

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年12月12日(12.12.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/183702 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/065679
- (22) 国際出願日: 2013年6月6日(06.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
61/656,318 2012年6月6日(06.06.2012) US
- (71) 出願人: 学校法人埼玉医科大学(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 三谷 幸之介(MITANI, Kohnosuke); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 片桐 岳信(KATAGIRI, Takenobu); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 菅根 岳史(SONE, Takefumi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 進 正史(SHIN, Masashi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外(HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木1-24-10
- T Sビル4階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: HELPER-DEPENDENT ADENOVIRUS VECTOR, METHOD FOR VISUALIZING MATURE OSTEOBLASTS, AND METHOD FOR PRODUCING MATURE OSTEOBLASTS

(54) 発明の名称: ヘルパー依存型アデノウイルスベクター、成熟骨芽細胞の可視化方法、及び成熟骨芽細胞の製造方法

(57) Abstract: A helper-dependent adenovirus vector in which the first exon base sequence of an osteocalcin gene is substituted by a base sequence containing a reporter gene, and including at least part of the 5' upstream region of the first exon of the osteocalcin gene and at least part of the 3' downstream region of the first exon of the osteocalcin gene; and a method for visualizing and method for producing mature osteoblasts using this helper-dependent adenovirus vector.

(57) 要約: オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの塩基配列が、レポーター遺伝子を含む塩基配列に置換されており、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含むヘルパー依存型アデノウイルスベクター、並びに前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた成熟骨芽細胞の可視化方法及び製造方法である。



WO 2013/183702 A1

明 細 書

発明の名称：

ヘルパー依存型アデノウイルスベクター、成熟骨芽細胞の可視化方法、及び成熟骨芽細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター、並びに前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた、成熟骨芽細胞の可視化方法、及び成熟骨芽細胞の可視化方法に関する。

背景技術

[0002] 骨芽細胞は、未分化間葉系前駆細胞であり、骨形成に特化した細胞である。前記骨芽細胞は、I型コラーゲン (type I collagen)、オステオポンチン (osteopontin)、オステオネクチン (osteonectin)、骨シアロタンパク質 (bone sialoprotein)、及びオステオカルシン (osteocalcin) といった有機的細胞外マトリックスを、石灰化前の骨基質であるオステオイドを形成するために分泌する (例えば、非特許文献1及び2参照)。前記オステオイドの石灰化は、骨芽細胞の細胞膜上に発現されるGPIアンカータンパク質であるアルカリフォスファターゼの酵素活性により誘導される。前記骨芽細胞の骨形成能は、全身ホルモン、局所成長因子、及びサイトカインによって制御されている。転写因子である *osterix* (以下、「Osx」と称することがある) 及び *Runx2* は、胚発生期における骨形成のために必須であることが示されている。

[0003] オステオカルシンは、骨基質における最も豊富な非コラーゲン性タンパク質の1つであり、前記オステオカルシンは、ガンマカルボキシグルタミン酸を介してヒドロキシアパタイトに高い親和性を有している (例えば、非特許文献2参照)。オステオカルシンノックアウトマウスでは、骨形成の増加が見られた (例えば、非特許文献3参照)。オステオカルシンは、骨形成状態

の骨芽細胞において、特異的に発現する唯一の遺伝子であり、前記オステオカルシンは、骨髓腔の骨の表面の立方状の細胞で同定された。骨組織から調製された初代骨芽細胞において、オステオカルシンのmRNAの発現レベルは、骨様結節数の増加と平行して徐々に増加する。骨代謝ホルモンである $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ （以下、「VD3」と称することがある）は、ラット及びヒトのオステオカルシン遺伝子の5'上流側領域に発見されたビタミンD受容体調節エレメント（以下、「VDREs」と称することがある）を介して、ラット及びヒトの骨芽細胞におけるオステオカルシンmRNAの発現を上方制御する（例えば、非特許文献4参照）。そのため、未成熟骨芽細胞や他の種類の細胞と、成熟骨芽細胞とを区別するために、オステオカルシンの発現を成熟骨芽細胞の特異的マーカーとして広く使われている。

[0004] 前記骨芽細胞は、従来、骨組織から酵素消化法などで分離されてきた。しかしながら、前記分離により得られたものの中には、分化や活性化の状態が異なる様々な骨芽細胞や、その前駆細胞などが含まれており、骨形成状態にある成熟骨芽細胞を生きた状態で分取することが求められている。

[0005] 混合細胞群から特定の型の生細胞を分取するための有用な技術として、蛍光表示式細胞分取器（Fluorescence-activated cell sorting、以下「FACS」と称することがある）を用いる方法がある。前記FACSにより生細胞を分取するためには、特異的な表面抗原が必要とされる。しかしながら、成熟骨芽細胞のための特異的な表面抗原は未だ同定されていないという問題がある。また、オステオカルシンが分泌タンパク質であるため、抗オステオカルシン抗体を用いても前記FACSにより成熟骨芽細胞を分取することができず、生きた状態の成熟骨芽細胞を分取する技術は未だ開発されていないのが現状である。

[0006] したがって、生きた状態で成熟骨芽細胞を効率良く分取することができる技術の速やかな開発が強く求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Malaval L, Liu F, Roche P et al. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. J Cell Biochem 1999; 74 (4): 616-27.

非特許文献2: Nefussi JR, Brami G, Modrowski D et al. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. J Histochem Cytochem 1997; 45 (4): 493-503.

非特許文献3: Ducy P, Desbois C, Boyce B et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 1996; 382 (6590): 448-52.

非特許文献4: Paredes R, Arriagada G, Cruzat F et al. Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. Mol Cell Biol 2004; 24 (20): 8847-61.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、成熟骨芽細胞を可視化することができるへ

ルパー依存型アデノウイルスベクター、該ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた成熟骨芽細胞の可視化方法、及び成熟骨芽細胞を生きた状態で分取することができる成熟骨芽細胞の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの塩基配列が、レポーター遺伝子を含む塩基配列に置換されており、

前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、

前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含むことを特徴とするヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<2> 前記<1>に記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、

前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程とを含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の可視化方法である。

<3> 前記<1>に記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、

前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程と、

前記レポーター遺伝子の発現が検出された細胞を分取する工程を含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の製造方法である。

発明の効果

[0010] 本発明によると、従来における前記問題を解決することができ、成熟骨芽細胞を可視化することができるヘルパー依存型アデノウイルスベクター、該ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた成熟骨芽細胞の可視化方法、及び成熟骨芽細胞を生きた状態で分取することができる成熟骨芽細胞の製

造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図 1 は、製造例 1 で製造した本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターの一例の概略説明図である。

