一部 (より好ましくは、E 3 L の C 末端側 1 0 7 アミノ酸配列) と Y 3 の融合配列であり得、かつ、P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。ある態様では、E 3 Y 3 は、(i) 配列番号 3 1 に記載の配列を含むペプチドであり得、(i i) 配列番号 3 1 に記載の配列において 1、2、3、4、もしくは 5 個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された配列からなるペプチドであり得、もしくは、(i i i) 配列番号 3 1 に記載の配列との同一性が 9 0 % 以上または 9 5 % 以上である配列を含むペプチドであり得、または (i v) これらの断片であり得、かつ、

P K R (例えば、ヒト P K R およびサル P K R などの P K R) を阻害する機能を有するペプチドであり得る。

- [0050] 本明細書では「パッケージング細胞」とは、ウイルスベクターを産生させる細胞である。一般的には、安全性の向上の観点で、ウイルスベクターのウイルスゲノムは、その増殖、複製、および拡散 (他の細胞への感染を含む) からなる群から選択される 1 以上の機能を担う因子が破壊されており、細胞感染後に増殖したり、複製したり、または拡散することができないようにエンジニアリングされている。しかし、ウイルスベクターを産生させるときには、その増殖、複製、および拡散を可能とするために、パッケージング細胞

に破壊された因子を補いながらウイルスベクターを産生する。このため、パッケージング細胞は、ウイルスベクターを産生させるために、破壊されたウイルスの因子を補完して、ウイルスの産生量が回復するように、破壊されたウイルスの因子の一部を発現する。パッケージング細胞は、そのような因子をゲノム中に安定的に保有していてもよいし、一時的に保有してもよい。いずれの場合でもウイルス産生中には、補完されるウイルス性因子がパッケージング細胞の細胞内に供給される。一例として、例えば、センダイウイルスベクターは、古典的に、F 遺伝子を欠損したゲノムを有するセンダイウイルスを、F 遺伝子を供給するパッケージング細胞を用いて産生させることにより得られる。供給されるF 遺伝子は、トリプシン存在下で活性化するが、細胞内に普遍的に存在する *f u r i n* で活性化するタイプのF 遺伝子 (F 5 R) などとも開発され、ウイルス製造の利便性が高められている (例えば、WO 2005/071085 A 参照)。近年では、cDNA からセンダイウイルスを産生させる技術が開発されている。例えば、弱毒株である Z 株を基本骨格として、ヒトへの医療応用のために安全性をさらに高める工夫がなされたベクターが作製されている。例えば、ウイルスゲノムから F、HN、および M 遺伝子のうちのいずれか 1 以上を欠失させ、ウイルスの伝播性を喪失させる技術が開発されている。例えば、F 遺伝子欠失ウイルスゲノムが好ましく用いられている。ウイルスゲノムは、制御配列 (例えば、T7 プロモーター) に作動可能に連結しており、上記制御配列によってウイルスゲノムの産生を駆動することができる。これにより、cDNA からセンダイウイルスゲノムをパッケージング細胞内で産生させることができる。制御配列 (例えば、第 1、第 2、または第 3 の制御配列) として T7 プロモーターを用いる場合には、T7 RNA ポリメラーゼは、例えば、ワクシニアウイルスなどのヘルパーウイルスにより供給され得る。パッケージング細胞内には、RNA ポリメラーゼ (例えば、*p o l i l l*) による転写を駆動する制御配列に作動可能に連結された N、P、F、および L を発現させ、これによってウイルス粒子成分を供給して、パッケージング細胞内でウイルス粒子を形成させることが

できる。パッケージング細胞としては、例えば、サル腎由来のLLC-MK2細胞が用いられている。これにより、一度は細胞に感染可能であるが、その後は他の細胞に伝播できないウイルス粒子が得られる。ウイルス粒子は必要に応じて濃縮および／または精製してから用いられ得る。ウイルスに外来遺伝子を組込む場合には、RNA依存性RNAポリメラーゼによる転写を可能とするためにウイルス独自の制御配列を必要に応じて導入する。

[0051] 本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを製造する方法が提供される。マイナス鎖RNAウイルスとしては、オルソミクソウイルス科（インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス）、パラミクソウイルス科（モービリウイルス属などのパラミクソウイルス）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルスなどのラブドウイルス）、フィロウイルス科（エボラとマールブルグウイルスなどのフィロウイルス）、およびブニavirus科（ハンタウイルスなどのブニavirus）が挙げられる。マイナス鎖RNAウイルスとしては、好ましくは、パラミクソウイルス科のウイルスであり、好ましくは、パラミクソウイルスであり、好ましくは、センダイウイルスであり得る。

[0052] 本明細書では、「制御配列」は、それに作動可能に連結された遺伝子を駆動し、当該遺伝子からRNAを転写する活性を有する配列をいう。制御配列は、例えば、プロモーターである。プロモーターは、例えば、クラスⅠプロモーター（rRNA前駆体の転写に用いられ得る）、クラスⅡプロモーター（コアプロモーターと上流プロモーターエレメントから構成され、mRNAの転写に用いられ得る）、およびクラスⅢプロモーター（Ⅰ型、Ⅱ型、およびⅢ型にさらに大別される）が挙げられる。

[0053] マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ある態様では、そのゲノム上では、マイナス鎖RNAウイルスの細胞への増殖または感染に関する因子が破壊（例えば、欠失）されており、パッケージング細胞以外の細胞内では増殖または感染能力が低下しているか、実質的な感染能力を有しない。上述の通り、そのようなベクターは、パッケージング細胞に破壊された増殖または感染

に関する因子を供給した条件下で作製することで、細胞への最初の感染力を付与される。これにより、パッケージング細胞から得られたベクターは感染力を有するが、その後、パッケージング細胞以外の細胞に感染したベクターは、それ以上の感染性の粒子を生み出すことができず、これによりベクターの安全性が向上させられている。

[0054] ある態様では、本発明の方法は、

(A) 第1の制御配列に作動可能に連結したプロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子をコードする遺伝子から当該因子を発現させてパッケージング細胞に供給することを含む。

[0055] 第1の制御配列は、RNA、例えばmRNAの転写をすることができるプロモーターであり得、例えば、 $\rho o l$ III系プロモーターを各種使用することができる。 $\rho o l$ III系プロモーターとしては、特に制限されないが、例えばCMVプロモーター、EF1プロモーター (EF1 α プロモーター)、SV40プロモーター、MSCVプロモーター、hTERTプロモーター、 β アクチンプロモーター、CAGプロモーター、およびCBhプロモーター等が挙げられる。RNAの転写をすることができるプロモーターとしてはまた、T7プロモーター、T3プロモーター、およびSP6プロモーターなどのバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼを駆動するプロモーター、並びにU6プロモーターなどの $\rho o l$ III系プロモーターを用いることもでき、環状DNAに対しては好ましくはT7プロモーターであり得、直鎖状DNAに対しては好ましくはSP6プロモーターであり得る。プロモーターはまた、誘導性プロモーターでもよい。これらのプロモーターは、RNA性の因子の転写に好ましく用いられ得る。誘導性プロモーターは、プロモーターを駆動する誘導因子の存在下でのみ、当該プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターである。誘導性プロモーターとしては、ヒートショックプロモーターなどの加熱により遺伝子発現を誘導するプロモーターが挙げられる。また、誘導性プロモーターには、プロモーターを駆動する誘導因子が薬剤であるプロモータ

ーが挙げられる。このような薬剤誘導性プロモーターとしては、例えば、Cumateオペレーター配列、λオペレーター配列（例えば、 $12 \times \lambda Op$ ）、テトラサイクリン系誘導性プロモーター等が挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリンもしくはその誘導体（例えば、ドキシサイクリン）、またはリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）の存在下で遺伝子発現を駆動するプロモーターが挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、TRE3Gプロモーターが挙げられる。

[0056] ある種のウイルスは、PKRに対抗するためにPKR阻害性のウイルス性因子を備えている。本発明では、PKR阻害性のウイルス性因子として、このようなウイルスが天然に保有するPKR阻害性のウイルス性因子を用いることができる。したがって、ウイルスゲノムとPKR阻害性のウイルス性因子の由来する種は、同種であってもよいが、好ましくは異種である。

[0057] プロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子としては、例えば、PKRに結合するデコイRNAが挙げられる。デコイRNAとしては、例えば、VAI RNA、EBER、nc886、およびTAR、並びにこれらのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、デコイRNAは、VAI RNAおよびそのオーソログであり得、特にアデノウイルス由来であり得る。ある好ましい態様では、デコイRNAは、EBERおよびそのオーソログであり得、特にエプスタインバー（EB）ウイルス由来であり得る。ある好ましい態様では、デコイRNAは、nc886およびそのオーソログであり得、特にヒト由来であり得る。ある好ましい態様では、デコイRNAは、TARおよびそのオーソログであり得、特にヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来であり得る。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。

