明　細　書

発明の名称

遺伝子発現を上昇させるシステム及び該システムを保持したベクター

技術分野

本発明はプロモーター、エンハンサー等を用いて遺伝子の発現を上昇させる方法、及びプロモーター、エンハンサー等を含む遺伝子発現を上昇させる発現用カセットに関する。

背景技術

以前より、遺伝子発現効率を上昇させるために、CMVプロモーターやCAGプロモーターなど様々な遺伝子発現プロモーターが開発されている（特許文献１～４）。しかしながら、バイオテクノロジーの分野では、これらの従来技術を用いても、細胞の種類や遺伝子の種類によって、遺伝子発現がほとんど起こらない、又は発現タンパク質量が極めて少ないといった問題が日常的に発生している。また、この問題は、遺伝子発現を診断や治療に用いる医療の発展において、大きな障壁となっている。

特許文献１　特許公報第2814433号公報

特許文献２　特許公報第2814434号公報

特許文献３　米国特許第5168062号明細書

特許文献４　米国特許第5385839号明細書

発明の開示

プロモーター、エンハンサー等を用いて遺伝子の発現を上昇させる方法、及びプロモーター、エンハンサー等を含む遺伝子発現を上昇させる得る発現用カセットの提供を目的とする。

本発明者は、プロモーターを利用した遺伝子発現システムにおいて、より高い効率で遺伝子を発現させることができる新しいシステムの開発を試み、様々な遺伝子のプロモーターやエンハンサーの組み合わせによるプロ

モーター活性の比較、検討を行った。その結果、第１のプロモーターの下流に発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターが連結した、遺伝子の発現用カセットを用いて、発現させようとする遺伝子を２つのプロモーターあるいはプロモーターとエンハンサーで挟むことにより、遺伝子を高効率で発現させ得ることを見出した。本発明者はさらに、前記の発現用カセットにさらに、polyA付加配列、RU5'、UAS、SV40-ori等のエレメントを含ませることによりさらに高効率で遺伝子を発現させ得ることを見出した。

本発明の「遺伝子発現を上昇させるシステム及び該システムを保持したベクター」の開発により、ほぼ全ての細胞、遺伝子についてタンパク質の発現を強力に上昇させることができるようになる。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[１] 第１のプロモーターの下流に発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物を含む、さらに該DNA構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターを含む、遺伝子の発現用カセット。

[２] 連結したエンハンサー又は第２のプロモーターの下流に他の遺伝子発現用の機構を有さず、発現させようとする遺伝子を第１のプロモーター１つとエンハンサー１つで挟むか、又は第１のプロモーター１つと第２のプロモーター１つで挟んだ構造を有する、[１]の発現用カセット。

[３] プロモーターがCMV iプロモーター、SV40プロモーター、hTERTプロモーター、βアクチンプロモーター及びCAGプロモーターからなる群から選択されるプロモーターである、[１]の発現用カセット。

[４] エンハンサーがCMVエンハンサー、SV40エンハンサー及びhTERTエンハンサーからなる群から選択される少なくとも１つのエンハンサーである[１]～[３]のいずれかの発現用カセット。

[５] さらに、プロモーターの下流に発現させようとするタンパク質をコードするDNA及びポリA付加配列を含むDNA構築物の上流に１～４個のCMVエンハンサーが連結された[１]～[４]のいずれかの発現用カセット。

[６] さらに以下のエレメントの少なくともいずれか１つを含む[１]～

[５]のいずれかの発現用カセット：

(i) 外来タンパク質をコードするDNAの直ぐ上流に連結されたRU5’；

(ii) エンハンサー及び／又はプロモーターの直ぐ上流に連結されたUAS；及び

(iii) 発現用カセットの最上流に連結されたSV40-ori。

[７] 発現させようとする遺伝子が疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質の遺伝子である、[１]～[６]のいずれかの発現用カセット。

[８] 治療用遺伝子が腫瘍の治療に用い得る癌抑制遺伝子である、[７]の発現用カセット。

[９] 癌抑制遺伝子がREIC/Dkk-3遺伝子である、[８]の発現用カセット。

[１０] 発現させようとする遺伝子がREIC/Dkk-3遺伝子の断片DNAである、[９]の発現用カセット。

[１１] REIC/Dkk-3遺伝子の断片DNAが、配列番号１８のアミノ酸配列の１～７８番目のアミノ酸をコードするDNAである、[１０]の発現用カセット。

[１２] コンストラクトNo.2（図８）、No.4（図１０）、No.6（図１２）、No.8（図１４）、No.10（図１６）、No.12（図１８）及びNo.14（図２０）に示す構造を有する、[１]の外来遺伝子の発現用カセット。

[１３] コンストラクトNo.15（図１６）、No.16（図３７）、No.17（図４９）、No.20（図５７）及びNo.21(図５８）に示す構造を有する、[１]の外来遺伝子の発現用カセット。

[１４] [１]～[１３]のいずれかの外来遺伝子の発現用カセットを含むベクター。

[１５] アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスベクターである[１４]のベクター。

[１６] [１４]又は[１５]のベクターを含む宿主細胞。

[１７] [１４]又は[１５]のベクターを含む疾患検出又は治療用製剤。

[１８] [１]～[１３]のいずれかの発現用カセット又は[１４]若しくは

[１５]のベクターを用いて発現させようとする遺伝子を発現させる方法。
[１９] 第１のプロモーターの下流に、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターが連結したものを、ベクターに導入し、該ベクターを用いて前記遺伝子を発現させる方法。
[２０] [１]～[１３]のいずれか１項に記載の発現用カセット又は[１４]若しくは[１５]に記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養することを含む、発現させようとする遺伝子がコードするタンパク質を製造する方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-264299号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、HEK293細胞株にFuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトした各種外来遺伝子の発現を示す図である。

図２は、種々の細胞株にFuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトしたKLF遺伝子の発現を示す図である。

図３は、HEK293細胞株に各種トランスフェクト試薬を用いて36時間トランスフェクトしたKLF遺伝子の発現を示す図である。

図４は、HEK293細胞株に全長REIC遺伝子及びN78-REICをコードする遺伝子をFuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトした場合の発現を示す図である。

図５－１は、N78-REICをコードするDNAを挿入したコンストラクトNo.14による、ヒト前立腺癌細胞PC3細胞株の増殖抑制と細胞死誘導を示す図（グラフ）である。

図５－２は、N78-REICをコードするDNAを挿入したコンストラクトNo.14による、ヒト前立腺癌細胞PC3細胞株の増殖抑制と細胞死誘導を示す図（写真）である。

図６は、全長REIC遺伝子を挿入したコンストラクトNo.14による、ヒト前立腺癌細胞PC3細胞株の増殖抑制を示す図である。

図７は、コンストラクトNo.1の構造を示す図である。

図８は、コンストラクトNo.2の構造を示す図である。

図９は、コンストラクトNo.3の構造を示す図である。

図１０は、コンストラクトNo.4の構造を示す図である。

図１１は、コンストラクトNo.5の構造を示す図である。

図１２は、コンストラクトNo.6の構造を示す図である。

図１３は、コンストラクトNo.7の構造を示す図である。

図１４は、コンストラクトNo.8の構造を示す図である。

図１５は、コンストラクトNo.9の構造を示す図である。

図１６は、コンストラクトNo.10の構造を示す図である。

図１７は、コンストラクトNo.11の構造を示す図である。

図１８は、コンストラクトNo.12の構造を示す図である。

図１９は、コンストラクトNo.13の構造を示す図である。

図２０は、コンストラクトNo.14の構造を示す図である。

図２１は、全長REIC/Dkk-3遺伝子をコードするアデノウイルスのコンストラクトの構造を示す図である。

図２２－１は、pDNR-1r Donor vectorの全塩基配列を示す図である。

図２２－２は、pDNR-1r Donor vectorの全塩基配列を示す図である（図２２－１の続き）。

図２３は、pIDT-SMARTベクターの全塩基配列を示す図である。

図２４は、CMV iプロモーター（hCMV + イントロンプロモーター）領域の塩基配列を示す図である。

図２５は、BGH polyA（3 x stop + BGH polyA）領域の塩基配列を示す図である。

図２６は、CMVエンハンサー領域の塩基配列を示す図である。

図２７は、ヒトβアクチンプロモーター領域の塩基配列を示す図である。

図２８は、RU5’正方向｛HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメ

ント及びU5配列の一部（R-U5'）｝領域の塩基配列を示す図である。

図２９は、RU5'逆方向{HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメント及びU5配列の一部（R-U5'）}領域の塩基配列を示す図である。

図３０は、4 x CMVエンハンサー領域の塩基配列を示す図である。

図３１は、CAGプロモーター領域の塩基配列を示す図である。

図３２は、2IRESインサート領域の塩基配列を示す図である。

図３３は、SV40ori-UAS-CMVi-RU5'領域の塩基配列を示す図である。

図３４は、3 x stop-BGH-polyA-UAS-hTERTエンハンサー+ SV40エンハンサー+ CMV エンハンサー領域の塩基配列を示す図である。

図３５－１は、コンストラクトNo.14ベクターの全塩基配列を示す図である。

図３５－２は、コンストラクトNo.14ベクターの全塩基配列を示す図である(図３５－１の続き）。

図３６は、コンストラクトNo.15の構造を示す図である。

図３７は、コンストラクトNo.16の構造を示す図である。

図３８は、SV40ori-UAS-SV40 enh-intron A-RU5'領域の塩基配列を示す図であり、コンストラクトNO.15の挿入遺伝子（目的遺伝子）より左側（上流側）の挿入部分の塩基配列を示す図である。

図３９は、SV40ori-UAS-hTERT enh-intron A-RU5'領域の塩基配列を示す図であり、コンストラクトNO.16の挿入遺伝子（目的遺伝子）より左側（上流側）の挿入部分の塩基配列を示す図である。

図４０は、プラスミド中のGFP領域の塩基配列を示す図である。

図４１-１は、コンストラクトNo.14の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である。

図４１-２は、コンストラクトNo.14の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である（図４１-１の続き）。

図４２-１は、コンストラクトNo.15の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である。

図４２-２は、コンストラクトNo.15の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である（図４２-１の続き）。

図４３-１は、コンストラクトNo.16の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である。

図４３-２は、コンストラクトNo.16の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である（図４３-１の続き）。