[図2A]図 2 A は、試験例 1 の蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。

[図2B]図 2 B は、試験例 1 の F A C S 解析の結果を示す図である。

[図2C]図 2 C は、試験例 1 の V e n u s 遺伝子の定量的 R T - P C R 解析の結果を示す図である。

[図2D]図 2 D は、試験例 1 の内在性オステオカルシン遺伝子の定量的 R T - P C R 解析の結果を示す図である。

[図3A]図 3 A は、試験例 2 において、20 倍の対物レンズを用いて撮影した結果を示す図である。

[図3B]図 3 B は、試験例 2 において、10 倍の対物レンズを用いて撮影した結果を示す図である。

[図4A]図 4 A は、試験例 3 において、製造例 1 で得られたアデノウイルスベクターを用いた場合の F A C S 解析の結果を示す図である。

[図4B]図 4 B は、試験例 3 において、比較製造例 1 で得られたアデノウイルスベクターを用いた場合の F A C S 解析の結果を示す図である。

[図4C]図 4 C は、試験例 3 において、アデノウイルスベクターを用いなかった場合の F A C S 解析の結果を示す図である。

[図4D]図 4 D は、試験例 3 の定量的 R T - P C R 解析の結果を示す図である。

[図4E]図 4 E は、試験例 3 の定量的 R T - P C R 解析の結果を示す図である。

[図5A]図 5 A は、試験例 4 における撮影結果を示す図である。

[図5B]図 5 B は、試験例 4 において、製造例 1 で得られたアデノウイルスベクターを感染させた場合の F A C S 解析の結果を示す図である。

[図5C]図 5 C は、試験例 4 において、比較製造例 2 で得られたアデノウイルス

スベクターを感染させた場合のFACS解析の結果を示す図である。

[図5D]図5Dは、試験例4において、比較製造例3で得られたアデノウイルスベクターを感染させた場合のFACS解析の結果を示す図である。

[図5E]図5Eは、試験例4において、アデノウイルスベクターを感染させなかった場合のFACS解析の結果を示す図である。

[図6]図6は、比較製造例2で製造したE1/E3欠損型アデノウイルスベクターの概略説明図である。

発明を実施するための形態

[0012] (ヘルパー依存型アデノウイルスベクター)

本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの塩基配列が、レポーター遺伝子を含む塩基配列に置換されており、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含み、必要に応じて更にその他の構成を含む。

[0013] <オステオカルシン遺伝子>

前記オステオカルシン(「BGLAP」とも称される)遺伝子は、骨形成状態の骨芽細胞において、特異的に発現する遺伝子である。

前記オステオカルシン遺伝子の種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウスなどが挙げられる。これらの中でも、ヒトが好ましい。

前記オステオカルシン遺伝子の入手方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒトオステオカルシン遺伝子領域のゲノム配列を有するBACクローンから入手することができる。

前記BACクローンの具体例としては、RP11-54H19(BACPAC resources, Children's Hospital & Research Center at Oakland)が挙げられる。

[0014] ー第1エキソンの5' 上流側領域ー

前記第1エキソンの5' 上流側領域としては、少なくとも一部を含んでいれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記第1エキソンの翻訳開始点から3.8 kb (キロ塩基対) 超の領域であることが好ましく、前記第1エキソンの翻訳開始点から10.1 kbまでの領域であることがより好ましい。前記より好ましい領域であると、成熟骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を高めることができ、成熟骨芽細胞をより可視化しやすく、より分取しやすくなる点で、有利である。

前記第1エキソンの翻訳開始点から10.1 kbまでの領域の塩基配列は、ヒトでは、配列番号35で示される。

なお、前記5' 上流側領域を「kb」で表記する場合は、少数第2位を切り上げたものである。前記配列番号35で表される配列を「bp (塩基対)」で表記すると、10,092 bpである。

[0015] ー第1エキソンの3' 下流側領域ー

前記第1エキソンの3' 下流側領域としては、少なくとも一部を含んでいれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記第1エキソンの終わりから8.8 kbまでの領域であることが好ましい。前記好ましい領域であると、成熟骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を高めることができ、成熟骨芽細胞をより可視化しやすく、より分取しやすくなる点で、有利である。

前記第1エキソンの終わりから8.8 kbまでの領域の塩基配列は、ヒトでは、配列番号36で示される。

なお、前記3' 下流側領域を「kb」で表記する場合は、少数第2位を切り上げたものである。前記配列番号36で表される配列を「bp」で表記すると、8,758 bpである。

[0016] <レポーター遺伝子を含む塩基配列>

前記レポーター遺伝子を含む塩基配列は、レポーター遺伝子を少なくとも含み、更に必要に応じてその他の塩基配列を含む。

前記レポーター遺伝子を含む塩基配列の位置としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部との間に位置することが好ましい。

[0017] −レポーター遺伝子−

前記レポーター遺伝子としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、蛍光タンパク質遺伝子が好ましい。

前記蛍光タンパク質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、YFP、GFP、CFP、などが挙げられる。これらの中でも、GFPの1種であるVenusが、蛍光発光の速さと強さの点で、好ましい。

前記レポーター遺伝子の入手方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記レポーター遺伝子を有するプラスミドから入手することができる。

前記Venus遺伝子を有するプラスミドの具体例としては、pCS2-Venus（理化学研究所）が挙げられる。

[0018] −その他の塩基配列−

前記その他の塩基配列としては、本発明の効果を損なわない限り特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、抗生物質耐性遺伝子の塩基配列、pA付加配列、部位特異的組換え配列、プロモーター配列などが挙げられる。前記その他の塩基配列は、前記抗生物質耐性遺伝子の塩基配列を含むことが好ましい。

[0019] 前記抗生物質耐性遺伝子としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。

[0020] 前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、ヘルパー依存型アデノウ

イルスとして増幅されウイルス粒子内に封入されるために必要な構成として、両末端の末端逆位配列（ITR）と、パッケージングシグナルとを含む。

[0021] <その他の構成>

前記その他の構成としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子の配列、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の配列などが挙げられる。

[0022] <ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの製造方法>

前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの製造方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択して製造することができる

本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターには、プラスミドの態様、ウイルス粒子の態様のいずれもが含まれる。

[0023] 前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドの製造方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、大腸菌内の相同組換えを基盤としたRed/E_T組換え法（「Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (12): 6640-5.」参照）を用いる方法が挙げられる。

以下、前記Red/E_T組換え法を用いた本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドの製造方法の一例を説明する。

[0024] まず、レポーター遺伝子を有するプラスミドの前記レポーター遺伝子のpA付加配列の後ろに、部位特異的組換え標的配列を前後に配置した真核生物プロモーター-原核生物プロモーター（以下、真核生物プロモーターと、原核生物プロモーターとをまとめて「プロモーター」と称することがある）-抗生物質体制遺伝子-pA付加配列の発現カセット（部位特異的組換え標的配列-プロモーター-抗生物質耐性遺伝子-pA-部位特異的組換え標的配列カセット）を挿入し、レポーター遺伝子-pA-部位特異的組換え標的配