[0058] VAIとしては、配列番号17に記載の配列を有するものを用いることができる。VAIは、アデノウイルスゲノム上のその前後配列をさらに含んでもよい。したがって、PKR阻害性のウイルス性因子は、配列番号19に記載の配列を有するものであってもよい。VAIは、VAIIをさらに含

んでいてもよい。例えば、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 2 1 に記載の配列を有するものであってもよい。V A I は、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の変異を有していてもよい。例えば、P K R 阻害性のウイルス性因子としては、配列番号 1 7 に記載の配列における 7 4 番目の塩基に対応する V A I の塩基において置換を有する配列を有し得る。配列番号 1 7 に記載の配列における 7 4 番目の塩基の置換は、G、A および C のいずれへの置換であってもよいが、好ましくは C への置換である。好ましい態様では、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 1 8 または 2 0 に記載の配列を有し得る。ある好ましい態様では、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 2 2 または 2 3 に記載の配列を有し得る。

また例えば、P K R 阻害性のウイルス性因子としては、配列番号 1 9 に記載の配列における 1 9 1 番目の塩基に対応する V A I の塩基において置換を有する配列を有し得る。好ましい態様では、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 2 4 に記載の配列を有し得る。

またある好ましい態様では、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 2 5 に記載の配列を有し得る。またある好ましい態様では、P K R 阻害性のウイルス性因子は、配列番号 2 6 に記載の配列を有し得る。

[0059] n c 8 8 6 は、ある態様では、配列番号 1 3 の配列を有し得る。n c 8 8 6 は、V A I の前後配列をさらに含んでいてもよい。n c 8 8 6 は、V A I の前後配列をさらに有し、配列番号 1 4 に記載の配列を有していてもよい。

[0060] プロテインキナーゼ R (P K R) 阻害性の因子としてはまた、P K R の分解を誘導する分子が挙げられる。P K R の分解を誘導する分子としては、例えば、2 A_pr_o およびそのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、P K R の分解を誘導する分子は、2 A_pr_o およびそのオーソログであり得、特にポリオウイルス由来であり得る。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。

[0061] プロテインキナーゼ R (P K R) 阻害性の因子としてはまた、ウイルスの二本鎖 R N A をマスキングする因子が挙げられる。ウイルスの二本鎖 R N A

をマスキングする因子は、ウイルスの二本鎖RNAをマスキングしてPKRの活性化を防ぐことができる。ウイルスの二本鎖RNAをマスキングする因子としては、例えば、E3L、 $\sigma 3$ 、Us11およびNS1並びにこれらのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、ウイルスの二本鎖RNAをマスキングする因子は、E3Lおよびそのオーソログであり得、特にワクシニアウイルス由来である。ある好ましい態様では、 $\sigma 3$ およびそのオーソログであり得、特にレオウイルス由来である。ある好ましい態様では、Us11およびそのオーソログであり得、特に単純ヘルペスウイルス（HSV）由来である。ある好ましい態様では、ウイルスの二本鎖RNAをマスキングする因子は、NS1およびそのオーソログであり得、特にインフルエンザウイルス由来である。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。

[0062] プロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子としてはまた、PKRの二量体化を阻害する因子が挙げられる。PKRの二量体化を阻害する因子としては、例えば、p58^{PK}およびNS5A並びにこれらのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、PKRの二量体化を阻害する因子は、p58^{PK}およびそのオーソログであり得、特にヒト由来である。ある好ましい態様では、PKRの二量体化を阻害する因子は、NS5Aおよびそのオーソログであり得、特にC型肝炎ウイルス（HCV）由来である。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。NS5Aは、そのC末端側（例えば、149番目のアミノ酸以降）を欠失していてもよい。例えば、NS5Aは、その1～148番目のアミノ酸を有するNS5A（1～148）であり得る。

[0063] プロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子としてはまた、PKRの偽基質が挙げられる。偽基質としては、例えば、K3LおよびTat並びにこれらのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、偽基質は、K3Lおよびそのオーソログであり得、特にワクシニアウイルス由来である。ある好ましい対象では、偽基質は、Tatおよびそのオーソログであり、特にH

I V由来である。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。

[0064] プロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子としてはまた、基質の脱リン酸化を誘導する分子が挙げられる。基質の脱リン酸化を誘導する分子としては、例えば、ICP34.5およびそのオーソログが挙げられる。ある好ましい態様では、基質の脱リン酸化を誘導する分子は、ICP34.5およびそのオーソログは単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来である。本発明ではこれらの因子を好ましく用いることができる。

[0065] ある態様では、プロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子は、アデノウイルスのVA1 RNA、EBウイルスのEBER、ヒトnc886、HIVウイルスのTAR、ポリオウイルスの2A^{pro}、ワクシニアウイルスのE3L、レオウイルスのδ3、インフルエンザウイルスのNS1、ヒトp58^{IPK}、C型肝炎ウイルスのNS5A、ワクシニアウイルスのK3L、HIVウイルスのTat、単純ヘルペスウイルスのUs11、および単純ヘルペスウイルスのICP34.5、並びにこれらのオーソログからなる群から選択される1以上である。

[0066] プロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子は、ある態様では、パッケージング細胞のゲノム中に安定的に組込まれていてもよい。発現は、第1の制御配列により駆動され得る。第1の制御配列は、恒常的なプロモーターでもよいし、誘導性プロモーターでもよい。

[0067] プロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子は、ある態様では、パッケージング細胞に一過性に導入されてもよい。例えば、プロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子は、プラスミドDNAに搭載され得る。プラスミドDNAは、当業者に周知の技術を用いて細胞内に導入することができ、これによりプラスミドDNAから細胞内でプロテインキナーゼR (PKR) 阻害性の因子を発現させることができる。発現は、第1の制御配列により駆動され得る。第1の制御配列は、恒常的なプロモーターでもよいし、誘導性プロモーターでもよい。

[0068] ある態様では、パッケージング細胞は、例えば、Vero細胞またはLL

C-MK 2細胞であり得る。ある態様では、パッケージング細胞は、V e r o細胞からなる細胞集団またはL L C-MK 2細胞からなる細胞集団であり得る。ある態様では、ウイルスの産生にパッケージング細胞以外の細胞を用いない。ある態様では、パッケージング細胞は、F遺伝子を発現する。ある好ましい態様では、パッケージング細胞は、F遺伝子を恒常的に発現する。ある好ましい態様では、Fタンパク質は、トリプシンで活性化させ得る。ある好ましい態様では、Fタンパク質は、F5Rであり得る。ある好ましい態様では、V e r o細胞またはL L C-MK 2細胞を含む、S e Vの再構成用の組成物が提供される。再構成とは、パッケージング細胞にウイルスまたはウイルスベクターの構成要素を供給して、ウイルスまたはウイルスベクターを形成させることをいう。S e Vの再構成は、本明細書に記載の通りに行うことができる。

[0069] 本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを製造する方法であって、

(B) パッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNAを発現させ、前記因子の存在下でマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを形成させることと {例えば、PKR阻害性の因子、例えば、PKR阻害性のウイルス性因子の存在下でパッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターのゲノムRNAを発現させ、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを形成させること}

を含む方法が提供される。

[0070] マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターのゲノムRNAは、例えば、第2の制御配列に作動可能に連結された当該ゲノムRNAをコードするDNAを有する遺伝子発現ベクターから発現され得る。遺伝子発現ベクターは、例えば、少なくとも一過的に前記ゲノムRNAを細胞内で発現させるベクターであれば用いることができるが、例えば、好ましい一例では、プラスミドベクターであり得る。前記ゲノムRNAは、ベクタ

一の細胞毒性を最小化するためにPタンパク質に5 1 1 F、Mタンパク質に6 9 E、1 1 6 A、及び1 8 3 S、HNタンパク質に2 6 2 T、2 6 4 R、及び4 6 1 E、並びに、Lタンパク質に1 1 9 7 S、及び1 7 9 6 Eの変異を有していてもよい（例えば、WO 2 0 0 3 / 0 2 5 5 7 0 参照）。当該ゲノムRNAが細胞内で産生されると、パッケージ細胞に供給された他のウイルス粒子の構成要素（例えば、F、N、P、L）と複合化してウイルスまたはウイルスベクター（ウイルス粒子）が形成される。この際に、プロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子、NS5A、もしくはnc886、またはこれらの等価物が細胞内に存在すると、ウイルス粒子の産生量が増大する。パッケージ細胞は、培養に適した条件下で培養することができる。ウイルスゲノムをコードする遺伝子は、T7プロモーターにより駆動することができる。この場合、パッケージ細胞には、T7ポリメラーゼを供給することができる。ウイルスゲノムをコードする遺伝子は、CAGプロモーターまたはEF1プロモーターにより駆動してもよい。

[0071] ある態様では、パッケージ細胞には、SeVの構成要素（例えば、N、P、およびL、並びにこれらの等価物）をさらに供給して、パッケージ細胞におけるSeVの形成を促進させることができる。SeVの構成要素は、例えば、プラスミドベクターをパッケージ細胞に導入することにより供給することができる。