図４４は、SV40プロモーター（コンストラクトNo.15)及びhTERTプロモーター（コンストラクトNo.16）を含むプラスミドを用いた場合のGFP遺伝子発現の強さを示す図である。

図４５は、プラスミド中のヒトエリスロポエチン領域の塩基配列を示す図である。

図４６は、コンストラクトNo.14のプラスミドを用いてヒトエリスロポエチンを発現させた場合の結果を示す図である。

図４７Aは、プラスミド中のヒトIgG light chain領域（図４４A)の塩基配列を示す図である。

図４７Bは、プラスミド中のヒトIgG heavy chain領域（図４４B)の塩基配列を示す図である。

図４８は、コンストラクトNo.14のプラスミドを用いてヒトIgG light chain （図４８A)及びヒトIgG heavy chain （図４８B)を発現させた場合の結果を示す図である。

図４９は、コンストラクトNo.17の構造を示す図である。

図５０は、コンストラクトNO.17の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域に全長ヒトREICのDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である。

図５１は、コンストラクトNo.17のプラスミドを用いて全長ヒトREICを発現させた結果を示す図である。

図５２は、c-myc遺伝子の配列を示す図である。

図５３は、コンストラクトNo.14の発現プラスミドの発現遺伝子の下流

に存在するBGH polyA及び３つのエンハンサーが連結した塩基配列を示す図である。

図５４は、市販プラスミドにコンストラクトNo.14の発現プラスミドの発現遺伝子の下流に存在するBGH polyA及び３つのエンハンサーが連結した塩基配列を組み込んでc-myc遺伝子を発現させた場合の結果を示す図である。

図５５は、コンストラクトNo.18の構造を示す図である。

図５６は、コンストラクトNo.19の構造を示す図である。

図５７は、コンストラクトNo.20の構造を示す図である。

図５８は、コンストラクトNo.21の構造を示す図である。

図５９-１は、コンストラクトNo.21の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である。

図５９-２は、コンストラクトNo.21の挿入遺伝子（目的遺伝子）領域にGFP遺伝子のDNAを挿入したプラスミドの塩基配列を示す図である（図５９-１の続き）。

図６０は、目的遺伝子をhTERTプロモーターを含むプラスミドに挿入し発現させた場合の結果を示す図である。

図６１は、異なる外来遺伝子を組込んだ複数の発現ベクターを同時トランスフェクトした場合の発現を示す図である。

図６２は、本発明の発現ベクターを用いたヒトエリスロポエチンの産生を示す図である。

図６３は、本発明の発現ベクターを用いて産生したヒトエリスロポエチンの純度を示す図である。

図６４は、本発明の発現ベクターを用いてのヒトエリスロポエチンの産生量を示す図であり、図６４Aは培養上清25mL中の産生量を示し、図６４Bは培養上清１L中の換算産生量を示す。

図６５は、本発明の発現ベクターを用いたヒトREICタンパク質の産生を示す図である。

図６６は、本発明の発現ベクターを用いて産生したヒトREICタンパク質

のイオン交換カラムクロマトグラムを示す図である。

図６７は、本発明の発現ベクターを用いてのヒトREICタンパク質の産生量（培養上清520mL中の産生量及び培養上清１L中の換算産生量）を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、発現させようとするタンパク質の発現用カセットとは、発現させようとするタンパク質の発現を可能とするためのDNAのセットをいう。

該発現用カセットは、少なくとも第１のプロモーターの下流に、発現させようとするタンパク質の遺伝子（発現させようとする遺伝子）及びポリA付加配列を含むDNA構築物を含み、さらに該構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターが連結して含まれる構造を有する。また、発現させようとする遺伝子は、如何なるものも用いることができ、本発明の発現用カセットにおいては、発現させようとする遺伝子を挿入する部位は、マルチクローニングサイトとして存在してもよい。この場合、発現させようとする遺伝子をマルチクローニング部位（挿入部位）に制限酵素が認識する配列を利用して挿入すればよい。このように発現させようとする遺伝子DNA自体が含まれておらず、該DNAを挿入する部分がマルチクローニング部位として含まれる発現用カセットも本発明の発現用カセットに含まれる。なお、発現させようとする遺伝子を標的遺伝子や目的遺伝子と呼び、タンパク質を標的タンパク質や目的タンパク質と呼ぶ場合もある。また、発現カセット構築の観点からは、これらの遺伝子を発現カセットの標的遺伝子の領域に挿入するので、挿入遺伝子ともいう。また、外来遺伝子ということもある。

また、本発明の発現用カセットの最下流には上記のエンハンサー又は第２のプロモーターが存在し、その下流には他の遺伝子発現用の機構を有しない。すなわち、本発明の発現用カセットは、少なくとも発現させようと

する遺伝子を第１のプロモーター１つとエンハンサー少なくとも１つで挟むか、又は第１のプロモーター１つと第２のプロモーター１つで挟んだ構造を有する。ここで、他の遺伝子発現用の機構とは、上記の発現させようとする遺伝子以外の遺伝子を発現させるための機構をいい、発現させようとする遺伝子以外の遺伝子を発現させるためのプロモーターやエンハンサー等が含まれる。本発明の発現用カセットにおいては、発現させようとする遺伝子の上流と下流にプロモーターが存在し得るが、この２つのプロモーターは該発現させようとする遺伝子の発現効率増強のために用いられる。

本発明の発現用カセットは、発現ベクターに組込み利用される。本発明は、本発明の発現用カセットを含むベクターも含む。上記のように、本発明の発現用カセットの最下流には上記のエンハンサー又は第２のプロモーターが存在し、その下流には他の遺伝子発現用の機構を有しない。本発明の発現用カセットを含むベクターは、発現用カセットの下流に他の遺伝子発現用の機構を有しない。

本発明において、発現させようとする遺伝子は、人工的に挿入した外来タンパク質をコードする遺伝子（DNA)を含み、ホスト細胞と由来が異なる遺伝子も、由来が同じ遺伝子も含む。この場合、本発明においては、外来遺伝子を挿入遺伝子ともいう。発現させようとする遺伝子の種類は限定されず、組換え体を製造しようとするあらゆるタンパク質をコードするDNAや特定の疾患の治療に用いるために生体内で発現させようとするタンパク質をコードするDNAを用いることができる。また、特定の疾患の治療に用い得る治療用遺伝子として、REIC/Dkk-3遺伝子（配列番号１７に塩基配列を示す）、p53、Rb等の腫瘍抑制遺伝子、インターロイキン1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、α-インターフェロン、β-インターフェロン、γ-インターフェロン、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、METH-1、METH-2、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、腫瘍壊死因子、肝細胞成長因子、エリスロポエチン、トロンボポエチン、インスリン、成長ホルモン、抗体（IgG軽鎖やIgG重鎖）、プロテインG、プロテインA等の生理

活性物質等の医薬として用い得るタンパク質、疾患等の検出に用いる診断薬や研究室における実験、研究等に用いる試薬として有用なタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。発現させる目的タンパク質は細胞外分泌タンパク質が好ましい。また、生物が本来有する遺伝子の下流にエンハンサー又はプロモーターを人工的に連結させることにより、生物が本来有する遺伝子の発現を増強することもできる。すなわち、本発明において発現させようとする遺伝子は生物が本来有する遺伝子も含む。本発明は、このように生物が本来有する遺伝子の下流にエンハンサー又はプロモーターを挿入し、該遺伝子の発現を制御することも含む。また、生物が本来有する遺伝子を含む細胞の該遺伝子の下流にエンハンサー又はプロモーターを挿入した細胞をも含む。さらに、発現させようとする遺伝子として、RNA干渉作用を有するsiRNA、shRNA、miRNA等をコードするDNA等が挙げられる。RNA干渉作用を有するRNAを用いる場合、トランスファーRNAプロモーターを用いてこれらのRNAを転写製造させることにより特定の遺伝子の発現抑制が可能となる。

例えば、これらの遺伝子のうち、REIC/Dkk-3遺伝子等を腫瘍の治療に用いることができ、全長遺伝子ばかりでなくその断片も用いることができ、例えば、配列番号１８に示すREIC/Dkk-3タンパク質のアミノ酸配列中の第１番目のアミノ酸に始まり第39番目のアミノ酸～第78番目のいずれかのアミノ酸に終わるアミノ酸配列、あるいは配列番号１８に示すREIC/Dkk-3タンパク質のアミノ酸配列中の第１番目のアミノ酸に始まり第39番目のアミノ酸～第78番目のいずれかのアミノ酸に終わるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸を置換、欠失、又は付加してなるアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。これらのDNAの中でも配列番号１８に示すREIC/Dkk-3タンパク質のアミノ酸配列の１～７８番目のアミノ酸からなるペプチドをコードするDNA（N78-REIC DNA）が好適に用いられる。

また、検出や疾患の診断のためにレポーター遺伝子が含まれていてもよい。

プロモーターはDNAを鋳型に転写を開始するDNA上の特定の塩基配列であり、一般的に、共通の配列を持つ。例えば、大腸菌などの原核生物では、通常、転写開始部位の-10塩基対部位にTATAATG配列を、-35塩基対部位にTTGACA配列を持つ。また、真核生物では、通常、-20塩基対部位にTATAボックスを持つ。本発明の発現用カセットは、発現させようとする遺伝子の上流に必ず第１のプロモーターを有し、また発現させようとする遺伝子の下流に第２のプロモーターを有してもよい。これら第１のプロモーター及び第２のプロモーターとして用いるプロモーターは限定されず、第１のプロモーターと第２のプロモーターは同じであっても異なっていてもよい。あらゆる細胞や組織で外来遺伝子を発現を促進させ得る非特異的プロモーターも組織若しくは器官特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、発生若しくは分化特異的プロモーター等の特異的あるいは選択的プロモーターも用いることができる。例えば、第１のプロモーターとして特異的プロモーターを用いて、第２のプロモーターとして、非特異的なプロモーターを用いることができる。本発明において用いるプロモーターとして、癌・腫瘍特異的プロモーターとしてはhTERT（ヒトテロメラーゼ逆転写酵素）、PSA（前立腺特異的抗原）、c-myc、GLUTプロモーターなどが、ES細胞・癌幹細胞特異的プロモーターとしてはOCT3/4、NANOGプロモーターなどが、神経幹細胞特異的プロモーターとしてはNestinプロモーターなどが、細胞ストレス感知プロモーターとしてはHSP70、HSP90、p53プロモーターなどが、肝細胞特異的プロモーターとしてはアルブミンプロモーターなどが、放射線感受性プロモーターとしてはTNF-alphaプロモーターなどが、感染プラスミドのコピー数を上げるプロモーターとしてはSV40プロモーターなどが、増殖性細胞特異的プロモーターとしてEF1-alphaプロモーターなどが挙げられる。さらに具体的には、例えば、第１のプロモーターとして、CMV-iプロモーター（hCMV + イントロンプロモーター）（配列番号５）、βアクチンプロモーター、CAGプロモーター（配列番号１２）、CMVプロモーター等が用いられ、第２のプロモーターとしてCMVプロモーター等が用いられる。βアクチンプロモーターの由来動物種は限定されず、哺