列—プロモーター—抗生物質耐性遺伝子—pA—部位特異的組換え標的配列カセットを有するプラスミドを作製する。

前記真核生物プロモーターとしては、低レベルの恒常的発現プロモーターであれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、SV40プロモーター、 β -アクチンプロモーター、PGK（ホスホグリセレートキナーゼ）プロモーターなどが挙げられる。

前記原核生物プロモーターは、前記Red/E_T法を行なう場合のクローン選択に用いるものであり、例えば、bla（ β ラクタマーゼ）プロモーター、EM7プロモーターなどが挙げられる。

前記部位特異的組換え標的配列は、抗生物質耐性遺伝子カセットを後から除去するためのものであり必ずしも必須ではないが、適宜選択して用いることができ、例えば、FRT配列、loxP配列などが挙げられる。

[0025] 次いで、前記レポーター遺伝子—pA—部位特異的組換え標的配列—プロモーター—抗生物質耐性遺伝子—pA—部位特異的組換え標的配列カセットを有するプラスミドを鋳型とし、PCRにより、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの開始コドン領域に相同な40塩基対程度ずつの相同腕を両側に付加したレポーター遺伝子—pA—部位特異的組換え標的配列—プロモーター—抗生物質耐性遺伝子—pA—部位特異的組換え標的配列カセットを増幅する。

前記増幅したカセットは、大腸菌内での相同組換えにより、前記BACクローンにコードされたオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの開始コドンの位置に挿入される。

[0026] 更に、PCR増幅によって目的とするオステオカルシン遺伝子領域の位置に相同な40塩基対程度の相同腕を付加した直鎖化クローニングベクターを用いて、大腸菌内の相同組換えによって、導入発現カセットを含むオステオカルシン遺伝子領域を回収する。

[0027] 前記回収した導入発現カセットを含むオステオカルシン遺伝子領域を、ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドにサブクローニングする。

前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、pAMHDA dGT8-4 (「Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y et al. Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-dependent Adenoviral Vectors. Mol Ther 2011; 20 (2): 424-31.」参照)、pCIHDA dGT8-3などが挙げられる。

[0028] 前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターのウイルス粒子の製造方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、前記部位特異的組換え標的配列としてFRT配列を用いた場合には、Cre組換え酵素を恒常的に発現する116細胞 (Palmer D, Ng P. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Mol Ther 2003; 8 (5): 846-52. 参照) に直鎖化した前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドを導入し、更に、パッケージングシグナルが2つのloxP配列に挟まれているヘルパーウイルスを感染させることで、ウイルス粒子を製造することができる。

また、例えば、前記部位特異的組換え標的配列としてloxP配列を用いた場合には、FLPe組換え酵素を恒常的に発現する293FLPe細胞に直鎖化した前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドを導入し、更に、パッケージングシグナルが2つのFRT配列に挟まれているヘルパーウイルスを感染させることで、ウイルス粒子を製造することができる。

前記プラスミドの導入方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、リポフェクション法などが挙げられる。

前記プラスミドを直鎖化する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて

て適宜選択することができ、例えば、制限酵素を用いる方法などが挙げられる。

前記パッケージングシグナルが2つのLoxP配列に挟まれているヘルパーウイルスとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、AdNG163R-2 (Dr. Phillip Ng (Baylor College of Medicine)、AdNG163などが挙げられる。

前記パッケージングシグナルが2つのFRT配列に挟まれているヘルパーウイルスとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、FL helperなどが挙げられる。

[0029] 本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターの好ましい態様としては、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの翻訳開始点から5'上流側に10.1kbまでの領域の配列と、レポーター遺伝子であるVenus遺伝子配列と、pA付加配列と、FRT配列と、PGKプロモーター配列と、EM7プロモーター配列と、ネオマイシン耐性遺伝子配列と、pA付加配列と、FRT配列と、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの終わりから3'下流側に8.8kbまでの領域の配列とをこの順に含む態様が好ましい。

[0030] 本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、オステオカルシン遺伝子領域にレポーター遺伝子を挿入したことにより、前記レポーター遺伝子がオステオカルシン遺伝子領域の制御のもとで発現される。本発明では、前記オステオカルシン領域として、第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含むことにより、後述する試験例に示すように、前記レポーター遺伝子が、よりオステオカルシン遺伝子領域の制御を受けて発現されていると考えられる。

本発明では、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いているため、様々な細胞に適用することができ、また、一過性の発現であるという利点を有する。

そのため、後述する骨を形成している状態である成熟骨芽細胞の可視化方

法、成熟骨芽細胞の製造方法に好適に用いることができる。また、転写調節の研究にも好適に用いることができる。

[0031] (成熟骨芽細胞の可視化方法)

本発明の成熟骨芽細胞の可視化方法は、感染工程と、検出工程とを少なくとも含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

[0032] <感染工程>

前記感染工程は、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程である。

前記感染工程に用いるヘルパー依存型アデノウイルスベクターの態様は、ウイルス粒子の態様が好ましい。

[0033] -骨芽細胞-

前記骨芽細胞の種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記骨芽細胞の調製方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、骨組織から酵素消化法などで分離する方法が挙げられる。

前記骨芽細胞の培養培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、50 U/mLのストレプトマイシン、及び50 μ g/mLのペニシリンを含む10% FCS含有 α MEMなどが挙げられる。

前記骨芽細胞の培養条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、5% CO₂、37°Cで培養し、培地を48時間ごとに交換するなどが挙げられる。

前記培養により、初代骨芽細胞では、1週間から2週間で骨様結節が形成される。

[0034] -感染-

前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば

、「Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (37) : 13781-6.」を参照して行うことができる。

[0035] 前記感染における感染倍率 (MOI) としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、物理力価で1,000~10,000とすることが、感染効率60%以上を達成しつつ細胞毒性を防ぐことができる点で、好ましい。

[0036] 前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの力価の調整方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択して調整することができる。

前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの力価の測定方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択することができ、例えば、X-gal染色によって感染力価を測定し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによって物理力価を測定する方法が挙げられる (「Palmer DJ, Ng P. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material. Mol Ther 2004; 10 (4) : 792-8.」参照)。

[0037] <検出工程>

前記検出工程は、前記感染工程で感染した骨芽細胞における前記レポーター遺伝子の発現を検出する工程である。

[0038] -検出-

前記レポーター遺伝子の発現を検出する手段としては、特に制限はなく、

目的に応じて適宜選択することができ、例えば、FACS（BD Biosciences社製）、蛍光顕微鏡（オリンパス社製）などが挙げられる。

本発明の可視化方法によれば、レポーター遺伝子の発現を検出することにより、骨形成状態である成熟骨芽細胞を可視化することができる。

[0039] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0040] （成熟骨芽細胞の製造方法）

本発明の成熟骨芽細胞の製造方法は、感染工程と、検出工程と、分取工程とを少なくとも含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