[0072] ある態様では、ウイルス粒子の構成要素（例えば、N、P、L）をコードする遺伝子は、それぞれ第3の制御配列に作動可能に連結されている。ある態様では、それぞれ第3の制御配列に作動可能に連結されているウイルス粒子の構成要素（例えば、F、N、P、L）をコードする遺伝子は、プラスミド上に組込まれている。ある態様では、第3の制御配列は、CAGプロモーター（例えば、配列番号2に記載の配列を有する）であり得る。ある態様では、第3の制御配列の少なくとも1つまたはすべては、非CAGプロモーターであり得、例えば、EF1 α プロモーター（例えば、配列番号1に記載の配列を有する）であり得る。ある好ましい態様では、ウイルス粒子の構成要

素（例えば、N、P、L）をコードする遺伝子は、1つまたは複数の遺伝子発現ベクター（好ましくはプラスミド）に搭載されている。この場合、これらの構成要素は、1つの制御配列に、または複数の制御配列に作動可能に連結されていてよい。制御配列は、例えば、CAGまたはEF1プロモーターであり得る。

[0073] 本発明のある態様では、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを製造する方法は、

（C）形成されたマイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを回収すること
をさらに含む。

[0074] 細胞内で形成されたウイルス粒子は、適宜回収することができる。細胞内で形成されたウイルス粒子は、細胞外に放出され得る。したがって、ウイルス粒子は、培養液中から回収することができる。回収されたウイルス粒子は、適宜、精製および／または濃縮することができる。このようにして、単離されたウイルスベクター、精製されたウイルスベクター、または濃縮されたウイルスベクターが提供される。得られたウイルスベクターは、適宜保存され得る。保存は、例えば、ディープフリーザー内（例えば、約 -80°C ）、フリーザー内（例えば、約 -20°C ）、または冷蔵庫内（約 4°C ）で行うことができる。保存は、液体窒素内で行うこともできる。ウイルスベクターは、必要に応じてタイター測定（力価測定）に供される。ウイルスのタイターは、当業者に周知の方法で決定することができる。

[0075] ある態様では、本発明に方法により得られるマイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターの感染力価は、 1×10^5 CIU/mL以上、 2×10^5 CIU/mL以上、 3×10^5 CIU/mL以上、 4×10^5 CIU/mL以上、 5×10^5 CIU/mL以上、 6×10^5 CIU/mL以上、 7×10^5 CIU/mL以上、 8×10^5 CIU/mL以上、 9×10^5 CIU/mL以上、 1×10^6 CIU/mL以上、 2×10^6 CIU/mL以上、 3×10^6 CIU/mL以上、 4×10^6 C

IU/mL以上、 5×10^6 CIU/mL以上、 6×10^6 CIU/mL以上、 7×10^6 CIU/mL以上、 8×10^6 CIU/mL以上、 9×10^6 CIU/mL以上、 1×10^7 CIU/mL以上、 2×10^7 CIU/mL以上、 3×10^7 CIU/mL以上、 4×10^7 CIU/mL以上、または 5×10^7 CIU/mL以上であり得る。

[0076] 本発明のある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターが由来する種と、PKR阻害性の因子が由来する種との関係は、異種であり得る。この態様では、第1の制御配列とPKR阻害性の因子が由来する種との関係は、同種であり得る。

[0077] 本発明のある態様では、第1の制御配列とPKR阻害性の因子が由来する種との関係は、異種であり得る。この態様では、ウイルスまたはウイルスベクターが由来する種と、PKR阻害性の因子が由来する種との関係は、同種であり得る。

[0078] 本発明のある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターが由来する種と、PKR阻害性の因子が由来する種との関係は、異種であり、かつ、第1の制御配列とPKR阻害性の因子が由来する種との関係は、異種であり得る。

[0079] 本発明のある態様では、PKR阻害性の因子をコードする遺伝子は、パッケージング細胞のゲノム中に組み込まれている。本発明のある態様では、PKR阻害性の因子をコードする遺伝子は、パッケージング細胞に導入するベクター（例えば、プラスミドDNA）に組み込まれている。組み込まれる位置は、SeVゲノム上のN遺伝子の前、N遺伝子とP遺伝子の間、P遺伝子とM遺伝子の間、M遺伝子とHN遺伝子の間、HN遺伝子とL遺伝子の間、またはL遺伝子の後ろであり得る。組み込まれる位置は、当該因子が、RNAである場合、目的タンパク質をコードする遺伝子の3' UTR中であってもよい。一般にN遺伝子はNP遺伝子と表記されることもある。

[0080] 本発明のある好ましい態様では、PKR阻害性の因子をコードする遺伝子は、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターのRNAゲノム中に組み込まれている。この態様においては、PKR阻害性の因

子をコードする遺伝子は、パッケージング細胞のゲノム中またはパッケージング細胞に導入するベクター（例えば、プラスミドDNA）にさらに組込まれていてもよい。したがって、ある好ましい態様では、PKR阻害性の因子をコードする遺伝子は、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターのRNAゲノム中に組込まれ、かつ、パッケージング細胞のゲノム中またはパッケージング細胞に導入するベクター（例えば、プラスミドDNA）にさらに組込まれている。このようにすることによって、ゲノム数が少ない間もパッケージング細胞からPKR阻害性の因子が供給され、ゲノムが増加したときにはゲノムからもPKR阻害性の因子が供給されて、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターは良好に増加し得る。また、得られたマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを別の細胞（非パッケージング細胞）に感染させた後も、ウイルスゲノムからPKR阻害性の因子が供給されて、ウイルスまたはウイルスベクターが良好に細胞内で増殖し得る。これにより、例えば、ウイルスまたはウイルスベクターに搭載された目的遺伝子の発現量が高まる効果を得ることができる。

[0081] 本発明のある態様では、ヘルパーウイルス非存在下でウイルス粒子を産生する。

[0082] 本発明のある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターが、パラミクソウイルスまたはパラミクソウイルスベクターであり、RNAゲノムがF遺伝子欠損RNAゲノムである。この態様では、第1の制御配列は、CAGプロモーターまたはEF1プロモーター、例えば、EF1プロモーターであり得る。この態様ではまた、第2の制御配列は、T7プロモーターであり、T7RNAポリメラーゼは、細胞ゲノムまたはプラスミド上から転写および翻訳により産生させ得る。ある好ましい対象では、パラミクソウイルスは、センダイウイルスである。また、ある好ましい態様では、パラミクソウイルスベクターは、センダイウイルスベクターである。

[0083] ある態様では、パラミクソウイルスまたはパラミクソウイルスベクターは

、N、P、およびLタンパク質を発現することができる。ある態様では、パラミクソウイルスまたはパラミクソウイルスベクターは、F、HN、およびMタンパク質からなる群から選択される1つ、2つ、または3つを発現しない。例えば、RNAゲノムは、F、HN、およびMタンパク質からなる群から選択される1つ、2つ、または3つのタンパク質をコードするRNAを欠失している。ある好ましい態様では、パラミクソウイルスまたはパラミクソウイルスベクターは、Fタンパク質を発現しない。

[0084] ある態様では、パラミクソウイルスまたはパラミクソウイルスベクターは、Vタンパク質および／またはCタンパク質を発現可能に含むRNAゲノムを有する。

[0085] 本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターのRNAゲノムおよび当該RNAゲノムをコードするDNAが提供される。RNAゲノムは、ある態様では、PKR阻害性の因子（例えば、PKR阻害性のウイルス性因子）のいずれか1以上をコードする遺伝子を発現可能に含む。本発明によればまた、上記のRNAゲノムを含むマイナス鎖RNAウイルスベクターが提供される。マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターは、RNAゲノムを内包するウイルス粒子をさらに有する。このようなウイルスまたはウイルスベクターは、細胞感染後により強い増殖力を奏し得る。ある好ましい態様では、マイナス鎖RNAウイルスは、パラミクソウイルスであり、より好ましくは、センダイウイルスであり得る。また、ある好ましい態様では、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、パラミクソウイルスベクターであり、より好ましくは、センダイウイルスベクターであり得る。ある態様では、当該RNAゲノムをコードするDNAは、第2の制御配列に作動可能に連結されている。ある態様では、第2の制御配列に作動可能に連結された当該RNAゲノムをコードするDNAを含む、遺伝子発現ベクターが提供される。