乳類βアクチンプロモーター、例えば、ヒトβアクチンプロモーター（配列番号８）やニワトリアクチンプロモーターが用いられる。また、上記のCMV-iプロモーター等の人工的なハイブリッドプロモーターも用いることもできる。CMV-iプロモーターは米国特許第5168062号明細書や米国特許第5385839号明細書の記載に基づいて合成することができる。プロモーターはプロモーター活性を有する最小配列からなるコアプロモーターの部分を用いてもよい。コアプロモーターとは、正確な転写開始を導く働きをもつプロモーター領域をいい、TATAボックスを含むことがある。上記のプロモーターのうち、hTERTプロモーター等の癌・腫瘍特異的プロモーターは、癌をターゲットとして遺伝子発現による遺伝子治療、癌診断用に好適に用いることができ、hTERTプロモータを含むコンストラクトNo.21をこのような用途に用いることができる。

ポリA付加配列（ポリアデニル化配列、polyA）の由来は限定されず、成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加配列、例えばウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加配列（配列番号６に示す塩基配列に含まれる（13番目の塩基以降の配列））やヒト成長ホルモン遺伝子由来ポリA付加配列、SV40ウイルス由来ポリA付加配列、ヒトやウサギのβグロビン遺伝子由来のポリA付加配列等が挙げられる。ポリA付加配列を発現用カセットに含ませることにより、転写効率が増大する。

エンハンサーは、転写により生成するメッセンジャーRNA(mRNA)の量を結果的に増加させるものであれば限定されない。エンハンサーはプロモーターの作用を促進する効果を持つ塩基配列であり、一般的には100bp前後からなるものが多い。エンハンサーは配列の向きにかかわらず転写を促進することができる。本発明で用いられるエンハンサーは１種類でもよいが、２つ以上の同一のエンハンサーを複数用いたり、又は異なる複数のエンハンサーを組み合わせて用いてもよい。また、異なる複数のエンハンサーを用いる場合、その順番は限定されない。例えば、CMVエンハンサー（配列番号７）、SV40エンハンサー、hTERT（Telomerase Reverse Transcriptase）エンハンサー等を用いることができる。一例として、

hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサーをこの順で連結したものが挙げられる。

さらに発現させようとするタンパク質をコードするDNA及びポリA付加配列を含むDNA構築物の上流に複数のエンハンサー、例えば１～４個のエンハンサーが連結されていてもよい。この上流に連結するエンハンサーは限定されないが、CMVエンハンサーが好ましい。例えば、CMVエンハンサーを４つ連結した４×CMVエンハンサー（配列番号１１）等があげられる。

エンハンサーを「プロモーター－発現させようとする遺伝子－poly A付加配列」からなるDNA構築物のすぐ下流に挿入すると、従来の一般の遺伝子発現システムと比べて、強力な発現させようとする遺伝子のタンパク質発現が可能となる。

特に、CMV iプロモーターとCMVエンハンサーの組合せにより、ほぼ全ての細胞（宿主細胞）において、あらゆる遺伝子を挿入した場合に、如何なるトランスフェクション試薬を用いた場合においても、発現させようとする遺伝子の強力なタンパク質発現が可能となる。

CMVエンハンサーをプロモーターの上流に1個以上挿入することにより、特定の細胞（例えば、後記の実施例のHEK293細胞株やMCF7細胞株）において、特定の遺伝子、例えば、後記の実施例のREIC/Dkk-3遺伝子やCD133遺伝子において、発現がさらに増強される。また、CMVエンハンサーをプロモーターの前に4個挿入することにより、特定の細胞（例えば、後記の実施例のHepG2細胞株やHeLa細胞株）によっては、さらに発現が増強される。

なお、上流にCMVエンハンサーを挿入したのみでは、遺伝子発現は少ししか上昇しないか、あるいは、少ししか変化しない（図１及び図２）。本発明の発現用カセットにおいては、poly A付加配列の下流すぐにCMVエンハンサーが挿入連結されていることが重要である。

さらに、RU5’（配列番号９）が発現させようとするタンパク質をコードするDNAの直ぐ上流に連結されていてもよい。直ぐ上流とは、他の特定の機能を有するエレメントを介さず直接連結していることをいうが、リンカーとして短い配列が間に含まれていてもよい。RU5’はHTLV由来のLTRで、

挿入することにより、タンパク質発現を上昇させるエレメントである（Mol.Cell.Biol.,Vol.8(1),p.466-472,1988）。RU5'を報告されているのと逆に挿入することにより、プロモーターのエンハンサー挿入による発現増強効果が打ち消されることがある。

さらに、エンハンサー及び／又はプロモーターの直ぐ上流にUASが連結されていてもよい。UASとは、GAL4遺伝子の結合領域であり、後にGAL4遺伝子を挿入することにより、タンパク質発現が上昇させられる。

さらに、発現用カセットの最上流にSV40-oriが連結されていてもよい。SV40-oriはSV40遺伝子の結合領域であり、後にSV40遺伝子を挿入することにより、タンパク質発現が上昇する。

上記の各エレメントは、機能的に連結している必要がある。ここで、機能的に連結しているとは、それぞれのエレメントがその機能を発揮して、発現させようとする遺伝子の発現が増強されるように連結していることをいう。

図７～２１、３６、３７、４９、５５～５８に種々の発現用カセットのコンストラクトの構造を示す。本発明において、コンストラクトをプラスミドの骨格ともいう。本発明の発現させようとする遺伝子の発現を増強するコンストラクトとして、例えば、コンストラクトNo.2（図８）、No.4（図１０）、No.6（図１２）、No.8（図１４）、No.10（図１６）、No.12（図１８）、No.14（図２０）、No.15（図３６）、No.16（図３７）、No.17（図４９）、No.20（図５７）及びNo.21（図５８）に示すコンストラクトが挙げられる。また、図２１に示すコンストラクトも含まれる。

これらのコンストラクトの中では、遺伝子発現の上昇という観点からは、目的遺伝子の下流に３つのエンハンサーが連結されているコンストラクトNo.14、コンストラクトNo.15及びコンストラクトNo.16のコンストラクトが最も優れている。例えば、コンストラクトNo.14に目的遺伝子としてREIC全長遺伝子を用いることにより、そのタンパク質発現量は、100 MOIでのアデノウイルスベクター(全長REIC/Dkk-3遺伝子をコード)の場合の発現量に匹敵する。また、コンストラクトNo.14のプラスミド骨格は、N78-

REICをコードするDNAのような遺伝子断片においても、遺伝子発現上昇効果を示す。

例えば、コンストラクトNo.14のコンストラクトにN78-REICをコードするDNA断片を含む製剤を、ヒト前立腺癌細胞PC3にトランスフェクションすることにより、著明な癌細胞増殖抑制効果及び癌細胞死誘導効果が認められる。コンストラクトNo.14のコンストラクトに全長REIC遺伝子をコードした製剤を、ヒト前立腺癌細胞PC3にトランスフェクションすることにより、癌細胞増殖抑制効果が認められる。

また、コンストラクトNo.14にヒトエリスロポエチン等のタンパク質をコードするDNAを挿入し、発現ベクターを作製し、該発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクトすることにより、該細胞を用いて前記タンパク質を大量に製造することができる。

本発明において上記配列番号の塩基配列で表されるDNAは、それぞれのDNAが有する活性又はそれぞれのDNAがコードするタンパク質若しくはポリペプチドが有する活性を有している限り、塩基配列に変異を有していてもよい。例えば、それぞれの配列番号で表される塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、それぞれの配列番号で表される塩基配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等 (例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて) を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しているDNA、又は前記DNAによりコードされるタンパク質若しくはポリペプチドのアミノ酸配列に対して１又は複数若しくは数個(１～10個、好ましくは１～5個、さらに好ましくは１個若しくは２個)のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質若しくはポリペプチドをコードするDNAも本発明のDNA構築物の構築に用いることができる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、「１XSSC、0.1% SDS、

37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5XSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2XSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待し得る。ただし、上記のSSC、SDS及び温度の条件の組み合わせは例示であり、DNAの濃度、DNAの長さ、ハイブリダイゼーションの反応時間などを適宜組み合わせることにより、必要なストリンジェンシーを実現することが可能である。

本発明の発現用カセットを挿入するベクターとしては、プラスミド、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等のウイルスベクターや生分解性ポリマーなどの非ウイルスベクターが挙げられる。上記発現用カセットを導入したベクターを、感染、エレクトロポレーション等の公知の方法により細胞に導入すればよい。

また、この際、公知のトランスフェクション試薬を用いて導入してもよい。

本発明の発現用カセットを挿入したベクターを細胞に導入し、該細胞をトランスフェクトすることにより、該細胞で目的遺伝子を発現させ、目的タンパク質を産生することができる。本発明の発現カセットを導入し目的タンパク質を産生させるためには、真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌、枯草菌、ブレビバチルス属細菌等の細菌細胞が挙げられる。好ましくは、Hela細胞、HEK193細胞、CHO細胞、例えばCHO、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞等の哺乳類細胞が用いられる。形質転換された前記の宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とするタンパク質を産生させることができる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM等の公知の培養用培

地を使用することができる。発現されたタンパク質は、分泌タンパク質の場合は培養液中から、非分泌タンパク質の場合は細胞抽出物中から公知の方法で精製することができる。目的タンパク質を発現し生産する場合、細胞に別々の目的遺伝子を含む複数のベクターを同時にトランスフェクトさせた生産してもよい。このようにすることにより、一度に複数のタンパク質を産生することができる。

さらに、市販のベクターを改変し、本発明の発現用カセットが含まれるようにしてもよい。例えば、pShuttleベクター等の市販のベクターの発現遺伝子カセットの下流領域にエンハンサーを組込んで用いることができる。本発明のベクターは市販のカセットを改変したものも包含する。