[0041] <感染工程>

前記感染工程は、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程であり、上述の成熟骨芽細胞の可視化方法における感染工程と同様に行うことができる。

[0042] <検出工程>

前記検出工程は、前記感染工程で感染した骨芽細胞における前記レポーター遺伝子の発現を検出する工程であり、上述の成熟骨芽細胞の可視化方法における検出工程と同様に行うことができる。

[0043] <分取工程>

前記分取工程は、前記検出工程でレポーター遺伝子の発現が検出された細胞を分取する工程である。

[0044] ー分取ー

前記レポーター遺伝子の発現が検出された細胞を分取する手段としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、FACS（BD Biosciences社製）などが挙げられる。

本発明の製造方法によれば、骨形成状態である成熟骨芽細胞を生きた状態で分取することができる。

[0045] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

実施例

[0046] 以下、本発明の製造例、試験例を説明するが、本発明はこれらの製造例、試験例に何ら限定されるものではない。

[0047] (細胞培養)

以下の各製造例、比較製造例、及び試験例における細胞の培養は、以下のように行った。

<116細胞>

116細胞 (Palmer D, Ng P. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Mol Ther 2003; 8 (5) : 846-52. 参照、Dr. Phillip Ng (Baylor College of Medicine) より入手) は、10%FCS (MP Biomedicals社製) 含有のMEM (ナカライテスク社製) で培養した。

前記116細胞は、Creリコンビナーゼを発現するヒト胎児腎臓293細胞株である。

[0048] <ヒト骨肉腫MG-63細胞>

ヒト骨肉腫MG-63細胞 (Billiau A, Edy VG, Heremans H et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. Antimicrob Agents Chemother 1977; 12 (1) : 11-5. 参照、東北大学加齢医学研究所付属医用細胞資源センターより入手) は、1mMのピルビン酸ナトリウム (シグマ-アルドリッチ社製)、及び1×非必須アミノ酸 (シグマ-アルドリッチ社製) を含む10%FCS含有のMEM (ナカライテスク社製) で培養した。

[0049] <293A細胞>

接着293細胞株である293A (Life Technologies社より入手) は、10%FCS含有のDMEM (ナカライテスク社製) で培養した。

[0050] (製造例1:ヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1)

ヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1 (以下、「HDA d-hOC-Venus」と称することがある、約30kb) は、ヒトオステオカルシン (「BGLAP」とも称する) 遺伝子領域のゲノム配列を有するBACクローン (RP11-54H19、BACPAC resources, Children's Hospital & Research Center at Oaklandより入手) を元に、大腸菌内の相同組換えを基盤としたRed/ET組換え法 (「Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (12):6640-5.」参照) により改変することで作製した。

[0051] まず、レポーター遺伝子である蛍光タンパク質Venusを有する発現プラスミドであるpCS2-Venus (理化学研究所 Dr. Atsushi Miyawakiより入手、「Nagai T, Ibata K, Park ES et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol 2002; 20 (1):87-90.」参照) のNotI部位 (前記蛍光タンパク質Venus遺伝子のpA付加配列の後ろ) に、酵母由来の部位特異的組換え標的配列であるFRT配列を前後に配置したPGKプロモーター-EM7プロモーター-ネオマイシン耐性遺伝子-pA付加配列

の発現カセット（FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRTカセット）を挿入し、Venus-pA-FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRTカセットを有するプラスミドを得た。

[0052] 次いで、前記Venus-pA-FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRTカセットを有するプラスミドクローンを鋳型とし、40ヌクレオチドの標的アームを有するプライマー（表1の配列番号1及び2）を用いてPCRにより増幅し、オステオカルシン遺伝子開始コドン領域に相同な40塩基対ずつの相同腕を両側に付加したVenus-pA-FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRTカセットを増幅した。前記増幅したカセットは、大腸菌内での相同組換えにより前記BACクローンにコードされたオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの開始コドンの位置に挿入された（図1のA～C参照）。

[0053] 更に、pBR322プラスミドベクター（「Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. : Gene, 1977; 2 (2) : 95-113.」参照）を鋳型とし、表1の配列番号3及び4のプライマーを用いたPCR増幅によって作製した、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域10.1kbと3'下流側領域8.8kbの位置に相同な40塩基対の相同腕を付加した直鎖化プラスミドベクター断片を用いて、大腸菌内の相同組換えによって、導入発現カセットを含むオステオカルシン遺伝子領域（5'上流側領域10.1kb（配列番号：35参照（10,092bp））-Venus-pA-FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRT-3'下流側領域8.8kb（配列番号：36参照（8,758bp））を回収した。

なお、前記5'上流側領域10.1kbには、Runx2、Vitamin D receptor結合配列が含まれる。

[0054] [表1]

	Sequence
配列番号 1	<i>CAGCTGAGTCCTGAGCAGCAGCCCAGCGCAGCCACCGAGACACC</i> <i>GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC</i>
配列番号 2	<i>AGGGCAGAGCTGGGGCAAATGGATTGAGCCCTGCAACAAGGTGGT</i> <i>GATATCTTTTCGAATTACCCTGTTATCCCTAGGC</i>
配列番号 3	<i>TGGATGCAAATCTCTCATCTAAGCACGAGTCACCGAGGATGGT</i> <i>GTCGACAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGA</i>
配列番号 4	<i>GCCCTGGAAGCTGGCCCTGGAGACATATGGGGAGCAGGCAAAGG</i> <i>GTCGACGCCCTGCACCAATTATGTTCC</i>

表1の配列中、斜体の文字は、付加配列であり、ターゲットDNAとはハイブリダイズしないものを示し、下線部は、制限酵素の認識部位を示す。

[0055] 前記回収した導入発現カセットを含むオステオカルシン遺伝子領域（合計21.4 kb）を、ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドであるpAMHDA dGT8-4（「Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y et al. Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-dependent Adenoviral Vectors. Mol Ther 2011; 20 (2): 424-31.」参照）にサブクローニングした（図1のD参照）。

[0056] 得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミド（以下、「pAMHDA dGT-hOC-Venus」と称することがある）は、制限酵素PmeIで直鎖化し、大腸菌P1ファージ由来のCre組換え酵素を恒常的に発現する293細胞である116細胞にリポフェクション法によって一過性導入した。

前記細胞に、更に、パッケージングシグナルを2つのloxP配列に挟まれているため116株ではパッケージングを受けないヘルパーウイルスAdNG163R-2（Dr. Phillip Ng (Baylor College of Medicine) より入手）を感染させることで、前記

ヘルパー依存型アデノウイルスベクターのみをアデノウイルスにパッケージングさせた (図1のE参照、「Palmer D, Ng P. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Mol Ther 2003; 8 (5): 846-52.」参照)。