[0086] ある好ましい態様では、RNAゲノム（特にSeVゲノム）をコードするDNAを含む、当該ゲノムの遺伝子発現ベクターは、当該RNAゲノムの上

流および下流のいずれかまたは両方に隣接して自己切断リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイムまたはHDVリボザイム）の配列を含んでもよい。また、前記遺伝子発現ベクターは、前記自己切断リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイムまたはHDVリボザイム）の配列を介して、他の因子の配列（例えば、PKR阻害性の因子やRNAの増幅を促進する因子）を連結させ、これにより、RNAゲノムと前記他の因子の配列とが一連のRNAに転写させてもよい。このように構成することにより、RNAゲノムが転写された後に、自己切断リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイムまたはHDVリボザイム）の配列においてRNAが開裂して、前記他の因子を除去することができ、RNAゲノムから実質的になるRNAが得られる。他の因子の配列として例えば、PKR阻害性の因子やRNAの増幅を促進する因子を連結させておくことで、その作用を発揮させてゲノムの増幅させた上で、当該他の因子を完成したゲノムから除去することができる。例えば、上記他の因子がRNAゲノムの5'側に配置され、上記他の因子とRNAゲノムをコードする領域の間にはハンマーヘッドリボザイムの配列を配置することができ、または、上記他の因子がRNAゲノムの3'側に配置され、RNAゲノムをコードする領域と上記他の因子の間にはHDVリボザイムの配列を配置することができる。より具体的には、RNAゲノムをコードするDNAを含む、その遺伝子発現ベクターは、例えば、プロモーター（例えば、T7プロモーター、CAGプロモーター、およびEF1プロモーターなど）、第一の自己切断リボザイム（例えば、3'自己切断型リボザイム、好ましくは、ハンマーヘッドリボザイム）の配列、RNAゲノムをコードするDNAを、第二の自己切断リボザイム（例えば、5'自己切断型リボザイム、好ましくは、HDVリボザイム）の配列、および他の因子の配列をこの順に含むように構成されていてもよい。また、別の好ましい態様として、プロモーター（例えば、T7プロモーター、CAGプロモーター、およびEF1プロモーターなど）、他の因子の配列、第一の自己切断リボザイム（例えば、3'自己切断型リボザイム、好ましくは、ハンマーヘッドリボザイム）の

配列、RNAゲノムをコードするDNAを、第二の自己切断リボザイム（例えば、5' 自己切断型リボザイム、好ましくは、HDVリボザイム）の配列をこの順に含むように構成されていてもよい。上記において自己切断型リボザイムは一例として示したに過ぎず、好ましい実施形態はこれに限られない。特に、自己切断型リボザイムを用いる場合には、RNAゲノムの塩基数が $6n$ {ここで、 n は自然数} となるように自己切断型リボザイムを配置することができる。遺伝子発現ベクターは、例えば、他の因子の配列の下流にターミネーター配列（例えば、T7ポリメラーゼに対してはT7ターミネーター配列）をさらに含んでいてもよい。自己切断リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイム）の配列としては、様々なものが知られている。自己切断リボザイムとしては、特に限定されないが例えば、ハンマーヘッド型リボザイム、デルタ型肝炎ウイルス（HDV）リボザイム、ツイスター型リボザイム、ツイスター・シスター型リボザイム、ピストル型リボザイム、ヘアピン型リボザイム、およびハチエット型リボザイムが挙げられる。これらの自己切断型リボザイムは、例えば、5' 自己切断リボザイム、および／または、3' 自己切断リボザイムであり得る。中でも、3' 自己切断リボザイムとして、Hh-Rbzの配列（例えば、配列番号36）、および5' 自己切断リボザイムとしてデルタ型肝炎ウイルスのリボザイム（HDV-Rbz）の配列（例えば、配列番号37）などを用いることができる。

[0087] ある好ましい態様では、RNAウイルスの構成因子を発現する遺伝子発現ベクターは、PKR阻害性の因子やRNAの増幅を促進する因子をさらに搭載していてもよい。前記遺伝子発現ベクターは、前記構成因子に、前記自己切断リボザイム（例えば、上記の通りであり、例えば、ハンマーヘッドリボザイムまたはHDVリボザイムであり得る）の配列を介して、他の因子の配列（例えば、PKR阻害性の因子やRNAの増幅を促進する因子）を連結させ、これにより、RNAゲノムと前記他の因子の配列とが一連のRNAに転写させてもよい。あるいは、ある好ましい態様では、PKR阻害性の因子やRNAの増幅を促進する因子は、独立してプラスミドに搭載されていてもよ

い。

[0088] 本発明によれば、上記ウイルスのRNAゲノムをコードするDNAを含む、当該ゲノムの遺伝子発現ベクターと、上記ウイルスの構成因子をコードするDNAを含む、上記ウイルスの再構成用ベクターとの組合せが提供される。当該組合せは、細胞に共発現させることにより、当該細胞において上記ウイルスの粒子を再構成することに用いることができる。ある態様では、ウイルス粒子を再構成することに用いるための組合せが提供され、組合せは、上記ウイルスのRNAゲノムをコードするDNAと、上記ウイルスの構成因子をコードするDNAを含み、これらのDNAは、ウイルス粒子を構成するに十分な因子をコードするDNAを含み、1以上の遺伝子発現ベクターに搭載されている。RNAゲノム、および上記ウイルスの構成因子をコードするDNAは、制御配列に作動可能に連結されている。制御配列は、プロモーターであり得、プロモーターとしては、特に限定されないが例えば、T7プロモーター、CAGプロモーター、およびEF1プロモーターが挙げられる。

[0089] センダイウイルスまたはセンダイウイルスベクターは、そのRNAゲノム中に、目的遺伝子をさらに有し得る。目的遺伝子は、細胞に導入したい遺伝子であり得る。目的遺伝子は、導入された細胞内で発現し、RNAまたはタンパク質を産生させ得る。目的遺伝子は、RNAゲノム中に発現可能に搭載されている。目的遺伝子は、外来遺伝子であり得る。外来遺伝子とは、導入される細胞に対して内在性の遺伝子と区別される意味で用いられる用語である。

実施例

[0090] マイナス鎖RNAウイルスベクターの調製

マイナス鎖RNAウイルスベクターをウイルスのパッケージング細胞で発現させた。特に発現の際のPKR阻害因子の有効性を評価した。

[0091] マイナス鎖RNAウイルスベクターとしては、センダイウイルス（SeV）を用いた。センダイウイルスは、F遺伝子発現細胞にプラスミド混合物を導入し、3日後の培養上清から回収した。プラスミド混合物は、T7プロモ

ーターに作動可能に連結されたセンダイウイルスゲノムを搭載した pSeV-EmGFP を含んだ。センダイウイルスゲノムには、ゲノムの増殖を蛍光により検出できるように、EmGFP をコードする遺伝子を搭載した。センダイウイルスゲノムは、F 遺伝子の欠失を有するものとした。

[0092] (1) F 遺伝子発現細胞は以下のように作製した。

pCAGGS-neo に SeV の F 遺伝子 (コザック配列付加、ヒトコドンに最適化) を搭載し、pCAGGS-F-neo を構築した。得られたプラスミドを Ver o 細胞、あるいは LLC-MK2 細胞に ViaFect (プロメガ社) を用いてトランスフェクションし、1~2 mg/mL の G418 二硫酸塩溶液 (ナカライテスク) を用いて選択し、F 遺伝子発現細胞を得た。得られた細胞は Ver o-F、及び LLC-MK2-F と表記する。

[0093] (2) F 遺伝子欠失型 SeV は、以下のように作製した。

ACCESSION: AB855655 の SeV-Z 株の配列情報と、J. General Virology (1997), 78, 2813-2820. の pSeV の情報を基に、T7 プロモーターで F 遺伝子欠失型 SeV ゲノムが転写される pSeV/dF を構築した。SeV-Z 株の細胞傷害性を最小化するために、pSeV/dF に次のアミノ酸変異を加えた: Pタンパク質: 511F、Mタンパク質: 69E、116A、及び183S、HNタンパク質: 262T、264R、及び461E、並びに、Lタンパク質: 1197S、及び1796E (例えば、WO2003/025570 参照)。得られたプラスミドを pSeV/TSdF とした。SeV の再構成を評価するために目的遺伝子 (GOI) として GFP の変異体である EmGFP を用いた。GOI の搭載位置は N 遺伝子の前 (以下「+」と表される)、P 遺伝子と M 遺伝子の間 (以下「PM」と表される)、M 遺伝子と HN 遺伝子の間 (以下「MHN」と表される)、HN 遺伝子と L 遺伝子の間 (以下「HNL」と表される) の順で遺伝子発現量が減少する。EmGFP 遺伝子の搭載位置は SeV の N 遺伝子の前とし、pSeV+EmGFP/TSdF を主に用いた。