本発明は、さらに、上記の発現させようとする遺伝子発現用カセットを含むアデノウイルス(Ad)ベクター及びアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。該ベクターは、癌等の疾患の特異的診断又は治療を可能とする。該ベクターはアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスに上記の発現させようとする遺伝子発現用カセットを挿入して作製することができる。

アデノウイルスベクターの特徴として、（１）多くの種類の細胞に遺伝子導入ができる、（２）増殖停止期の細胞に対しても効率よく遺伝子導入ができる、（３）遠心により濃縮が可能であり、高タイター（10～11PFU/ml以上）のウイルスが得られる、（４）in vivoの組織細胞への直接の遺伝子導入に適している、といった点が挙げられる。

遺伝子治療用のアデノウイルスとしては、E1/E3領域を欠失させた第１世代のアデノウイルスベクター（Miyake,S.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,93,1320,1996）から、E1/E3領域に加え、E2もしくはE4領域を欠失させた第２世代のアデノウイルスベクター（Lieber,A.,et al.,J.Virol.,70,8944,1996;Mizuguchi,H.&Kay,M.A.,Hum.Gene Ther.,10,2013,1999）、アデノウイルスゲノムをほぼ完全に欠失させた（GUTLESS）第３世代のアデノウイルスベクター（Steinwaerder,D.S.,et al.,J.Virol.,73,9303,1999）が開発されているが、本発明に係る遺伝子

を導入するには、特に限定されずいずれのアデノウイルスベクターでも使用可能である。

アデノ随伴ウイルスは、パルボウイルス属１本鎖DNAウイルスであり、（１）遺伝子長期発現、（２）低毒性、（３）分裂及び非分裂細胞に遺伝子導入が可能という特性を有する。コンカタマー（concatamer；１本鎖DNAが連結した複合体）の形成が遺伝子長期発現の原因とされている。

本発明の発現させようとする遺伝子の発現用カセットを含み標的となる発現させようとする遺伝子を発現し得るアデノウイルス（Ad)ベクター及びアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、疾患検出又は疾患治療に用い得る。疾患としては、癌等が挙げられ、アデノウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターの外殻に挿入された特定の細胞に発現しているタンパク質に選択的に結合するRGD等のペプチドにより該細胞を指向し、該細胞に感染し、発現させようとする遺伝子が発現する。発現させようとする遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子の場合、特定の細胞を発光等により検出することができる。特定の細胞が癌細胞の場合、被験体に投与することにより、被験体中の癌細胞を検出し、該被験体が癌に罹患していることを診断することができる。本発明のアデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは細胞１個を検出することができるので、例えば微小癌の検出に用いることができる。

また、発現させようとする遺伝子が治療用遺伝子の場合、特定の細胞中で標的となる発現させようとする遺伝子が発現し、治療効果を発揮し得る。例えば、特定の細胞が癌細胞であり、REIC/Dkk-3遺伝子等の癌抑制遺伝子を用いた場合、被験体に投与することにより、被験体の癌細胞に癌治療用遺伝子がデリバリーされ、癌細胞中で遺伝子が発現し、治療効果を発揮する。本発明は、このようなアデノウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルスベクターを含む診断又は治療用ウイルス製剤を包含する。治療用遺伝子として、ヒトREIC/Dkk-3遺伝子等の癌抑制遺伝子を用いた場合の治療対象となる癌としては、本発明の治療対象となる癌としては、例えば、脳・神経腫瘍、皮膚癌、胃癌、肺癌、肝癌、リンパ腫・白血病、結腸癌、膵癌、

肛門・直腸癌、食道癌、子宮癌、乳癌、副腎癌、腎癌、腎盂尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、尿道癌、陰茎癌、精巣癌、骨・骨肉腫、平滑筋腫、横紋筋腫、中皮腫等が挙げられる。本発明のアデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは原発性癌の治療にも転移性癌の治療にも用いることができる。

本発明のアデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは、遺伝子治療の分野において使用可能な方法、例えば、静脈内投与や動脈内投与などの血管内投与、経口投与、腹腔内投与、気管内投与、気管支内投与、皮下投与、経皮投与等により投与することができる。特に、本発明のアデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは特定の組織、細胞への指向性が大きく、標的遺伝子を効率的に特定の組織、細胞へデリバリーすることができるので、血管内投与によっても、効率的に診断、治療を行うことができる。

アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは、治療上有効量を投与すればよい。治療上の有効量は、遺伝子治療分野の当業者であれば容易に決定することができる。さらに、投与量は、被験者の病態の重篤度、性別、年齢、体重、習慣等によって適宜変更することができる。例えば、アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルススベクターを、0.5×10^{11}～2.0×10^{12} viral genome／kg体重、好ましくは1.0×10^{11}～1.0×10^{12} viral genome／kg体重、さらに好ましくは1.0×10^{11}～5.0×10^{11} viral genome／kg体重の量で投与すればよい。viral genomeは、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスのゲノムの分子数（ウイルス粒子数）を表し、particleということもある。製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベ

ンジルアルコールなどを併用してもよい。

さらに、目的遺伝子を含む本発明の発現カセットを含む発現ベクターを癌等に対するワクチンやDNAワクチンとして用いることもできる（Kaufman, H. L. et al., J. Clin. Oncol. 22, 2122- 2132 (2004); McNeel, D. G. et al., J. Clin. Oncol. 27, 425- 430 (2009)）。例えば、癌特異的抗原を標的タンパク質とし、該タンパク質をコードする遺伝子を組込んだ本発明の発現カセットを含む発現ベクターを皮下への注入等により生体内に投与し、前記抗原を生体内で発現させ、該抗原に対する宿主の細胞性免疫や抗体免疫の活性化を誘導することができる。このようにワクチンとして用いることにより、本発明の発現カセットを癌等の疾患の予防や治療に用いることができる。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例１　CMVプロモーターを含む発現用カセット

本発明の発現用カセットを作成し、トランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。

（１）用いた発現用カセットのコンストラクト

コンストラクトNo.１（図７）

発現させようとする遺伝子の上流にCMV iプロモーターを搭載した遺伝子発現プラスミドである。また、前記遺伝子の下流にBGH polyA（ウシ成長ホルモンpolyA付加配列）が連結されている。すなわち、一般的に使用されているCMV iプロモーターを用いた発現プラスミドと、タンパク質発現力は同等と考えられる。

コンストラクトNo.２（図８）

コンストラクトNo.１のBGH poly Aの下流すぐにCMV エンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.３（図９）

コンストラクトNo.１のCMV iプロモーターを、ヒトβアクチンプロモーターに置換したものである。

コンストラクトNo.4（図１０）

コンストラクトNo.3のBGH poly Aの下流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.5（図１１）

コンストラクトNo.3のヒトβアクチンプロモーターの下流すぐにRU5'領域を挿入したものである。

コンストラクトNo.6（図１２）

コンストラクトNo.5のBGH poly Aの下流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.7（図１３）

コンストラクトNo.5のヒトβアクチンプロモーターの上流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.8（図１４）

コンストラクトNo.7のBGH poly Aの下流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.9（図１５）

コンストラクトNo.7のRU5'領域を逆の塩基配列にしたものである。

コンストラクトNo.10（図１６）

コンストラクトNo.9のBGH poly Aの下流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.11（図１７）

コンストラクトNo.5のヒトβアクチンプロモーターの上流すぐに4×CMVエンハンサー（４つのCMVエンハンサー）を挿入したものである。

コンストラクトNo.12（図１８）

コンストラクトNo.11のBGH poly Aの下流すぐにCMVエンハンサーを挿入したものである。

コンストラクトNo.13（図１９）

CAGプロモーターを搭載した遺伝子発現プラスミドである。すなわち、一般的に使用されているCAGプロモーターを用いた発現プラスミドと、タ

ンパク質発現力は同等と考えられる。

コンストラクトNo.14(図２０)

これまでの様々な上記のコンストラクトを調べた結果より、BGH poly Aの下流すぐにCMV エンハンサーを挿入することにより、遺伝子発現が著しく増強することが判明したので、コンストラクトNo.14ではさらに、他のエンハンサーであるhTERTエンハンサーとSV40エンハンサーを連結した。その結果として、コンストラクトNo.2よりも優れたコンストラクトになったと考えられる。

全長REIC/Dkk-3遺伝子をコードするアデノウイルスのコンストラクト(図２１)

REIC/Dkk-3 (Ad-REIC)の全長cDNAをコスミドベクターpAxCAwtに組込み、次いでCOS-TPC method (TAKARA Bio)によりアデノウイルスベクターにトランスファーした。この際、LacZ遺伝子を保持するアデノウイルスベクター (Ad-LacZ) をコントロールとして用いた。用いたアデノウイルスベクターは、特許3813872号公報に記載されているものと同じである。

図２２～図３５に以下のエレメント又はコンストラクトの塩基配列を示す。

図２２－１及び図２２－２（図２２－１の続き）は、pDNR-1r Donor vector（プロモーターの無いクローニング用プラスミドベクター（Clontech社、品番PT3616-5））の全塩基配列を示す。

図２３は、pIDT-SMARTベクター（プロモーターの無いクローニング用プラスミドベクター（IDT社））の全塩基配列を示す。

図２４は、CMV iプロモーター（hCMV + イントロンプロモーター）領域の塩基配列を示す。該領域は、CMV iプロモーター領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図２５は、BGH polyA（3×stop + BGH polyA）領域の塩基配列を示す。

該塩基配列中の「TAATAAA」の部分は、BGH polyA配列の中でも、より重要な配列である。該配列は、BGH polyA領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図２６は、CMVエンハンサー領域の塩基配列を示す。該配列は、CMVエンハンサー領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図２７は、ヒトβアクチンプロモーター領域の塩基配列を示す。該配列は、InvivoGen社のpDRIVE-hβActin-RU5'のプラスミドを入手し、その当該部分の塩基配列をPCRして増幅することにより作成した。