[0057] 図1中、「A」は、40ヌクレオチドの相同腕を有するプライマーを用いることにより増幅された、Venus-pA-FRT-PGK-EM7-neo-pA-FRTカセットの2.6kbのPCRフラグメントを示す。「ATG」は、翻訳開始コドンを示す。

図1中、「B」は、BACクローン「RP11-54H19」におけるヒトオステオカルシン遺伝子領域を示す。「VDRE」は、ビタミンD受容体調節エレメントを示す。

図1中、「C」は、Red/E_T相同組換えにより、Venus遺伝子が挿入されたヒトオステオカルシン遺伝子領域を示す。

図1中、「D」は、前記マーカーカセットを含む合計21.4kbの配列をpAMHDA dGT8-4にサブクローニングすることにより構築され、直鎖化したpAMHDA d-hOC-Venusベクターを示す。「5' upstream」は、10.1kbのヒトオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域を示す。「3' downstream」は、8.8kbのヒトオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域を示す。「LacZ」は、マウスサイトメガロウイルスのプロモーターと、SV40のpAとを有するβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を示す。「TK」は、「前記オステオカルシン遺伝子と逆向きにプロモーターとpAシグナルとを有するヘルペスシンプレックスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子」を示す。「両末端の矢印」は、アデノウイルスベクターの末端逆位配列(ITR)を示す。

図1中、「E」は、パッケージ化された状態の模式図である。

[0058] ウイルス液の力価の調整

得られたウイルス液は、ベクター骨格に含まれる *lacZ* 遺伝子の活性を用いた X-gal 染色によって感染力価を測定し、それに応じてヘルパーウイルス（前記 AdNG163R-2）を加えて更に 116 株に再感染させることで増幅した。4 次ウイルス液の段階で塩化セシウム密度勾配遠心によってバンドとして回収し、透析した。このウイルス濃縮液は、X-gal 染色によって感染力価を測定し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによって物理力価を測定した（「Palmer DJ, Ng P. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material. Mol Ther 2004; 10 (4): 792-8.」参照）。その結果、約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ の物理力価のウイルス濃縮液が得られた。

[0059]（比較製造例 1：ヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2）

恒常的に蛍光タンパク質 Venus を発現するコントロールベクター（以下、「HDA-CAG-Venus」と称することがある）として、ヘルパーウイルスとして AdNG163 を用いて 116 細胞でパッケージされた HDA-Venus-geo（ β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）-TK を用いた（Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (37): 13781-6. 参照）。

[0060] -ウイルス液の力価の調整-

前記製造例 1 と同様にして、約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ の物理力価のウイ

ルス濃縮液を得た。

[0061] (比較製造例2：E1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1)

E1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1 (約35 kb)として、ヒトオステオカルシン遺伝子領域の第1エキソンの翻訳開始点から5'上流側領域の3.8 kbまでのプロモーター (配列番号：37参照 (3,722 bp)) に蛍光タンパク質遺伝子であるVenus遺伝子を連結したベクターを以下のようにして製造した。

前記ヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミド (pAMHDA dGT-hOC-Venus) を制限酵素HindIIIとNotIで消化して、アガロースゲル電気泳動を行ない、ヒトオステオカルシン遺伝子領域の第1エキソンの翻訳開始点から5'上流側領域の3.8 kbと、Venus遺伝子と、pA付加配列とを含む4.7 kbの断片を切り出して、クローニング用プラスミドベクターであるpShuttle (「He TC, Zhou S, da Costa LT et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (5):2509-14.」参照) の制限酵素HindIIIとNotI制限酵素サイトにライゲーション反応によって挿入した。こうして得られた前記シャトルベクタープラスミド (以下、「pShuttle-hOC3.8-Venus」と称することがある、11.2 kb) を制限酵素PmeIで消化して直鎖状とし、E1/E3欠損型アデノウイルスベクタープラスミドであるpAdEasy-1 (前記pShuttleの文献参照、アジレント・テクノロジー社より入手) を保持する大腸菌株であるBJ5183-AD-1 (アジレント・テクノロジー社より入手) に導入することで、両プラスミドの相同配列間で相同組換えを起させることで、ヒトオステオカルシン遺伝子5'上流側領域の3.8 kbとVenus遺伝子とを保持するE1/E3欠損型アデノウイルスベクタープラスミド (以下、「pAdEasyShuttle-hOC3.8-Venus

」と称することがある)を得た。前記E1/E3欠損型アデノウイルスベクタープラスミドを制限酵素PacIで消化することによって直鎖化し、293A細胞にリポフェクション法で一過性導入することで、アデノウイルスとしてパッケージングした。

図6に、E1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1の概略図を示す。図6中、「Ad5 (Δ E1/3)」は、E1遺伝子及びE3遺伝子を欠損させた5型アデノウイルスのゲノム配列を示し、「Venus」は、蛍光タンパク質Venus遺伝子を示し、「 Ψ 」は、パッケージングシグナルを示し、「両末端の矢印」は、アデノウイルスベクターの末端逆位配列(ITR)を示す。

[0062] ウイルス液の力価の調整

ウイルス液の感染力価を293A細胞への感染時に観察される細胞変性効果(CPE(Cytopathic Effect))によって評価し、293A細胞をほぼ100%細胞変性させる最低限度の量のウイルス液を293A細胞に感染させながら、ウイルスを増幅し、前記製造例1と同様に精製して、約 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ の物理力価のウイルス濃縮液を得た。

[0063] (比較製造例3: E1/E3欠損型アデノウイルスベクター-2)

恒常的に蛍光タンパク質GFPを発現するコントロールベクターを以下のようにして製造した。

比較製造例2で用いたAdEasy法のコントロール用のシャトルベクタープラスミドとして、CMVプロモーターにより蛍光タンパク質遺伝子EGFPを発現するpAdTrack(前記比較製造例2に記載のpShuttleの文献参照)を同方法によって、pAdEasy-1に組み込んで構築したコントロール用E1/E3欠損型アデノウイルスベクタープラスミド(以下、pAdEasyTrackと称する)を、比較製造例2のアデノウイルスベクターと同様に直鎖化して293A細胞に導入し、アデノウイルスとしてパッケージングした。

[0064] ウイルス液の力価の調整

前記比較製造例2と同様にして、約 1×10^{11} ～ 1×10^{12} の物理力価のウイルス濃縮液を得た。

[0065] (試験方法)

以下の各試験例では、以下のようにして試験した。

[0066] <初代骨芽細胞の調製、及び骨様結節の形成>

—初代骨芽細胞の調製—

マウスの初代骨芽細胞（以下、「POB」と称することがある）は、「Ohyama Y, Nifuji A, Maeda Y et al. Spaciotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. Endocrinology 2004; 145 (10):4685-92.」、及び「Nefussi JR, Brami G, Modrowski D et al. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. J Histochem Cytochem 1997; 45 (4):493-503.」を参照し、以下のようにして調製した。