[0094] (3) SeV再構成用のプラスミドは以下のように作製した。

WO2005/071092を参考にpCAGGS-NP、pCAGGS-P4C(-)、pCAGGS-L、pCAGGS-F5R、pCAGGS-T7を構築し、この組み合わせを「CAG」と表記する。また、コザック配列の付加とヒトコドンへの最適化を行い、上記とは異なるプロモーターを備える再構成用プラスミドセット：pCAGGS-NPco、pCAGGS-P4C(-)co、pCAGGS-Lco、pCAGGS-F5Rco、pCAGGS-T7co、pEF1-NPco、pEF1-P4C(-)co、pEF1-Lco、pEF1-F5Rco、及びpEF1-T7coを構築した。さらに、T7にはP2001-54387Aを参考に430P、849I、880Y変異を導入し、P2003-61683Aを参考に644Y、667Y変異を導入し、得られたT7m配列を搭載するpCAGGS-T7mco、pEF1-T7mcoを構築した。pEF1-NPco、pEF1-P4C(-)co、pEF1-Lco、pCAGGS-F5Rco、pCAGGS-T7mcoの組み合わせを「EFnpL」と表記する。pEF1-NPco、pCAGGS-P4C(-)co、pCAGGS-Lco、pCAGGS-F5Rco、pCAGGS-T7mcoの組み合わせをEFnCAGpLと表記。pCAGGS-NPco、pCAGGS-P4C(-)co、pEF1-Lco、pCAGGS-F5Rco、pCAGGS-T7mcoの組み合わせをCAGnpEFLと表記する。

[0095] (4) PKR阻害因子を有するプラスミドは以下の通り作製した。

ノンコーディングRNA評価用配列はT7プロモーターとT7ターミネーターを有するpT7プラスミドに搭載し、pT7-VAl(180bp; 配列番号17)、pT7-VAl74a(180bp; 配列番号18でV=A)、pT7-VAl74c(180bp; 配列番号18でV=C)、pT7-VAl74a(330bp; 配列番号26でM=A)、pT7-VAl-VAl(478bp; 配列番号21)、pT7-nc886(108bp; 配列番号13)、pT7-nc886(272bp; 配列番号14)を構

築した。V A I の A p i c a l S t e m (図 1) にある B a m H I 認識配列の破壊のため、V A I の 7 4 塩基目に塩基置換 (T 7 4 A、T 7 4 C) を有する配列を構築した。同様に V A I の 3' 側にある N h e I 認識配列の破壊のため、1 9 1 塩基目に塩基置換 (G 1 9 1 C) を有する配列を構築した (配列番号 2 6 で M = A)。これらの塩基置換は、R N A の二次構造に影響を与えず、V A I の機能への影響はないと考えて設計したものである。別の P K R 阻害因子として n c 8 8 6 (1 0 8 b p) を搭載した p T 7 プラスミドを構築した。その配列を延長するために V A I の前後配列をそれぞれ前後にさらに有する n c 8 8 6 (2 7 2 b p) を構築した (配列番号 1 3, 1 4)。コントロール用プラスミドとして T 7 プロモーター下に I R E S 配列を有する p T 7 - I R E S を構築した。

[0096] (5) P K R 阻害因子を有するプラスミドは以下の通り作製した。

翻訳される配列には基本的にコザック配列の付加とヒトコドンへの最適化を行った。p C A G G S - E 3 L、p C A G G S - K 3 L、p C A G G S - Y 3、p C A G G S - E 3 K 3、p C A G G S - E 3 Y 3、p C A G G S - N S 1、p C A G G S - σ 3、p C A G G S - U s 1 1 を構築した。E 3 L (配列番号 7) および K 3 L (配列番号 1 0) はワクシニアウイルスの配列、Y 3 (配列番号 2 7) は S e V の C タンパク質の C 末端側 1 0 6 アミノ酸配列、N S 1 (配列番号 2 8) はインフルエンザウイルスの配列、 σ 3 (配列番号 8) はレオウイルスの配列、U s 1 1 (配列番号 2 9) は H S V - 1 の配列、E 3 K 3 (配列番号 3 0) は E 3 L の C 末端側 1 0 7 アミノ酸配列と K 3 L の融合配列、E 3 Y 3 (配列番号 3 1) は E 3 L の C 末端側 1 0 7 アミノ酸配列と Y 3 の融合配列であった。

[0097] (6) P K R 阻害因子の存在下、または非存在下における S e V の再構成

S e V の再構成用プラスミドとトランスフェクション試薬比率は W O 2 0 0 5 / 0 7 1 0 9 2 に従った。具体的には、以下の重量のプラスミドとトランスフェクション試薬 (T r a n s i T - L T 1 R e a g e n t または V i a F e c t) を混合してプラスミドミックスを得た。

[0098] P K R 阻害因子を含まない条件：

N P、P 4 C (-)、F 5 R、T 7：各 0. 5 μ g

L：2 μ g

p S e V：5 μ g

プラスミドの合計：9 μ g

T r a n s I T - L T 1 R e a g e n t または V i a F e c t：1 5 μ L

[0099] P K R 阻害因子を含む条件：

N P、P 4 C (-)、F 5 R、T 7：各 0. 5 μ g

L：2 μ g

p S e V：5 μ g

P K R 阻害因子を有するプラスミド：1 μ g

プラスミドの合計：1 0 μ g

T r a n s I T - L T 1 R e a g e n t または V i a F e c t：1 6 . 5 μ L

[0100] 以下、断りのない限り、プラスミドの重量とトランスフェクション試薬の容積は、9：1 5 となるように混合した。

[0101] 2 2 5 μ L の O p t i M E M にプラスミドとトランスフェクション試薬を混和し、5 0 0 μ L の培地（1 0 % F B S / E - M E M）で培養中の 1 2 ウェルプレートの F 遺伝子発現細胞にトランスフェクションし、3 7 °C で培養した。トランスフェクション翌日から 3 2 °C で培養した。培地交換は、2 . 5 μ g / m L トリプシンを添加した無血清培地（I T S - X / N E A A / E - M E M）で毎日行った。S e V 再構成が成功している指標として、トランスフェクション翌日から E m G F P 陽性の細胞が観察され（E m G F P の陽性細胞数増加は S e V の再構成効率向上を示している）、トランスフェクション 3 日目に蛍光顕微鏡システム E C L I P S E T i 2 - E（ニコン）を用いてマイクロプレートの蛍光強度を測定した。トランスフェクション 3 日目の培養上清を回収し、1 0 倍～1 0 万倍希釈を行い、9 6 ウェルプレート

に播種したV e r o細胞に感染させ、感染3日後のG F P陽性細胞数をE C L I P S E T i 2 - Eを用いて計測し、感染力価を算出した。

[0102] (7) V A I存在下におけるS e Vの再構成

S e Vの再構成用細胞としてはL L C - M K 2 - Fのみを含む細胞集団を用いた。S e V再構成用のプラスミドはC A G n p E F Lを用いた。p S e Vはp S e V + E m G F P / T S d Fを用いた。P K R阻害因子としてV A Iを用いた。V A Iは野生型 (w t) の配列としてp T 7 - V A I (180 b p)、p T 7 - V A I - V A I I (478 b p)を用い、塩基置換配列としてp T 7 - V A I 74 a (180 b p)、p T 7 - V A I 74 c (180 b p)、p T 7 - V A I 74 a (330 b p)を用いた。V A Iのコントロール (C t r l) プラスミドとしてp T 7 - I R E Sを用いた。V A Iを併用した細胞ではコントロールとは異なり、トランスフェクションの翌日からE m G F Pの蛍光陽性細胞が観察された。3日目の細胞からのE m G F P由来の蛍光強度を比較すると、V A I (180 b p) w t存在下でコントロールの18倍、V A I (180 b p) 74 a存在下でコントロールの34倍、V A I (180 b p) 74 c存在下でコントロールの53倍、V A I - V A I I存在下でコントロールの63倍、V A I (330 b p) 74 a存在下でコントロールの146倍であり、V A Iを併用することでE m G F P陽性細胞が顕著に増加した(図2)。S e V再構成開始から3日目の培養上清のV e r o細胞への感染力価は、V A I (180 b p) w t存在下でコントロールの68倍、V A I (180 b p) 74 a存在下でコントロールの139倍、V A I (180 b p) 74 c存在下でコントロールの282倍、V A I - V A I I存在下でコントロールの476倍、V A I (330 b p) 74 a存在下でコントロールの1962倍であった(図3)。このようにV A Iは、S e Vの再構成効率を顕著に高めることが明らかである。

[0103] WO 2005 / 071092によると、S e Vベクターの回収効率は、L L C - M K 2ではとても低く、回収した細胞を鶏卵に接種してもL L C - M K 2由来の細胞ではS e VのH A活性が確認できなかったと示されている。

293T細胞を用いたSeVの再構成では再構成後3日目の培養上清を用いて 10^2 C I U / mL程度の感染力価が示された(Beaty, S.M., et al., mSphere. 2, e00376-16 (2017) 参照)。これに対して、本実施例では、再構成後3日目で 2×10^7 C I U / mLを達成しており、感染力価が顕著に増大している。

[0104] (8) nc886存在下におけるSeVの再構成

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pSeVはpSeV+EmGFP/Tsdfを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとして、pT7-nc886(108bp)、pT7-nc886(272bp)、pT7-VAI74a(330bp)を用いた。

[0105] 再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、nc886(108bp)存在下でコントロールの17倍、nc886(272bp)存在下でコントロールの52倍、VAI(330bp)74a存在下でコントロールの381倍であった(図4)。