図２８は、RU5'正方向{HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメント及びU5配列の一部（R-U5'）}領域の塩基配列を示す。該配列は、{HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメント及びU5配列の一部（R-U5'）}領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図２９は、RU5'逆方向{HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメント及びU5配列の一部（R-U5'）}領域の塩基配列を示す。該配列は、{HTLV Type 1 long terminal repeatのRセグメント及びU5配列の一部（R-U5'）}領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図３０は、４×CMVエンハンサー領域の塩基配列を示す。図３０の塩基配列の中で、下線が引いてある部分は、いわゆる「短いCMVエンハンサー」と呼ばれるもので、これが４つあるので、４×CMVエンハンサーとなる。なお、前述のCMVエンハンサーは「短いCMVエンハンサー」を含んでおり、一般的にはCMVエンハンサーと言う場合、長い方を指す。前記配列は、CMVエンハンサー領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図３１は、CAGプロモーター領域の塩基配列を示す。公知のCAGプロモーター領域の塩基配列である。オリエンタル酵母社より提供を受けたCAGプロモーター搭載の遺伝子発現ベクターであるpCAGGSプラスミドを元に、その当該部分の塩基配列をPCRして増幅することにより作成した。

図３２は、2IRESインサート領域の塩基配列を示す。後記の図５及び図６のIRESコントロール遺伝子の塩基配列である。BiP-IRES領域（図３２の塩基配列中の（１）の枠で囲んだ小文字の部分）とMyc-IRES領域（図３２の塩基配列中の（２）の枠で囲んだ小文字の部分）の二つの正常ヒトDNAの塩基配列をこの順でつなげたものであり、挿入遺伝子のコントロール遺

伝子として用いられる遺伝子である。前記配列は、BiP-IRES領域とMyc-IRES領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。

図３３は、SV40ori-UAS-CMVi-RU5'領域の塩基配列を示す。コンストラクトNo.14（最も良いコンストラクト）の挿入遺伝子（外来遺伝子）より左側の挿入部分の塩基配列である。該配列は、当該部分に含まれるそれぞれの領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。図３３の塩基配列中の（１）の枠で囲んだ部分はSV40 ori領域を示し、（２）の枠で囲んだ部分はCMV iプロモーター領域を示し、（３）の枠で囲んだ部分は、RU5'領域を示す。

図３４は、３×stop-BGH-polyA-UAS-hTERTエンハンサー+ SV40エンハンサー+ CMV エンハンサー領域の塩基配列を示す。コンストラクトNo.14（最も良いコンストラクト）の、挿入遺伝子（外来遺伝子）より右側（下流側）の挿入部分の塩基配列である。該配列は、当該部分に含まれるそれぞれの領域の塩基配列の既知の情報を元に、人工合成により作成した。図３４中の塩基配列中の（１）の枠で囲んだ大文字の部分はBGH polyA領域を、（２）の枠で囲んだ小文字の部分はhTERTエンハンサー領域を、（３）の枠で囲んだ大文字の部分はSV40エンハンサー領域を、（４）の枠で囲んだ小文字の部分はCMVエンハンサー領域を示す。

図３５－１及び３５－２は、コンストラクトNo.14ベクターの全塩基配列を示す。図２０に示したコンストラクトNo.14（最も良いコンストラクト）の塩基配列を示し、pIDT-SMARTベクター部分（図３５－１中塩基配列の第１０行目の太字部分までの領域及び図３５－２中塩基配列の下から２４行の枠で囲まれたGCGCGCの後ろの領域）も含む、全ての塩基配列である。該配列は、前述のpIDT-SMARTベクターに、直前の２つに示した（コンストラクトNo.14の）挿入遺伝子（外来遺伝子）左右の挿入部分を組み込むことにより作成した。（１）はSV-40 ori領域、（２）はCMV iプロモーター領域を、（３）はRU5'領域を、（４）はBiP IRES領域を、（５）はMyc IRES領域を、（６）はhTERTエンハンサー領域を、（７）はSV40エンハンサー領域を示す。

（２）用いた外来遺伝子（挿入遺伝子）

6His-S100A11-HA

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとして、その5’側に6Hisのリンカーをつけたプライマーと3’側にHAのリンカーをつけたプライマーとでPCRして作成した。

GFP(Green fluorescent protein)

Clontech社製品のGFP発現ベクターである、pEGFP-N2をテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRして作成した。

REIC/Dkk-3（全長）

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRして作成した。

N78 - REIC-6His

上記で得た全長のREIC/Dkk-3遺伝子の3’側に6Hisがつくようにプライマーを設定し、PCRして作成した。

コントロール遺伝子(IRES)

ここで言うこのIRESコントロール遺伝子は、BiP-IRES遺伝子とMyc-IRES遺伝子の２つの正常ヒトDNAの既知の塩基配列をこの順でつなげたものであり、人工合成により作成した。この遺伝子をコンストラクトNo.14の挿入遺伝子（外来遺伝子）の部分に挿入することにより、後記の図５及び図６においてREIC/Dkk-3(全長)遺伝子及びN78 - REIC-6HisをコードするDNAのコントロール遺伝子とした。

CD133-6His

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRして作成した。

LGR5-HA

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRして作成した。

Telomerase-6His

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとしてプライマーを設定

し、PCRして作成した。

KLF16

ヒト正常線維芽細胞の当該cDNAをテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRして作成した。

（３）トランスフェクション法とウエスタンブロット分析（WB法）

各種の細胞（６ウェルプレートで70～80％コンフルエントに培養したもの）への各種遺伝子の導入は、各社のトランスフェクション試薬：FuGENE（商標）-HD（Roche社）、Lipofectamine（登録商標） 2000（Invitrogen社）、Trans-IT-Keratinocyte（TAKARA Bio社）を用いて行った。その手技は、それぞれの製品のマニュアルに記載の通りに行った。

発現された外来遺伝子（挿入遺伝子）ウエスタンブロット分析は以下の方法で行った。

細胞をPBS（phosphate buffered saline）を用いて２回洗浄し、lysis buffer（50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5μg/ml leupeptin, 5μg/ml aprotinin, 2 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF, 10 mM β-GP)で溶解し、タンパク質を抽出した。遠心分離後、各実験に用いる各上清のタンパク質量を同濃度に調整し、同量の2×SDSサンプルバッファーを用いて希釈した。次いで、95℃で５分間熱処理した。サンプル（10μgタンパク質）を7.5％又はグラジエントSDS-PAGEゲル（Bio Rad社）で分離しポリフッ化ピニリデン（PVDF)膜に転写した。ブロットを10％脂肪不含ミルクパウダー、６％グリシン及び0.1％Tween-20を含むTBS(Tris buffered saline）で室温１時間ブロッキングした。次いで、タンパク質を以下の一次抗体（1:1000希釈）を用いて同定した。

抗HA抗体（Cell Signaling Technology社）

抗GFP抗体（Clontech社）

抗REIC抗体（ウサギ抗ヒトREIC/Dkk-3ポリクローナル抗体）

抗6His抗体（MBL社）

抗KLF16抗体（Abcam社）

0.1％ Tween-20含有TBS（T-TBS)で十分洗浄し、ブロットを西洋わさび

ペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と反応させた。T-TBSで十分洗浄した後、enhanced chemiluminescence検出法(ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech社)により検出した。

細胞培養は以下の方法で行った。

HEK293（ヒト正常腎臓由来）、MCF7（ヒト乳癌由来）、PC3（ヒト前立腺癌由来）、HeLa（ヒト子宮癌由来）、HepG2（ヒト肝臓癌由来）の各細胞株はATCC（the American Type Culture Collection (Rockville, MD)）より入手した。用いた培地は以下のとおりであった。

HEK293 : DMEM high glucose medium (Invitrogen社)

MCF7 : DMEM high glucose medium (Invitrogen社)

PC3 : F12 medium (Invitrogen社)

HeLa : DMEM high glucose medium (Invitrogen社)

HepG2 : DMEM high glucose medium (Invitrogen社)

上記細胞株を10%(v/v) fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml)及びstreptomycin (100μg/ml)を補足した上記培地で増殖させ５%CO2条件下でインキュベートした。

結果を図１～図６に示す。

図１は、HEK293細胞株にFuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトした各種外来遺伝子の発現を示す。コンストラクトNo.1のタンパク質発現力は、一般的に使用（販売）されているCMV iプロモーターを用いた発現プラスミドと同等であった。すなわち、これらの発現プラスミドのタンパク質発現力と比べて、コンストラクトNo.2のタンパク質発現力は著しく強いと言える。また、以下の様々な遺伝子において同様の結果であり、コンストラクトNo.2は、全ての種類の遺伝子の発現において、現在広く使われている遺伝子発現システムを凌駕していると言える。

S100A11：癌増殖に関与すると考えられる；細胞質内―核内移行タンパク質

GFP：蛍光タンパク質；細胞質内タンパク質

REIC/Dkk-3 (full length)：癌抑制タンパク質；分泌タンパク質

N78 - REIC：上記の遺伝子断片を元に作られる断片タンパク質（配列番号２に示すREIC/Dkk-3タンパク質のアミノ酸配列の１～７８番目のアミノ酸からなる断片ペプチド）

CD133：癌幹細胞のマーカー；細胞表面にも発現

LGR5：正常細胞及び癌細胞の幹細胞のマーカー；細胞膜貫通タンパク質

Telomerase：細胞の老化や不死化に関与；細胞質内タンパク質

KLF16：タンパク質の転写に関与；核内タンパク質

図２は、種々の細胞株にFuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトしたKLF遺伝子の発現を示す。図に示した全ての細胞（HEK293細胞、MCF7細胞、PC3細胞、HeLa細胞、HepG2細胞）において、コンストラクトNo.2のタンパク質発現力（KLF16の遺伝子発現）は、コンストラクトNo.1と比べて著しく強いと言える。すなわち、コンストラクトNo.2は、全ての種類の細胞での遺伝子発現において、現在広く使われている遺伝子発現システムを凌駕していると言える。

図３は、HEK293細胞株に各種トランスフェクト試薬を用いて36時間トランスフェクトしたKLF遺伝子の発現を示す。いずれのトランスフェクション試薬においても、コンストラクトNo.2の場合で、WB法により最も多くのKLF16タンパク質が発現されている。コンストラクトNo.1は、一般に入手可能で一般に良く使用されているCMV iプロモーターを含むコンストラクトであり、コンストラクトNo.13は同じく一般に良く使用されているCAGプロモーターを含むコンストラクトである。すなわち、現在世界中において遺伝子発現用のプラスミドコンストラクトとして普及・使用されているコンストラクトを著しく凌駕する量のタンパク質発現（遺伝子発現の過程全体としての効率の向上）が、本発明のコンストラクトNo.2を使用することにより可能となった。