[0067] マウス近交系統C57BL/6J Jc1（日本クレア社製）の新生児から頭蓋骨の頭頂部を取り出した。前記頭頂部を、0.1%のコラゲナーゼ（和光純薬工業株式会社製）と、0.2%のディスパーゼ（合同酒精株式会社製）を含む1×リン酸緩衝液（以下、「PBS」と称することがある）によって37℃で10分間消化した後、1×PBSで洗う処理を5回繰り返した。

1回目の洗浄物は、大部分が線維芽細胞であるため捨て、2回目以降の洗

浄物を初代骨芽細胞として用いた。

[0068] ー骨様結節の形成ー

前記初代骨芽細胞は、50 U/mLのストレプトマイシン（ライフテクノロジーズ社製）、及び50 μ g/mLのペニシリン（ライフテクノロジーズ社製）を含む10% FCS含有 α MEM（ライフテクノロジーズ社製）で懸濁し、ゼラチンコートした6ウェルプラスチックディッシュ（Griener社製）では 2.0×10^6 個/ウェルの密度で播種し、8ウェルスライドチャンバー（イワキ社製）では 3.2×10^5 個/ウェルの密度で播種し、5% CO₂、37°Cで培養した。

骨様結節が形成されるまで1週間から2週間の間、培地を48時間ごとに交換した。

[0069] <MG-63細胞、又は初代骨芽細胞へのウイルスの感染>

ーMG-63細胞へのウイルス感染ー

MG-63細胞へのウイルス感染は、「Suzuki K, Mitsu i K, Aizawa E et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (37):13781-6 .」を参照し、以下のようにして行った。

[0070] 感染前日、MG-63細胞を12ウェルプレートに播種した。

感染当日、前記培地をMg²⁺及びCa²⁺を含有する1×PBS（以下、「PBS（++）」と称することがある）200 μ Lに交換し、その後、アデノウイルスベクターを物理力価で感染倍率（以下、「MOI」と称することがある）が10,000となるように前記PBS（++）で希釈して加えた。

室温で1時間インキュベートした後、10% FCSを含有する培地を加え

た。

なお、前記比較製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2では、前記MOIで99%の細胞が形質導入された。

[0071] $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ の投与-

オステオカルシンプロモーターの効果を調べる試験では、アデノウイルスベクターを感染させた細胞を含む培養物に、 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ (シグマアルドリッチ社製、以下「VD3」と称することがある)を終濃度が、0 nM、1 nM、10 nM、又は100 nMとなるように加え、培養した。

[0072] 初代骨芽細胞へのウイルス感染-

前記初代骨芽細胞へのウイルス感染は、「Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (37):13781-6.」を参照し、以下のようにして行った。

[0073] 前記「骨様結節の形成」により骨様結節が形成された初代骨芽細胞の培地を除き、元の培地量の1/4量のPBS(++)と、アデノウイルスベクターとを物理力価でMOIが1,000となるように加え、常温で1時間緩やかに振とうしつつ感染させた。

1時間後、6ウェルプラスチックディッシュでは2.0 mL、8ウェルスライドチャンバーでは250 μ Lの培地を加えて一晩5%CO₂、37°Cで培養した後、培地交換した。

なお、前記比較製造例1で製造した恒常的発現プロモーターを持ったヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2を同じくMOI 1,000で用いたところ、感染2日後に蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の発現が確認された。なお、前記比較製造例1で製造したヘルパー依存型アデノウイルスベクタ

— 2 では、前記 MO1 で 60% の細胞が形質導入された。

[0074] < 蛍光免疫抗体染色 >

前記アデノウイルスベクターによる蛍光タンパク質の発現と、内在性オステオカルシンの発現とを比較するために、以下のようにして、蛍光免疫抗体染色を行った。

前記 8 ウェルスライドチャンバーでウイルス感染された骨様結節を形成した初代骨芽細胞は、ウイルス感染後 3 日目に培地を除き、1 × PBS で 2 回洗浄後、10 分間 10% ホルマリン溶液で固定された。

次いで、更に 1 × PBS で 2 回洗浄後、ブロッキング溶液（10% ヤギ血清、及び 0.3% Triton-X 100 を含む PBS）で 1 時間ブロッキングを行った後、1 次抗体として 1 : 100 希釈した抗オステオカルシン抗体（LSL 社製 LB-4005、ウサギ、ポリクローナル）と 2 時間、常温で反応させた。

その後、PBST で 2 回洗浄した後、2 次抗体として 1 : 200 希釈した Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体（ライフテクノロジーズ社製）と 2 時間、常温で反応させた。

その後、PBST で 2 回洗浄した後、DAPI（4', 6-diamidino-2-phenylindole）入り封入剤（ProLong Gold antifade reagent、ライフテクノロジーズ社製）で封入し、蛍光顕微鏡 IX81（オリンパス社製）で観察した。

[0075] < FACS 解析及び細胞分取 >

蛍光タンパク質を発現している細胞（以下、「蛍光タンパク質陽性細胞」と称することがある）を分取するために FACS 解析及び細胞分取を行った。

初代骨芽細胞、又は、前記アデノウイルスベクターで感染させた細胞を 2 日間培養した。ウイルス感染後 3 日目に PBS で 2 回洗浄後、0.05% Trypsin-EDTA（ナカライテスク社製）で剥がし、PBS に懸濁後に遠心し、FACS 緩衝液（2% FBS、及び 2 mM EDTA を含む P

BS) に懸濁した。

FACS解析は、FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences社製) を用いて行った。

細胞の分取は、FACSAria II flow cytometer (BD Biosciences社製) を用いて行った。なお、細胞の分取の前に、細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、死細胞を排除した。前記分取した細胞は、遠心により沈殿させた後、FACSバッファーに再懸濁させ、2回目のフローサイトメーターを行うことにより純度をチェックした。なお、感染させていない培養物を蛍光のバックグラウンドレベルの設定のために用いた。

[0076] <定量的RT-PCR解析>

定量的RT-PCRのためのRNAの抽出、及びcDNAの合成は、「Kokabu S, Nojima J, Kanomata K et al. Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad dephosphorylation. J Bone Miner Res 2010; 25 (3) : 653-60.」、及び「Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105 (37) : 13781-6.」を参照して行った。

[0077] 全RNAは、RNease Mini Kit (キアゲン社製) を用い、カラム上でのDNase処理も行ない、調製した。

前記全RNAの逆転写反応には、PrimeScript 1st st

rand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社製) を用い、cDNAを合成した。

[0078] RT-PCR反応は、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems社製) を使用し、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems社製) で解析した。なお、前記解析は、それぞれ3回 (n=3) 行った。