[0106] (9) PKR阻害性のウイルス性因子の存在下におけるSeVの再構成

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団またはVerO-Fのみを含む細胞を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしてはCAGnpEFLを用いた。pSeVとしてはpSeV+EmGFP/Tsdfを用いた。PKR阻害プラスミドとしてはpT7-VAI74a(330bp)、pCAGGS-E3L、pCAGGS-K3L、pCAGGS-NS1、pCAGGS-σ3、pCAGGS-U511、及びpCAGGS-Y3のいずれかを用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を測定した。図5に示されるように、コントロールと比較してすべての試験群において細胞からのEmGFP由来の蛍光強度が上昇した。コントロールと比較して、LLC-MK2-F細胞でSeV再構成効率を100倍以上向上させ、かつVERO-F細胞でSeV再構成効率を10倍以上向上させたのはVAI、E3L、σ3、及びU511であった(図5)

。また、図6に示されるように、コントロールと比較してすべての試験群において感染力価が上昇した。力価測定において、LLC-MK2-FおよびVer o-Fの両方の細胞で高い値を示したのはVAI、E3L、σ3、及びUs11であった（図6）。

[0107] (10) 融合配列存在下におけるSeVの再構成

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団またはVer o-Fのみを含む細胞を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしてはCAGnpEFLを用いた。pSeVとしてはpSeV+EmGFP/TSDFを用いた。PKR阻害プラスミドとしてはpCAGGS-E3L、pCAGGS-K3L、pCAGGS-E3K3、pCAGGS-E3Y3、及びpCAGGS-Y3のいずれかを用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を測定した。すると、図7に示されるように、コントロールと比較してすべての試験群において細胞からのEmGFP由来の蛍光強度が上昇した。また、E3K3に比べてE3Y3の方がSeV再構成効率を向上させた（図7）。また、SeV再構成用のプラスミドとしてEFnpLを用い、感染後3日目のSeV再構成効率を比較すると、LLC-MK2-F細胞でE3Lに比べてE3Y3の方が3.5倍、Ver o-F細胞でE3Lに比べてE3Y3の方が6.8倍の向上が認められた。

[0108] (11) PKR阻害因子を恒常的に発現した細胞を用いたSeVの再構成

Ver o-F細胞にpCAGGS-E3L-Hyg、又はpCAGGS-E3Y3-Hygをトランスフェクションし、500μg/mLハイグロマイシンB（ナカライテスク）を用いて細胞を選択し、それぞれE3L及びE3Y3を恒常的に発現する安定株であるVer o-F-E3L、及びVer o-F-E3Y3細胞を得た。これらの細胞にSeV再構成用プラスミドpEF1-NPco、pEF1-P4C(-)co、pEF1-Lco、pCAGGS-F5Rco、pCAGGS-T7mcoの組み合わせ（EFnpL）とpSeV+EmGFP/TSDFを用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を測定した。Ver o-F-E3Y3細胞に

においてS e V再構成効率の2倍の向上が観察された。

[0109] (12) 発現用プロモーターの比較

従来技術と比較を行うためにCAGプロモーターとEF1プロモーターの組み合わせを検討した。細胞はLLC-MK2-FおよびVero-Fを用いた。pSeVとしてはpSeV+EmGFP/Tsdfを用いた。PKR阻害因子としてはE3Y3を用いた。N、P、LすべてをCAGプロモーターからドライブするCAG；N、P、LすべてをEF1αプロモーターからドライブするEFnpL；NをEF1αプロモーターからドライブし、PとLをCAGプロモーターからドライブするEFnCAGpL；及びNとPをCAGプロモーターからドライブし、LをEF1αプロモーターからドライブするCAGnpEFLの組合せでプロモーターの違いによるSeV再構成効率の影響を調べた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を測定した。

[0110] その結果、LLC-MK2細胞においては、図8に示されるように、SeVの再構成に用いるプラスミドのコドン最適化のみでは、十分なSeVの再構成効率向上は得られなかった（PKR阻害因子E3Y3非存在下のCAG参照）。これに対してE3Y3存在下ではいずれのプロモーターによるドライブによっても十分な効率でのSeVの再構成が認められた。PKR阻害因子E3Y3存在下で、NとPをCAGプロモーター、LをEF1αプロモーターで発現させた系では、SeVの再構成効率がCAG（従来型のプラスミド）と比較して、271倍に向上した。

[0111] また、Vero細胞では、図9に示されるように、PKR阻害因子E3Y3存在下では、いずれのプロモーターでも再構成効率が向上したが、N、P、LをEF1プロモーターで発現させることで、CAG（従来型のプラスミド）と比較して、SeVの再構成効率が48倍に向上した。

[0112] (13) PKR阻害因子の組合せの存在下におけるSeVの再構成

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団またはVero-Fのみを含む細胞集団を用いた。pSeVとしてはpSeV

+EmGFP/TSDFを用いた。PKR阻害因子としてはVAIおよびE3Y3を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしてはLLC-MK2-Fに対してCAGnpEFLを用い、Ver o-Fに対してCAGnpEFLおよびEFnpLを用いた。その結果、図10に示されるように、PKR阻害因子を組み合わせることで、PKR阻害因子非存在のコントロールと比較して、1000倍以上にSeVの再構成効率が向上した。

[0113] また、図11に示されるように、SeV再構成開始から3日目の培養上清の感染力価は、LLC-MK2-F細胞の再構成系では、PKR阻害因子非存在のコントロールと比較して、16,857倍、VERO-F細胞の再構成系では、7460倍に向上した。

[0114] (14) PKR阻害因子を搭載したSeVの再構成

PKR阻害因子をコードする遺伝子を搭載するSeVに関して、SeV再構成効率を評価した。細胞はLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしてはCAGnpEFLを用いた。pSeVとしてはpSeV(PM)EmGFP/TSDF、pSeV(PM)EmGFP-VAI74a/TSDF(VAI(180bp)74aを搭載する)、pSeV(PM)EmGFP-VAI74aL/TSDF(VAI(330bp)74aを搭載する)を用いた。EmGFP-VAI74aは、配列番号32に示される通りの配列を有した。EmGFP-VAI74aLは、配列番号33に示される通りの配列を有した。

[0115] 結果は図12および13に示される通りであった。図12に示されるように、コントロール(EmGFP)の再構成効率に比べ、VAI(180bp)74aを搭載したSeVは3倍、VAI(330bp)74aを搭載したSeVは16倍に再構成効率が向上した。また、図13に示されるように、SeV再構成開始から3日目の培養上清の感染力価は、コントロール(EmGFP)の再構成効率に比べ、VAI(180bp)74aを搭載したSeVは3倍、VAI(330bp)74aを搭載したSeVは66倍であった。

[0116] (14-2) VAI (180bp) 74c に対する当該配列の5' 配列追加または3' 配列追加の影響

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pSeVはpSeV+EmGFP/TSdFを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとして、pT7-VAI (180bp) 74c、pT7-VAI (264bp) 74c3p、pT7-VAI (246bp) 74c5p、pT7-VAI (330bp) 74cを用いた。VAI (264bp) 74c3p (配列番号34) は、VAI (180bp) 74cの3' 側に対して、VAIの3' 側の84merを追加したものである。また、VAI (246bp) 74c5p (配列番号35) は、VAI (180bp) 74cの5' 側に対して、VAIの5' 側の86merを追加したものである。

[0117] 再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度をpT7-VAI (180bp) 74c存在下と比較すると、図14に示されるように、pT7-VAI (264bp) 74c3pは2.1倍、pT7-VAI (246bp) 74c5pは6.8倍、pT7-VAI (330bp) 74cは15.7倍であった。このことから、VAIの5' 側配列は、再構成効率の向上により強く寄与することが示唆された。

[0118] (15) EBER1の組込みによるウイルス増殖への影響

SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pSeVはpSeV+EmGFP/TSdFを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとして、pT7-EBER (337bp) を用いた。このプラスミドでは、EBER1の前後にVAIの前後配列がそれぞれ導入されている。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、EBER1 (337bp) 存在下でコントロールの3.8倍であった。

[0119] (16) NS5A148の組込みによるウイルス増殖への影響

[0120] SeVの再構成用細胞としてはLLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を

用いた。SeV再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pSeVはpSeV+EmGFP/Tsdfを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとして、pCAGGS-NS5A148を用いた。このプラスミドは、配列番号16に記載のアミノ酸配列を有するNS5A148を産生する。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、NS5A148存在下でコントロールの7.3倍であった。

[0121] (17) ハンマーヘッドリボザイム配列の導入

SeVの再構成用細胞としてはVer-o-Fのみを含む細胞集団、あるいはクローニングしたVer-o-F-E3Y3のみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pSeVはpSeV+EmGFP/Tsdf、あるいはT7プロモーター配列下にハンマーヘッドリボザイム配列（配列番号36）を有するpSeV+EmGFP/Tsdf(Hh)を用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、pSeV+EmGFP/Tsdf（コントロール：Ctrl）を用いたVer-o-F細胞ではEmGFP陽性細胞が観察されなかったのに対し、Ver-o-F-E3Y3細胞ではEmGFP陽性細胞が観察された。図15に示されるように、pSeV+EmGFP/Tsdf(Hh)を用いたVer-o-F-E3Y3細胞ではVer-o-F細胞と比較し、EmGFPの蛍光強度が37.7倍であった。