図４は、HEK293細胞株に全長REIC遺伝子及びN78-REICをコードする遺伝子FuGENE（商標）-HDを用いて36時間トランスフェクトした場合の発現を示す。左パネルは、WB法により、コンストラクトNo.14ではコンストラクトNo.2の場合よりREIC/Dkk-3タンパク質(全長)が多く発現されていること

を示す。すなわち、図１のWB法の結果（コンストラクトNo.1～No.12の中でNo.2が最もタンパク質を多く発現）及び図３のWB法の結果（コンストラクトNo.1、No.2、No.11、No.12、No.13の中でNo.2が最もタンパク質を多く発現）を踏まえると、検討したプラスミドコンストラクトの中で最も多くタンパク質を発現できるもの（有用なもの）は、コンストラクトNo.14であった。このコンストラクトNo.14によるタンパク質発現の能力は、100 MOIにおけるAd-REIC（全長REIC/Dkk-3遺伝子をコードするアデノウイルス）の投与時と同等な程強力であった。右パネルは、断片遺伝子であるN78-REIC-6Hisをコンストラクト No.14に挿入した時も、左パネルと同様のことが言えることを示す。すなわち、提示したプラスミドコンストラクトの中で最も多くタンパク質を発現できるもの（有用なもの）は、コンストラクトNo.14であった。

図５は、N78-REICをコードするDNAを挿入したコンストラクトNo.14による、ヒト前立腺癌細胞PC3細胞株の増殖抑制と細胞死誘導を示す。

細胞生存率アッセイ

PC3細胞株を６ウェルプレートに１ウェル当たり50,000細胞の密度で完全培地中に播いた。24時間のインキュベーション後、完全培地中で細胞を所定のプラスミドにFuGENE（商標）-HD試薬を用いてトランスフェクトし、所定の日数インキュベートした。インキュベーション後、細胞生存率をCellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（Promega社）を用いて測定した。

統計分析

２群間でMann-Whitney U testを行い、$p < 0.05$のとき有意差があると判定した。

図に示すようにN78-REICをコードするDNAを挿入したコンストラクトNo.14の投与後２日目と５日目において、コントロール遺伝子(IRES)を挿入したコンストラクトNo.14の投与群と比べ、有意にPC3細胞株の増殖が抑制された（PC3細胞の数がN78-REICをコードするDNA-コンストラクトNo.14の投与により減っていることより、有意に多く細胞死が誘導されたと言え

る）。

図６は、全長REIC遺伝子を挿入したコンストラクトNo.14による、ヒト前立腺癌細胞PC3細胞株の増殖抑制を示す。

細胞生存率アッセイ

PC3細胞株を６ウェルプレートに１ウェル当たり50,000細胞の密度で完全培地中に播いた。24時間のインキュベーション後、Hank's Balanced Salt Solutions中で細胞を所定のプラスミドにFuGENE（商標）-HD試薬を用いてトランスフェクトし、所定の日数インキュベートした。インキュベーション後、細胞生存率をCellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega社)を用いて測定した。

統計分析

２群間でMann-Whitney U testを行い、$p < 0.05$のとき有意差があると判定した。

図に示すように全長REIC遺伝子挿入したコンストラクトNo.14の投与後２日目において、コントロール遺伝子(IRES)を挿入したコンストラクトNo.14の投与群と比べ、有意にPC3細胞の増殖が抑制された。

実施例２　SV40プロモーター又はhTERTプロモーターを含む発現用カセット

GFP(Green fluorescent protein)を目的遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、Hela細胞をトランスフェクトし、GFP発現を観察することにより発現の強さを分析した。トランスフェクトは、リポフェクタミン2000を用いて行い、48時間後にGFP発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは実施例１で用いたコンストラクトNo.14（図２０）並びにコンストラクトNo.14のCMV iプロモーターをSV40プロモーターに置換したコンストラクトNo.15（図３６）及びコンストラクトNo.14のCMV iプロモーターをhTERTプロモーターに置換したコンストラクトNo.16（図３７）であった。GFP遺伝子はClontech社製品のGFP

発現ベクターである、pEGFP-N2をテンプレートとしてプライマーを設定し、PCRを行って作成し、これを各コンストラクトの目的遺伝子挿入部に挿入して用いた。コントロールとして市販のGFP発現プラスミドpEGFP-N1（Clontech社）を用いた。

コンストラクトNo.15の発現ベクターのSV40 ori+UAS+SV40 enh+intron A+RU5'の領域からなる部分断片の塩基構造を図３８に示し、その塩基配列を配列番号１９に示す。また、コンストラクトNo.16の発現ベクターのSV40 ori+UAS+hTERT enh+intron A+RU5'の領域からなる部分断片の構造を図３９に示し、塩基配列を配列番号２０に示す。さらに、図４０に制限酵素部位を連結したGFPをコードするDNAの塩基配列を示す（配列番号２１）。図３８の塩基配列中の（１）、（２）、（３）及び（４）の枠で囲んだ部分は、それぞれSV40 ori、SV40プロモーター、intron A及びRU5'を示し、図３９の塩基配列中の（１）、（２）、（３）及び（４）の枠で囲んだ部分は、それぞれSV40 ori、hTERTプロモーター、intron A及びRU5'を示す。コンストラクトNo.14の発現ベクターにGFP遺伝子を挿入したベクターの全長塩基配列を図４１-１及び図４１-２（図４１-１の続き）に示す（配列番号２２）。また、コンストラクトNo.15の発現ベクターにGFP遺伝子を挿入したベクターの全長塩基配列を図４２-１及び図４２-２（図４１-１の続き）に示す（配列番号２３）。さらに、コンストラクトNo.16の発現ベクターにGFP遺伝子を挿入したベクターの全長塩基配列を図４３-１及び図４３-２（図４３-１の続き）に示す（配列番号２４）。図４１-１及び図４１-２の塩基配列中の（１）、（２）、（３）及び（４）の枠で囲んだ部分は、それぞれCMViプロモーター（P-CMViRU）、GFP遺伝子、Myc IRES、３つのエンハンサー(pA-3enh）を示し、図４２の塩基配列中の（１）、（２）、（３）及び（４）の枠で囲んだ部分は、それぞれSV40プロモーター（P-SViRU）、GFP遺伝子、Myc IRES、３つのエンハンサー(pA-3enh）を示し、図４３の塩基配列中の（１）、（２）、（３）及び（４）の枠で囲んだ部分は、それぞれhTERTプロモーター（P-TiRU）、GFP遺伝子、Myc IRES、３つのエンハンサー(pA-3enh）を示す。

コンストラクトNo.15はSV40タンパク質が高発現する環境での遺伝子の強発現に有利なプラスミドベクターであり、コンストラクトNo.16は癌細胞中等のhTERTタンパク質が高発現する環境での遺伝子の強発現に有利なプラスミドベクターである。

結果を図４４に示す。図４４A、B、C及びDは、それぞれ市販のGFP発現プラスミド（pEGFP-N1）、コンストラクトNo.14のGFP発現プラスミド、コンストラクトNo.15のGFP発現プラスミド、及びコンストラクトNo.16のGFP発現プラスミドの結果を示す。図中上段のパネルは明視野を示す。図に示すように、CMVプロモーター、SV40プロモーター及びhTERTプロモーターのいずれも、市販のプラスミドと比べて、強いGFP遺伝子発現が認められた。本実施例は、本システム（コンストラクトNo.14のコンストラクト骨格）は、このようにプロモーターを変化させても、遺伝子増強のための使用が可能であることを示す。

実施例３　ヒトエリスロポエチンの発現

ヒトエリスロポエチンを外来遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、HEK293細胞をトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）-HDを用いて行い、24時間後に細胞培養液中のヒトエリスロポエチンをウエスタンブロッティングにより検出した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは実施例１で用いたコンストラクトNo.14（図２０）であり、目的遺伝子（挿入遺伝子）としてヒトエリスロポエチンをコードするDNAを挿入した。図４５に制限酵素部位を連結したヒトエリスロポエチンをコードするDNAの塩基配列を示す（配列番号２５）。コントロールとして、市販の発現プラスミドであるpTracer（登録商標）-EF/V5-His-A（インビトロジェン社）及びpEF6/Myc-His-A（インビトロジェン社）を用い、それぞれのプラスミドの制限酵素サイトEcoR1-Xba1の部位にヒトエリスロポエチンをコードするDNAを挿入した。

ウエスタンブロッティングは、抗6His抗体(MBL社)を用いて行い、トラ

ンスフェクト24時間後の培養液１mLを6Hisアミノ酸でトラップして回収し、回収したタンパク質全量をウエスタンブロッティングに用いた。

結果を図４６に示す。レーン１がpTracer（登録商標）-EF/V5-His-Aを用いて発現させたもの、レーン２がpEF6/Myc-His-Aを用いて発現させたもの、レーン３がコンストラクトNo.14の発現プラスミドを用いて発現させたものを示す。図に示すように、コンストラクトNo.14の発現プラスミドを用いた場合に最も強い発現が認められた。この結果は、本システム（コンストラクトNo.14 のコンストラクト骨格）は、エリスロポエチン等の医薬品、診断薬、あるいは試薬として用いられるタンパク質の生産に、遺伝子増強に基づく量的生産の観点から有用であることを示す。

実施例４　ヒトIgGの発現

ヒトIgG light chain及びヒトIgG heavy chainを目的遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、HEK293細胞をトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）-HDを用いて行い、24時間後に細胞抽出液及び細胞培養液中のヒトIgG light chain及びヒトIgG heavy chainをウエスタンブロッティングにより検出した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは実施例１で用いたコンストラクトNo.14（図２０）であり、目的遺伝子（挿入遺伝子）としてヒトIgG light chain又はヒトIgG heavy chainをコードするDNAを挿入した。図４７に、制限酵素部位を連結したヒトIgG light chain（図４７A）及びヒトIgG heavy chain（図４７B）をコードするDNAの塩基配列を示す（それぞれ、配列番号２６及び配列番号２７）。コントロールとして、市販の発現プラスミドであるpTracer（登録商標）-EF/V5-His-A（インビトロジェン社）及びpEF6/Myc-His-A（インビトロジェン社）を用い、それぞれのプラスミドの制限酵素サイトEcoR1-Xba1の部位にヒトIgG light chain又はヒトIgG heavy chainをコードするDNAを挿入した。