前記cDNAを段階希釈したサンプルで検量線を作製し、相対定量法によって相対定量値を求めた。

[0079] 前記RT-PCR反応を行った骨芽細胞マーカー等の遺伝子 (以下、「ターゲット」と称することがある)、及びプライマーの配列番号は、以下のとおりである。なお、各プライマーの配列は、表2にも示した。

(1) ターゲット : Venus cDNA

プライマー : 配列番号5 (「Venus_GFP_F」と称することがある。)

配列番号6 (「Venus_GFP_R」と称することがある。)

(2) ターゲット : ヒトglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA

プライマー : 配列番号7 (「RT-GAPDH-Fw2」と称することがある。)

配列番号8 (「RT-GAPDH-Rv2」と称することがある。)

(3) ターゲット : ヒトオステオカルシン cDNA

プライマー : 配列番号9 (「hBGLP-f2」と称することがある。)

配列番号10 (「hBGLP-r2」と称することがある。)

(4) ターゲット : マウスglyceraldehyde 3-ph

osphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA

プライマー : 配列番号11 (「Gapdh F」と称することがある。)

配列番号12 (「Gapdh R」と称することがある。)

(5) ターゲット : マウスオステオカルシン cDNA

プライマー : 配列番号13 (「mOG1-f2」と称することがある。)

配列番号14 (「mOG1-r2」と称することがある。)

(6) ターゲット : マウスOsx cDNA

プライマー : 配列番号15 (「Osx F」と称することがある。)

配列番号16 (「Osx R」と称することがある。)

(7) ターゲット : マウス type I collagen a1 chain (Col1a1) cDNA

プライマー : 配列番号17 (「Col1a1 F」と称することがある。)

配列番号18 (「Col1a1 R」と称することがある。)

(8) ターゲット : マウス type I collagen a2 chain (Col1a2) cDNA

プライマー : 配列番号19 (「Col1a2 F」と称することがある。)

配列番号20 (「Col1a2 R」と称することがある。)

(9) ターゲット : マウス Runx2 cDNA

プライマー : 配列番号21 (「Runx2 F」と称することがある。)

配列番号22 (「Runx2 R」と称することがある。)

(10) ターゲット : マウスalkaline phosphatase (ALP) cDNA

プライマー : 配列番号23 (「Alp F」と称することがある。)

配列番号24 (「Alp R」と称することがある。)

(11) ターゲット : マウスparathyroid hormone receptor (Pth1r) cDNA

プライマー : 配列番号25 (「Pth1r F」と称することがある。)

配列番号26 (「Pth1r R」と称することがある。)

(12) ターゲット : マウスbone sialoprotein (BSP) cDNA

プライマー : 配列番号27 (「Bsp F」と称することがある。)

配列番号28 (「Bsp R」と称することがある。)

(13) ターゲット : マウスsecreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC; オステオネクチンとも称する) cDNA

プライマー : 配列番号29 (「Sparc F」と称することがある。)

配列番号30 (「Sparc R」と称すること

がある。)

(14) ターゲット : マウス *osteoprotegerin* (OPG)
cDNA

プライマー : 配列番号31 (「Opg F」と称することがあ
る。)

配列番号32 (「Opg R」と称することがあ
る。)

(15) ターゲット : マウス *RANKL* cDNA

プライマー : 配列番号33 (「Rankl F」と称すること
がある。)

配列番号34 (「Rankl R」と称すること
がある。)

[0080]

[表2]

	Sequence
配列番号 5	TGCTGCTGCCCCGACAACCACT
配列番号 6	GCGGCGGTCACGAACTCCA
配列番号 7	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
配列番号 8	GCCCCACTTGATTTGGAG
配列番号 9	CCTCACACTCCTCGCCCTA
配列番号 10	CTTGGACACAAAGGCTGCAC
配列番号 11	CTCCACTCACGGCAAATTCAAC
配列番号 12	CGCTCCTGGAAGATGGTGTG
配列番号 13	CATCTTTCCTGCTCACTCTGC
配列番号 14	CTTGGACATGAAGGCTTTGTC
配列番号 15	CCTCTCGACCCCGACTGCAGATC
配列番号 16	AGCTGCAAGTCTCTGTAACCATGAC
配列番号 17	CAGGGTATTGCTGGACAACGTG
配列番号 18	GGACCTTGTTTGC CAGGTTCA
配列番号 19	CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG
配列番号 20	GCAATGCTGTTCTTG CAGTGGTA
配列番号 21	GCACAAACATGGCCAGATTCA
配列番号 22	AAGCCATGGTGCCCGTTAG
配列番号 23	ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA
配列番号 24	CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA
配列番号 25	CTGTGGCAGATCCAGATGCACTA
配列番号 26	GAAGTCCAATGCCAGTGTCCAG
配列番号 27	CAGCCTCGTGGCGACACTTA
配列番号 28	ATTCTGACCCTCGTAGCCTTCATA
配列番号 29	GCATGCGTGA CTGGCTCAA
配列番号 30	AAGTCTCGGGCCAACAGCTC
配列番号 31	CAATGGCTGGCCTTGGTTTCATAG
配列番号 32	CTGAACCAGACATGACAGCTGGA
配列番号 33	CATGTGCCACTGAGA CCTTGAA
配列番号 34	CAGGTCCCAGCGCAATGTAAC

[0081] 前記プライマーのうち、ターゲットを、Venus cDNA、ヒトオステオカルシン cDNA、ヒトGAPDH cDNA、マウスOsx cDNA、マウスオステオカルシン cDNAとするものについては、primer designing software, Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) を用いて設計した。

前記プライマーのうち、ターゲットを、マウスGAPDH cDNA、マ

ウスCol1a1 cDNA、マウスCol1a2 cDNA、マウスRunx2 cDNA、マウスALP cDNA、マウスSPARC cDNA、マウスPthlr cDNA、マウスBSP cDNA、マウスOPG cDNA、マウスRANKL cDNAとするものについては、Perfect Real Time support system (タカラバイオ社製) を用いて設計した。

[0082] (試験例1)

ヒト骨肉腫細胞株であるMG-63細胞と、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1とを用い、ヒトオステオカルシン遺伝子領域に導入した蛍光タンパク質Venus遺伝子の発現を調べた。なお、ネガティブコントロールとして、ウイルス感染を行わなかった細胞を用いた。

[0083] <蛍光顕微鏡観察>

前記VD3を添加して培養後2日目の細胞を蛍光顕微鏡(オリンパス社製、20倍の対物レンズ、露光時間1秒)で観察した結果を図2Aに示す。

図2A中、「No infection」は、ウイルス感染を行わなかったネガティブコントロールの結果を示し、「hOC-Venus」は、製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させた細胞の結果を示し、右図中のスケールバーは、100 μ mを示す。

図2Aの結果から、製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させたMG-63細胞では、Venus陽性細胞が観察され、VD3の用量依存的にその全細胞あたりの平均の蛍光量が増加していた。