[0122] さらに実験を行った。SeVゲノムを転写するプラスミドのT7プロモーターとSeVゲノムをコードする領域との間にハンマーヘッドリボザイム（Hh-Rbz）配列を配置したベクターを作製した（pSeV/Tsdf(Hh)）。Hh-Rbzとしては、配列番号36に記載の配列を有するものを用いた。さらにSeVゲノムをコードする領域の直下にHDVリボザイム（HDV-Rbz）配列を配置し、さらにその下流にVAI（330bp）74cを配置したベクターを作製した（pSeV/Tsdf(Hv)）。HDV-Rbzとしては、配列番号37に記載の配列を有するものを用いた。VAI（330bp）74cの下流にはT7ターミネータ（配列番号38）

を配置した。これにより、S e Vゲノムが転写されると、ハンマーヘッドリボザイムとHDVリボザイムの作用によって、S e Vゲノム部分のみが切り出され、S e VゲノムからVAIなどの他の因子が除去される。LLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。S e V再構成用のプラスミドはCAGnpEFLを用いた。pS e VはpS e V+EmGFP/TSD F（コントロール）、pS e V+EmGFP/TSD F（Hh）、pS e V+EmGFP/TSD F（Hv）を用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、図16に示されるように、pS e V+EmGFP/TSD F（Hh）はコントロールの52.5倍、pS e V+EmGFP/TSD F（Hv）は506.7倍であった。

- [0123] 以下のS e VゲノムのL遺伝子を増幅するプライマーセット（L primer）とVAI（330bp）74cを増幅するプライマーセット（Hv primer）をそれぞれ用いて、得られたS e VゲノムにVAI（330bp）74cが組み込まれているかどうかを検討した。

L遺伝子増幅用のフォワードプライマー： TGGGTCATTCCTGACCAGA（配列番号39）

L遺伝子増幅用のリバースプライマー： CAGCTTCGATCGTTCTGCAC（配列番号40）

VAI増幅用のフォワードプライマー： ATCGAGCCTTATGACAGC（配列番号41）

VAI増幅用のリバースプライマー： GATACCCCTTGCGAATTTATCCACC（配列番号42）

- [0124] 上記により転写されたS e VゲノムをVero細胞から回収し、cDNAを合成した。PCR酵素はKOD One PCR Master Mix -Blue-（東洋紡）を用いた。図17に示されるように、L遺伝子を増幅するプライマーセット（L primer）は、S e Vをコードする遺伝子を搭載したプラスミド（pS e V）においてL遺伝子の一部を想定通りに増幅し、S e VゲノムにおいてもL遺伝子の一部を想定通りに増幅させ

た。これに対して、Hv primerは、SeVゲノムにおいてVAI (330bp) 74cを増幅することはなかった。このことは、プラスミドからSeVゲノムが転写された後に、HDVリボザイムによりVAI (330bp) 74cがSeVゲノムから切断され、失われたことを示唆する。その場合であっても、図16に示されるように、SeVの再構成効率の向上効果を発揮していることは明らかである。

[0125] (18) SeVの再構成用プラスミドへのVAI (330bp) 74cの導入

上記(17)は、SeVゲノムをコードする遺伝子を搭載したプラスミドへのVAI (330bp) 74cの導入を記述した。本実施例では、SeVを再構成するためのSeV粒子の構成要素を発現するプラスミドに対してVAI (330bp) 74cを導入した。具体的には以下の通りに再構成実験を実施した。

[0126] NP、P、L、T7、およびF5Rをそれぞれ発現するpCAGGSやpEF1などの再構成用プラスミドにVAI (330bp) 74cを追加搭載して、VAI (330bp) 74cを搭載した再構成用プラスミドを得た(それぞれ、「pCAGGSv」および「pEFv」と表記する)。pCAGGSv-NPco、pCAGGSv-P4C(-)co、pEFv-Lco、pCAGGSv-T7mco、およびpCAGGSv-F5Rco、並びにこの組み合わせをvCAGnpEFLと表記する。再構成用の細胞としては、LLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしては、vCAGnpEFLを用いた。コントロールとしては、CAGを用いた。pSeVとしてはpSeV+EmGFP/Tsdfを用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、図18に示されるように、vCAGnpEFL-mixはコントロールの43倍であった。

[0127] (19) SeVの再構成用プラスミドへのVAI (330bp) 74cの導入

上記(18)に対して、さらにE3Y3を追加導入した条件で実験を行った。pSeVとしてはpSeV+EmGFP/Tsdf(コントロール)、およびpSeV+EmGFP/Tsdf(Hv)を用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、図19に示されるようにHv+vCAGnpEFL-mix+E3Y3はコントロールの2,836倍であった。得られた培養上清の感染力価を比較すると、図20に示されるように、Hv+vCAGnpEFL-mix+E3Y3はコントロールの29,925倍であった。なお、F5RとE3Y3は再構成時に用いなくても、SeVの再構成は可能であった。

[0128] (20) その他のベクター構成について

T7プロモーター以外にCAGプロモーターもしくはEF1プロモーターで作動させるSeVゲノムプラスミドを構築した(図21A参照)。CAGプロモーターを有するSeVゲノムプラスミドをpCAGGS-SeVと表記し、EF1プロモーターを有するSeVゲノムプラスミドをpEF1-SeVと表記する。再構成用の細胞としては、LLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。SeV再構成用のプラスミドとしては、CAGnpEFLを用いた。SeVゲノムプラスミドとしては、pSeV+EmGFP/Tsdf(Hv)、pCAG-SeV+EmGFP/Tsdf(Hv)、またはpEF1-SeV+EmGFP/Tsdf(Hv)を用いた。再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、図21Bに示されるように、pCAG-SeVはコントロール(pSeV)の1.44倍、pEF1-SeVは1.6倍であった。

[0129] (21) SeV以外のパラミクソウイルスの再構成実験(MuV)

ムンプスウイルス(MuV; パラミクソウイルス科ルブラウイルス属)の再構成用細胞としてはLLC-MK2のみを含む細胞集団を用いた。MuV再構成用のプラスミドとしてはMuV-mixを用いた。MuV-mixは、以下のプラスミドを含んだ: pCAGGS-MuV-N、pCAGGS-MuV-P、pCAGGS-MuV-L、pCAGGS-T7mco。pM

uVとしてはpMuV+EmGFP／miniを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとしてpT7-VAl（330bp）74cを用いた。MuVゲノムの参考配列は、Accession:KY295913に登録された配列であった。MuVミニゲノムは、上記参考配列からリーダー配列とトレイラー配列の間を全て除去して作製された。

[0130] まとめるとMuVの再構成では、以下のプラスミドが用いられた。

pMuV+EmGFP／mini
pCAGGS-MuV-N
pCAGGS-MuV-P
pCAGGS-MuV-L
pCAGGS-T7mco

[0131] 再構成後3日目の細胞からのMuV再構成のEmGFP由来の蛍光強度をコントロールと比較すると、図22に示されるように、VAl（330bp）74c存在下では184倍であった。

[0132] (22) SeV以外のパラミクソウイルスの再構成実験(MeV)

麻疹ウイルス(MeV；パラミクソウイルス科モルビリウイルス属)の再構成用細胞としてはLLC-MK2のみを含む細胞集団を用いた。MeV再構成用のプラスミドとしてはMeV-mixを用いた。MeV-mixは、以下のプラスミドを含んだ：pCAGGS-MeV-N、pCAGGS-MeV-P、pCAGGS-MeV-L、pCAGGS-T7mco。pMeVとしてはpMeV+EmGFP／miniを用いた。PKR阻害因子を含むプラスミドとしてpT7-VAl（330bp）74cを用いた。MeVの参考配列は、Accession:KY295921に登録された配列であった。MeVのミニゲノムは、上記参考配列からリーダー配列とトレイラー配列の間を全て除去して作製された。

[0133] まとめるとMeVの再構成では、以下のプラスミドが用いられた。

pMeV+EmGFP／mini
pCAGGS-MeV-N

pCAGGS-MeV-P

pCAGGS-MeV-L

pCAGGS-T7mco

pT7-VAl (330)74c

[0134] 再構成後3日目の細胞からのMeV再構成のEGFP由来の蛍光強度をコントロールと比較すると、図23に示されるように、VAl (330bp)74c存在下でのMeVの再構成効率は、コントロールの120倍であった。

[0135] (23) SeV以外のパラミクソウイルスの再構成実験 (VSV)

水疱性口内炎ウイルス (VSV; ラブドウイルス科ベシクロウイルス属) の再構成用細胞としては、LLC-MK2のみを含む細胞集団を用いた。VSVの再構成にはVSV-mix (pCAGGS-VSV-N、pCAGGS-VSV-P、pCAGGS-VSV-L、およびpCAGGS-T7mcoを含む) を用いた。VSVゲノムプラスミドとしてはpVSV-ΔG-EGFP-2.6 (Kerafast社) を用いた。PKR阻害因子としてはpCAGGS-E3Y3を用いた。