ウエスタンブロッティングは、抗6His抗体(MBL社)を用いて行い、トラ

ンスフェクト24時間後の細胞抽出液（トータルのタンパク質量は10μg）と、培養液１mLを6Hisアミノ酸でトラップして回収し、回収したタンパク質全量を用いた。

結果を図４８に示す。図４８Aがヒト IgG light chainの結果、図４８Bがヒト IgG heavy chainの結果を示す。図４８A、４８B共にレーン１がpTracer（登録商標）-EF/V5-His-Aを用いて発現させたもの、レーン２がpEF6/Myc-His-Aを用いて発現させたもの、レーン３がコンストラクトNo.14を用いて発現させたものを示す。また、細胞抽出液を用いた細胞内発現の結果と、培養液を用いた結果を示す。図に示すように、コンストラクトNo.14を用いた場合に最も強い発現が認められた。この結果は、本システム（コンストラクトNo.14のコンストラクト骨格）は、抗体等の医薬品、診断薬あるいは試薬として用いられるタンパク質の生産に、遺伝子増強に基づく量的生産の観点から有用であることを示す。

実施例５　市販のプラスミドベクターを改変した発現ベクターを用いてのREICタンパク質の発現

ヒトREIC遺伝子を外来遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、HEK293細胞をトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）HDを用いて行い、24時間後に細胞抽出液中のREICタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは、市販のpShuttleプラスミドベクター（Clontech）のXba1-Kpn1の挿入部にREICをコードするDNAを挿入し、さらに該REICをコードするDNAの下流のKpn1-EcoR1の挿入部位に、実施例１で用いたコンストラクトNo.14（図２０）の発現プラスミドの発現遺伝子の下流に存在する３つのエンハンサー（hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサー）をBGH poly A+３つのエンハンサーの形で挿入して構築したコンストラクトNo.17であった（図４９）。コントロールとして、市販のpShuttleプラスミドベクター（Clontech）のXba1-

Kpn1の挿入部にREICをコードするDNAを挿入して構築したベクターを用いた。図５０にREICをコードするDNAを挿入したコンストラクトNo.17の発現ベクターの全塩基配列を示す（配列番号２８）。図５０の塩基配列中の（１）及び（２）の枠で囲んだ部分は、それぞれREICをコードするDNA及び３つのエンハンサー（3xenh)を示す。

ウエスタンブロッティングは、抗REIC抗体を用いて行い、トランスフェクト24時間後の細胞抽出液（トータルのタンパク質量は10μg）を用いた。

結果を図５１に示す。レーン１が外来タンパク質を発現させていない細胞の細胞抽出液の結果、レーン２が市販のpShuttleベクターにREICをコードするベクターでトランスフェクトした細胞の細胞抽出液の結果、レーン３が市販のpShuttleベクターにREICをコードするDNAを挿入し、さらに３つのエンハンサーをREICをコードするDNAの下流（BGH poly Aの下流）に挿入した発現ベクターでトランスフェクトした細胞の細胞抽出液の結果を示す。図に示すように、コンストラクトNo.17を用いた場合に最も強い発現が認められた。この結果は、本システム（コンストラクトNo.14 のコンストラクト骨格）の３つのエンハンサー部分を、pShuttleベクター等の市販のプラスミドの発現遺伝子カセットの下流に組込むことにより、該遺伝子発現の増強が可能になることを示す。すなわち、３つのエンハンサー領域を種々の遺伝子コンストラクトに挿入して目的遺伝子の発現を増強させることが可能であることを示している。

実施例６　市販のプラスミドベクターを改変した発現ベクターを用いてのc-myc遺伝子の発現

ヒトc-mycC遺伝子を目的遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、HEK293細胞をトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）-HDを用いて行い、24時間後に細胞抽出液中のREICタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは、市販のpShuttleプラスミド

ベクター（Clontech）のXba1-Kpn1の挿入部にREICをコードするDNAを挿入し、さらに該REICをコードするDNAの下流のKpn1-EcoR1の挿入部位に、実施例１で用いたコンストラクトNo.14（図２０）の発現プラスミドの発現遺伝子の下流に存在する３つのエンハンサー（hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサー）をBGH poly A+３つのエンハンサーの形で挿入して構築したコンストラクトであった。コントロールとして、市販のpShuttleプラスミドベクター（Clontech）のXba1-Kpn1の挿入部にヒトc-mycをコードするDNAを挿入して構築したベクターを用いた。図５２に挿入したc-myc遺伝子の塩基配列を示し（配列番号２９）、図５３にコンストラクトNo.14に含まれるBGH poly Aと３つのエンハンサーを含む領域の塩基配列（配列番号３０）を示す。

ウエスタンブロッティングは、抗c-mycC抗体（サンタクルーズ社、Cat No.:sc-70469）を用いて行い、トランスフェクト24時間後の細胞抽出液（トータルのタンパク質量は10μg）を用いた。

結果を図５４に示す。レーン１が市販のpShuttleベクターにREICをコードするベクターでトランスフェクトした細胞の細胞抽出液の結果、レーン２が市販のpShuttleベクターにc-mycをコードするDNAを挿入し、さらに３つのエンハンサーをc-mycをコードするDNAの下流（BGH poly Aの下流）に挿入した発現ベクターでトランスフェクトした細胞の細胞抽出液の結果を示す。図に示すように、市販のpShuttleベクターにc-mycをコードするDNAを挿入し、さらに３つのエンハンサーをc-mycをコードするDNAの下流（BGH poly Aの下流）に挿入した発現ベクターを用いた場合に最も強い発現が認められた。この結果は、本システム（コンストラクトNo.14 のコンストラクト骨格）の３つのエンハンサー部分を、pShuttleベクター等の市販のプラスミドの発現遺伝子カセットの下流に組込むことにより、該遺伝子発現の増強が可能になることを示す。すなわち、３つのエンハンサー領域を種々の遺伝子コンストラクトに挿入して目的遺伝子の発現を増強させることが可能であることを示している。本実施例の結果は、本システム（コンストラクトNo.14 のコンストラクト骨格）の３つのエンハンサー部

分を、iPS細胞の作製に用いられるc-myc遺伝子の発現用プラスミドの発現遺伝子カセットの下流に組み込むことにより、c-mycの遺伝子発現が増強されることを示している。iPS細胞は様々な種類の再生医療に有用であると考えられ、すなわち、該エンハンサー部分は、c-mycなどのいわゆるレプログラミング遺伝子のより強い遺伝子発現を可能にする手段として、また発現タンパク質そのものを再生因子としてin vivoあるいはex vivoで使用する手段として、再生医療等に有用であることを示している。

実施例７　プロモーターとしてhTERTを用いた場合の発現増強

GFP(Green fluorescent protein)を外来遺伝子（挿入遺伝子）として含む本発明の発現用カセットを作成し、HEK293細胞をトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）-HDを用いて行い、24時間後に細胞培養液中のGFPをウエスタンブロッティングにより検出した。

用いた発現用カセットのコンストラクトは実施例１で用いたコンストラクトNo.２（図８）並びにコンストラクトNo.18、19、20及び21であった。コンストラクトNo.18、19、20及び21の構造を、それぞれ図５５、５６、５７及び５８に示す。コンストラクトNo.18は、hTERTプロモーターを含む一般的な遺伝子発現ベクターである。hTERTが高発現する環境で、すなわち癌細胞での遺伝子強発現に有利であり、癌細胞特異的遺伝子発現を期待する場合に用いる。しかしながら、その遺伝子発現が極めて微弱であることが、遺伝子治療や、特異な細胞でのタンパク質(医薬)産生等への臨床応用の妨げとなっていた。コンストラクトNo.19はhTERTプロモーターを含む一般的な遺伝子発現ベクター（コンストラクト No.18）の発現遺伝子の上流に、RU5 配列を挿入したプラスミドである。コンストラクトNo.20はhTERTプロモーターを含む一般的な遺伝子発現ベクター（コンストラクトNo.18）のBGH poly A配列の下流に、hTERTエンハンサー配列を挿入したプラスミドである。コンストラクトNo.21はhTERTプロモーターを含む一般的な遺伝子発現ベクター（コンストラクト No.18）の発現遺伝子の上流に、

RU5'配列を挿入し、さらにBGH poly A配列の下流に、hTERTエンハンサー配列を挿入したプラスミドである。図５９-１及び図５９-２（図５９-１の続き）にコンストラクトNo.21の発現ベクターの全塩基配列を示す（配列番号３１）。図５９-１及び図５９-２の塩基配列中の（１）、（２）、（３）、（４）及び（５）の枠で囲んだ部分は、それぞれhTERTコアプロモーター、最小CMVプロモーター（minimal CMV promoter)、RU5'、GFP遺伝子、BGH poly A、hTERTコアプロモーターを示す。

発現の結果を図６０に示す。レーン１が外来タンパク質を発現させていない細胞の細胞抽出液の結果、レーン２～６は、それぞれコンストラクトNo.2、No.18、No.19、No.20及びNo.21を用いて発現させた結果を示す。図に示すように、コンストラクトNo.18、No.19、No.20、No.21及びNo.2の順番で強い発現が認められた。本実施例の結果は、本システム（目的発現遺伝子を、プロモーターとエンハンサーではさむ当該コンストラクトの形）は、癌特異的遺伝子発現を可能とするhTERTプロモーターのような、遺伝子発現能力の極めて弱いプロモーターの、遺伝子発現を著しく増強させるのに有用であることを示している。

実施例８　異なる外来遺伝子を組込んだ複数の発現ベクターを同時トランスフェクトした場合の発現

コンストラクトNo.2（図２０）にDsRed（赤色蛍光タンパク質）をコードするDNAを組込んだプラスミド、コンストラクトNo.21（図５８）にYeast GST（グラタチオンSトランスフェラーゼ）をコードするDNAを組込んだプラスミド、コンストラクトNo.21（図５８）にGFPをコードするDNAを組込んだプラスミドを細胞に同時にトランスフェクトし、発現タンパク質をウエスタンブロットにより分析した。トランスフェクトは、FuGENE（商標）-HDを用いて行った。細胞は、HEK293細胞、Hela細胞、PC3細胞、HepG2細胞、HCT116細胞、MCF7細胞の癌細胞株を用い、さらに正常細胞株としてヒト由来の線維芽細胞であるOUMS-24細胞及びヒト由来のケラチノサイト細胞であるNHK細胞を用いた。トランスフェクトの48時間後に細胞

抽出液中のそれぞれのタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出した。DsRedをコードするDNA及びYeast GSTをコードするDNAは公知のcDNA配列に基づいて人工合成によりcDNAを作製した。

ウエスタンブロッティングは、抗GFP抗体、抗6His抗体（MBL社、6Hisを付加したTelomeraseの検出に使用）、抗tubulin抗体（シグマ社）、抗DsRed抗体(Clontech社)及び抗Yeast GST抗体を用いて行い、トランスフェクト24時間後の細胞抽出液（トータルのタンパク質量は10μg）を用いた。

結果を図６１に示す。図６１に示すようにhTERTプロモーターを含むプラスミドコンストラクト（コンストラクトNo.21）では、種々の癌細胞、正常細胞において、癌細胞のみに特異的な遺伝子発現を行うのに有用である。すなわちこの場合は、癌細胞のみで強く遺伝子が発現され、かつ正常細胞での遺伝子発現を抑制することができる。この点、例えば、CMVプロモーターを含むプラスミドコンストラクト（コンストラクトNo.2）では、ヒト癌細胞・正常細胞のいずれにおいても遺伝子発現が見られ、癌細胞に特異的な遺伝子発現を達成することができない。hTERTプロモーターを含むプラスミドは、このように癌細胞特異的に遺伝子発現を達成できるという点で有用である。

実施例９　本発明の遺伝子発現カセットを含む発現ベクターでトランスフェクトしたHEK293細胞（Human embryonic kidney cell)によるヒトエリスロポエチン（Human EPO)の生産量の検討

ヒトエリスロポエチンを分泌発現させるためにC末端側にHis tagを付加したEPO-His tagのDNA断片を、コンストラクトNo.14のコンストラクトを含むベクター（SGE(Super Gene Expression)ベクターと呼ぶ）及び対照としてpTracer（登録商標）-EFベクター（EF-1αプロモーター、Invitrogen社)にそれぞれ組み込んだ。

ヒトエリスロポエチンの分泌発現の宿主細胞として、対数増殖期にあるヒト腎臓由来細胞：FreeStyle 293-F細胞（Invitrogen社)を5～6×10^5細胞/mLの濃度で125mLフラスコに30mL播種し、37℃、８％CO_2存在下で

Freestyle 293 Expression 1Media （Invitrogen社)を用いて一晩振とう培養(125rpm)した。翌日、1×10^{6}細胞/mLの濃度に調整し、125mLフラスコに30mL播種した293-F細胞に対し、各30μgのSGE - EPO-His tag及びpTracer（登録商標）-EF - EPO-His tagのプラスミドDNAを遺伝子導入試薬：293 Fectin （Invitrogen社)と混合して遺伝子導入を行った。トランスフェクト後４日間、37℃、８％CO_2存在下にて振とう培養し、培養上清を回収した。この培養上清のうち18μLをSDS-PAGEを用いて分離し、CBB染色によって分子量約35kDaの糖鎖付加型のEPOタンパク質を検出した(図６２)。

EPO生産量を見積もるために４日後に回収した培養上清25mL中に分泌されたヒトエリスロポエチンタンパク質をヒスチジン親和性カラムクロマトグラフィー(TALON-Affinity Resin (Clontech社)) を用いて精製し、溶出液をSDS-PAGEを用いて分離し、CBB染色によってEPOタンパク質の純度を確認した(図６３)。さらにこの精製EPOタンパク質のタンパク質量をBradford法により定量し、25mL培養時の精製タンパク質量から、1L培養時に得られるタンパク質量を算出した（図６４A及びB)。この結果、ヒトエリスロポエチンはSGEベクターを用いるとpTracer（登録商標）-EFベクターでの発現量と比較して約8倍量のタンパク質を生産することができ、1Lの培養液に換算すると約150mgの超高効率な発現量を達成した。

実施例１０　本発明の遺伝子発現カセットを含む発現ベクターでトランスフェクトしたHEK293細胞 (Human embryonic kidney cell)によるヒトREIC (Reduced Expression in Immortalized Cells) タンパク質の生産量の検討

実施例１に記載の方法に準じ、293-F細胞を1×10^{6}細胞/mLの濃度に調整し、500mLフラスコに180mL播種したフラスコを３本分準備し、各フラスコへREIC発現SGEベクター（コンストラクトNo.14のコンストラクトを含むベクター）180μgを遺伝子導入試薬：293 Fectin (Invitrogen社)を用いて一過性にトランスフェクトした。トランスフェクト後４日間、37℃、８％CO_2存在下にて振とう培養し、培養上清を回収した。この培養上清18μLを

SDS-PAGEを用いて分離し、CBB染色によって分子量約55kDaの糖鎖付加REICタンパク質を検出した(図６５)。

回収した培養上清は限外濾過により520mLから35mLに濃縮し、Sephadex（商標）G25Mカラムクロマトグラフィー（GEヘルスケア社）を用いて溶媒を20mM Hepes Buffer(pH7.2)へ置換し、REICタンパク質含有画分を回収した。その後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（DEAE-Toyopearl（登録商標）650M, 東ソー)を用いて、タンパク質を吸着させた後、20mM Hepes Buffer(pH7.2)中で、塩化ナトリウムの直線濃度勾配（0～0.7M）により溶出を行い、塩化ナトリウム濃度が0.35M程度の条件で、REICタンパク質のピーク画分を確認した。各ピーク画分をSDS-PAGEで解析し、高純度のREICタンパク質のみで構成される画分を回収した(図６６)。この精製REICタンパク質のタンパク質量を吸光度(280nm)により算出し、さらに520mL培養時の精製タンパク質量から換算することで、１L培養時に得られるタンパク質量を算出した（図６７)。この結果、REIC発現SGEベクターをトランスフェクトした培養上清より高純度の精製タンパク質を約50mg得ることができた。すなわち、１Lの培養液に換算すると約100mgの大容量の精製タンパク質が実際に回収可能なことを証明した。

産業上の利用可能性

本発明の、第１のプロモーターの下流に、発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物を含む、さらに該DNA構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターが連結した、遺伝子の発現用カセットは、細胞の種類、遺伝子の種類、トランスフェクション試薬の種類を問わず、遺伝子発現による発現させようとする目的タンパク質の超高発現による大量生産を実現するものであり、バイオテクノロジーの分野での試薬としての適用のみならず、治療用のタンパク質医薬としての適用や臨床での遺伝子を用いた治療・検査・診断のために幅広い応用が可能である。例えば、（１）従来解析ができなかった未知の遺伝子の特定細胞や組織での機能解析、（２）遺伝子治療においてウイルスのみならず非ウイルスベクタ

一への搭載による治療効果の向上、（３）抗体医薬など近年のバイオ医薬品の生産法として、特定のヒト機能性タンパク質をヒト細胞で大量に生産するスパーセルの作製、（４）各種アッセイや臨床診断に用いる試薬や診断薬の効率的かつ安価な製造法などへの応用など、バイオテクノロジーの領域に革命的進化をもたらすことができる。

本発明の発現用DNAカセットは、バイオテクノロジーの分野での試薬としての適用のみならず、臨床での遺伝子を用いた治療・検査・診断のために幅広い応用が可能である。

配列表フリーテキスト

配列番号１～１６、１９～３１　合成

請求の範囲

1． 第１のプロモーターの下流に発現させようとする遺伝子及びポリA付加配列を含むDNA構築物を含み、さらに該DNA構築物の下流にエンハンサー又は第２のプロモーターを含む、遺伝子の発現用カセット。

2． 連結したエンハンサー又は第２のプロモーターの下流に他の遺伝子発現用の機構を有さず、発現させようとする遺伝子を第１のプロモーター１つとエンハンサー１つで挟むか、又は第１のプロモーター１つと第２のプロモーター１つで挟んだ構造を有する、請求項１記載の発現用カセット。

3． プロモーターがCMV iプロモーター、SV40プロモーター、hTERTプロモーター、βアクチンプロモーター及びCAGプロモーターからなる群から選択されるプロモーターである、請求項１記載の発現用カセット。

4． エンハンサーがCMVエンハンサー、SV40エンハンサー及びhTERTエンハンサーからなる群から選択される少なくとも１つのエンハンサーである請求項１～３のいずれか１項に記載の発現用カセット。

5． さらに、プロモーターの下流に発現させようとするタンパク質をコードするDNA及びポリA付加配列を含むDNA構築物の上流に１～４個のCMVエンハンサーが連結された請求項１～４のいずれか１項に記載の発現用カセット。

6． さらに以下のエレメント(i)～(iii)の少なくともいずれか１つを含む請求項１～５のいずれか１項に記載の発現用カセット：

(i) 外来タンパク質をコードするDNAの直ぐ上流に連結されたRU5’；

(ii) エンハンサー及び／又はプロモーターの直ぐ上流に連結されたUAS；及び

(iii) 発現用カセットの最上流に連結されたSV40-ori。

7． 発現させようとする遺伝子が疾患の治療に用い得る治療用遺伝子、又は医薬、診断薬若しくは試薬に用い得るタンパク質の遺伝子である、請求項１～６のいずれか１項に記載の発現用カセット。

８．　治療用遺伝子が腫瘍の治療に用い得る癌抑制遺伝子であるREIC/Dkk-3遺伝子である、請求項７記載の発現用カセット。

９．　コンストラクトNo.2（図８）、No.4（図１０）、No.6（図１２）、No.8（図１４）、No.10（図１６）、No.12（図１８）及びNo.14（図２０）に示す構造を有する、請求項１記載の外来遺伝子の発現用カセット。

１０．　コンストラクトNo.15（図１６）、No.16（図３７）、No.17（図４９）、No.20（図５７）及びNo.21(図５８）に示す構造を有する、請求項１記載の外来遺伝子の発現用カセット。

１１．　請求項１～１０のいずれか１項に記載の外来遺伝子の発現用カセットを含むベクター。

１２．　アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスベクターである請求項１１記載のベクター。

１３．　請求項１１又は１２に記載のベクターを含む宿主細胞。

１４．　請求項１１又は１２に記載のベクターを含む疾患検出又は治療用製剤。

１５．　請求項１～１０のいずれか１項に記載の発現用カセット又は請求項１１若しくは１２に記載のベクターを用いて発現させようとする遺伝子を発現させる方法。

１６．　請求項１～１０のいずれか１項に記載の発現用カセット又は請求項１１若しくは１２に記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養することを含む、発現させようとする遺伝子がコードするタンパク質を製造する方法。