[0136] 再構成後7日目の細胞からのEGFP由来の蛍光強度を比較すると、図24に示されるように、E3Y3を用いた場合は5倍の蛍光強度であった。

[0137] (24) 異種RNAポリメラーゼを用いたSeV、MeV、MuVの再構成

以下では、pCAGGS-NPco (SeV)、pCAGGS-P4C(-)co (SeV)、pEF1-Lco (SeV)、pCAGGS-T7mcoを含むSeV再構成用のプラスミド混合物を「SeV-mix」と表記する。また、pCAGGS-MeV-N、pCAGGS-MeV-P、pCAGGS-MeV-L、pCAGGS-T7mcoを含むMeV再構成用のプラスミド混合物を「MeV-mix」と表記する。さらに、pCAGGS-MuV-N、pCAGGS-MuV-P、pCAGGS-MuV-L、pCAGGS-T7mcoを含むMuV再構成用のプラスミド混合物を「MuV-mix」と表記する。

[0138] MeVゲノムプラスミドはMeVの構成タンパク質（N、P、M、F、H、L）を発現しないMeVミニゲノムにEmGFPを搭載したpMeV+EmGFP／miniを用いた。MuVゲノムプラスミドはMuVの構成タンパク質（N、P、M、F、SH、HN、L）を発現しないMuVミニゲノムにEmGFPを搭載したpMuV+EmGFP／miniを用いた。SeVゲノムプラスミドはpSeV+EmGFP／TSdF（Hv）を用いた。これらの再構成用細胞としては、LLC-MK2-Fのみを含む細胞集団を用いた。

[0139] 再構成後3日目の細胞からのEmGFP由来の蛍光強度を比較すると、図25に示されるように、SeVゲノムは、SeV-mixのみではなく、MeV-mixやMuV-mixの異種ポリメラーゼを用いても再構成された。同様に、MeVゲノムやMuVゲノムも異種ポリメラーゼによって再構成された。SeVゲノムをSeV-mixを用いて再構成を行った蛍光強度を1として比較すると、MeV-mixを用いた場合は0.68、MuV-mixを用いた場合は0.65の蛍光強度であった（図27参照）。MeVゲノムをMeV-mixを用いて再構成を行った蛍光強度を1として比較すると、SeV-mixを用いた場合は0.31、MuV-mixを用いた場合は0.71の蛍光強度であった（図25参照）。MuVゲノムをMuV-mixを用いて再構成を行った蛍光強度を1として比較すると、SeV-mixを用いた場合は1.22、MeV-mixを用いた場合は0.86の蛍光強度であった（図25参照）。

[0140] (25) 異種RNAポリメラーゼを用いたVSVの構築

VSVの再構成用の細胞としては、LLC-MK2のみを含む細胞集団を用いた。VSVの再構成にはSeV-mixを用いた。VSVゲノムプラスミドとしてはpVSV-ΔG-GFP-2.6（Kerafast社）を用いた。PKR阻害因子としては、pCAGGS-E3Y3を用いた。

[0141] 再構成後3日目の細胞からのEGFP由来の蛍光強度を比較すると、図26に示されるように、VSVゲノムはSeV-mixで再構成されることが

確認されると共に、E3Y3を追加で細胞に導入した場合は、E3Y3非存在下と比較して47.5倍の蛍光強度を示した。

[0142] さらに、NP、P、およびLを一つのプラスミドから発現させるプラスミド(p3vLPNP)を構築した(図27A参照)。pSeVは、CAGプロモーター(pCAG-SeV)またはEF1プロモーター(pEF1-SeV)により駆動させることにより、T7ポリメラーゼの使用を回避した。上記と同様にSeVをLLC-MK2のみを含む細胞集団により再構成させた。結果は、図27Bに示される通りであった。図27Bに示されるように、再構成7日後に、pCAG-SeVおよびpEF1-SeVのいずれにおいてもEmGFPの蛍光が観察され、SeVが再構成されたことが確認された。但し、T7ポリメラーゼをさらにpCAGGS-T7mcoプラスミドにより供給すると、再構成の効率が大きく改善した。

[0143] 配列表の説明

配列番号1 : EF1 α プロモーターの配列の例

配列番号2 : CAGプロモーターの配列の例

配列番号3 : EmGFPをコードする遺伝子の配列の例

配列番号4 : EBウイルスのEBERの配列

配列番号5 : HIVのTARの配列

配列番号6 : ポリオウイルスの2A^{Pro}

配列番号7 : ワクシニアウイルスのE3L

配列番号8 : レオウイルスの σ 3

配列番号9 : ヒトp58^{IPK}

配列番号10 : ワクシニアウイルスのK3L

配列番号11 : HIVのTat

配列番号12 : 単純ヘルペスウイルスのICP34.5

配列番号13 : nc866

配列番号14 : nc866のロングバージョン

配列番号15 : NS5A

配列番号16 : NS5A (1~148)

配列番号17 : VAI (180mer)

配列番号18 : VAI (c. 74U>V)

配列番号19 : VAI (330mer)

配列番号20 : VAI (330mer ; c. 74U>V)

配列番号21 : VAI-VAII

配列番号22 : VAI (180mer : c. 74U>M)

配列番号23 : VAI (330mer : c. 74U>M)

配列番号24 : VAI (330mer ; c. 191C>D)

配列番号25 : VAI (330mer ; c. 74U>V、c. 191C>D
)

配列番号26 : VAI (330mer ; c. 74U>M、c. 191C>G
)

配列番号27 : センダイウイルスのCタンパク質のC末端106アミノ酸

配列番号28 : インフルエンザウイルスのNS1

配列番号29 : 単純ヘルペスウイルスのUs11

配列番号30 : 融合タンパク質E3K3

配列番号31 : 融合タンパク質E3Y3

配列番号32 : EmGFP-VAI (74U>A)

配列番号33 : EmGFP-VAI74aL (74U>A)

配列番号34 : VAI (264bp) 74c3p

配列番号35 : VAI (246bp) 74c5p

配列番号36 : Hh-Rbzの配列の一例

配列番号37 : HDV-Rbzの配列の一例

配列番号38 : T7ターミネーター配列の一例

配列番号39 : L遺伝子増幅用のフォワードプライマー

配列番号40 : L遺伝子増幅用のリバースプライマー

配列番号41 : VAI増幅用のフォワードプライマー

配列番号 4 2 : V A I 増幅用のリバースプライマー

請求の範囲

- [請求項1] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを製造する方法であって、
- 制御配列に作動可能に連結したプロテインキナーゼR（PKR）阻害性の因子をコードする遺伝子から当該因子を発現させてパッケージング細胞に供給することと、
- パッケージング細胞にマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNAを発現させ、前記因子の存在下でマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを形成させることと、
- 形成されたマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを回収することと、
- を含み、
- PKR阻害性の因子は、PKR阻害性のウイルス性因子であるか、または、nc886もしくはp58^{IPK}であり、
- 前記ウイルスまたはウイルスベクターと前記PKR阻害性の因子との関係が異種である、および／または、前記制御配列と前記PKR阻害性の因子との関係が異種である、
- 方法。
- [請求項2] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターが、センダイウイルスベクターである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記PKR阻害性の因子が、アデノウイルスのVA1 RNA、EBウイルスのEBER、HIVウイルスのTAR、ポリオウイルスの2A^{pro}、ワクシニアウイルスのE3L、レオウイルスのδ3、インフルエンザウイルスのNS1、ヒトp58^{IPK}、C型肝炎ウイルスのNS5A、ワクシニアウイルスのK3L、HIVウイルスのTat、ヒトnc886、単純ヘルペスウイルスのUs11、および単純ヘルペスウイルスのICP34.5、並びにこれらのオーソログからなる群から選択される1以上である、請求項1または2に記載の方法。

- [請求項4] ヘルパーウイルス非存在下でマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを製造する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記ゲノムRNAが、制御配列に作動可能に連結したPKR阻害性の因子をコードする遺伝子をさらに有する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記パッケージング細胞が、制御配列に作動可能に連結したPKR阻害性の因子をコードする遺伝子を有するゲノムDNAを有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記パッケージング細胞が、Ver o細胞またはLLC-MK2細胞である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 前記パッケージング細胞が、Ver o細胞からなる細胞集団またはLLC-MK2細胞からなる細胞集団であって、他の細胞を含まない細胞集団である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] PKR阻害性の因子のいずれか1以上をコードする遺伝子を発現可能に含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項10] 請求項9に記載のゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。
- [請求項11] 目的遺伝子をさらに含む、請求項10に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。
- [請求項12] 請求項10または11に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを含む、組成物。
- [請求項13] 請求項9に記載のRNAゲノムをコードするDNA。
- [請求項14] 制御配列に作動可能に連結された請求項13に記載のDNAを含む、遺伝子発現ベクター。