[0084] <FACS解析>

FACS解析を行った結果を図2Bに示した。図2Bの縦軸は、全ての細胞の平均蛍光強度を示す。図2B中、「No infection」は、ウイルス感染を行わなかったネガティブコントロールの結果を示し、「hOC-Venus」は、製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベク

ター-1を感染させた細胞の結果を示す。

[0085] <定量的RT-PCR解析>

FACSにより、蛍光タンパク質陽性細胞を分取し、該分取した細胞を用い、ヒトオステオカルシン遺伝子領域に導入した蛍光タンパク質Venus遺伝子、及び内在性オステオカルシン遺伝子について、定量的RT-PCR解析を行った。

前記ヒトオステオカルシン遺伝子領域に導入した蛍光タンパク質Venus遺伝子の定量的RT-PCR解析を行った結果を図2Cに示し、前記内在性オステオカルシン遺伝子の定量的RT-PCR解析を行った結果を図2Dに示す。図2C、及び2D中、縦軸は、内部標準として、GAPDHにより標準化した後の相対的mRNAレベルを示す。図2C、及び2D中、「No infection」は、ウイルス感染を行わなかったネガティブコントロールの結果を示し、「hOC-Venus」は、製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させた細胞の結果を示す。

[0086] 以上の結果から、VD3処理により、全ての細胞の平均蛍光強度は、MG-63細胞における内在性のオステオカルシンのmRNAのレベルと平行に、VD3の用量依存的に増加していることがわかった。

[0087] (試験例2)

前記ヒトオステオカルシン遺伝子領域に導入した蛍光タンパク質Venus遺伝子の発現が成熟骨芽細胞特異的であることを、骨様結節を形成した初代骨芽細胞に、前記製造例1、又は前記比較製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクターを感染させて調べた。なお、ネガティブコントロールとして、ウイルス感染させなかった細胞についても同様に調べた。結果を図3A、及び3Bに示した。

[0088] 図3A中、「AhOC-Venus」は、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させた結果を示し、「BCAG-Venus」は、前記比較製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2を感染させた結果を示し、「C No Infect

ion」は、ネガティブコントロールの結果を示す。また、図3A中、「Ph」は、位相差顕微鏡（20倍の対物レンズ、露光時間100ms）の撮影結果であり、「Venus」は、蛍光タンパク質Venusの蛍光画像であり、「Anti-OC」は、Alexa Fluor 594でラベルした抗オステオカルシン抗体の蛍光画像であり、「DAPI」は、DAPI入り封入剤で封入したものの蛍光画像である。前記各蛍光画像は、蛍光顕微鏡（20倍の対物レンズ、露光時間1s）の撮影結果である。また、「Merge」は、前記「Venus」、「Anti-OC」、及び「DAPI」をマージした結果である。なお、右下の図中のスケールバーは、50 μ mを示す。

図3Bは、10倍の対物レンズを用いて撮影した点、右下の図中のスケールバーが100 μ mである点以外は、前記図3Aと同様にして撮影した結果を示す図である。図3B中の用語等は、前記図3Aと同様である。

[0089] 図3Aに示すように、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させたところ、骨様結節を形成している細胞で特異的に蛍光タンパク質Venusが発現していた。また、これらの骨様結節を形成している細胞を抗マウスオステオカルシン抗体で免疫染色したところ、前記蛍光タンパク質Venusの発現は、内在性のオステオカルシンと相関していた。

一方、前記比較製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2を感染させた細胞では、蛍光タンパク質Venusは、骨様結節を形成している細胞だけではなく、その周囲の細胞でも発現していた。

[0090] （試験例3）

培養物中の骨様結節を形成している骨芽細胞の分析を以下のようにして行った。

[0091] <FACS解析>

前記FACSにより、骨芽細胞を、蛍光タンパク質陽性細胞群（以下、「Venus（+）」と称することがある）と、蛍光タンパク質陰性細胞群（

以下、「Venus (-)」と称することがある) とに分離した。なお、細胞の分取は、蛍光タンパク質Venusと細胞のもつ自家蛍光(PE-A)の2色FACS解析により行った。

前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を用いた場合の結果を図4Aに示す。図4Aの結果から、Venus(+)は、細胞全体の5.0%であり、純度は86.8%であった。

一方、前記比較製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-2を用いた場合は、Venus(+)は約60%であり(図4B)、ウイルス感染させなかった場合は、Venus(+)は0%であった(図4C)。

[0092] <定量的RT-PCR解析>

骨の形成及び吸収に関連する遺伝子のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCR解析により、解析した。

解析には、前記製造例1のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを感染させた細胞であって、(1)前記FACSによる分取を行っていない細胞群(以下、「U群」と称することがある)、(2)前記FACSにより分取された蛍光タンパク質Venusを発現していない細胞群(以下、「-群」と称することがある)、(3)前記FACSにより分取された蛍光タンパク質Venusを発現している細胞(以下、「+群」と称することがある)を用いた。結果を図4D及び4Eに示した。

[0093] 図4D及び図4E中、「Gapdh」は、内部標準であるGAPDHを示し、「Venus」は、レポーターである前記蛍光タンパク質Venusを示す。「Oc」(オステオカルシン)、「Bsp」(BSP)、「Colla1」、「Colla2」、及び「Sparc」(SPARC)は分泌タンパク質であり、「Pth1r」は、ホルモンであり、「Alp」(ALP)は、酵素であり、「Osx」及び「Runx2」は、転写因子であり、「Opg」(OPG)及び「Rankl」(RANKL)は、破骨細胞の誘導に関連する。

図4D及び4Eのグラフ中の数値は、「一群」と比較した相対的なmRNA量を示し、数値の記載がないものは、「一群」と比較した相対的なmRNA量がほぼ1.0である。

[0094] 図4D及び4Eの結果から、蛍光タンパク質VenusのmRNAの発現量は、「+群」では、「一群」と比較して49.0倍であり、FACSにより成熟骨芽細胞を分取できることが示された。また、「+群」では、「一群」と比較して、オステオカルシンのmRNAの発現量が13.8倍高いだけでなく、BSPのmRNAの発現量も19.3倍と高かった。しかしながら、Colla1、Colla2、及びSPARCのmRNAの発現量は、「+群」と「一群」との間で、ほぼ同等であった。Pth1r、及びALPのmRNAの発現量は、「+群」のほうが、「一群」よりもそれぞれ2.6倍、2.2倍高かった。OPG及びRANKLのmRNAの発現量は、「+群」と「一群」との間で、ほぼ同等であった。

[0095] 転写因子であるRunx2は、オステオカルシンmRNAの骨芽細胞特異的な発現のための重要な転写因子として同定されたものであるが、「+群」と「一群」との間で、mRNAレベルでの違いは見られなかった。

一方、他の転写因子であるOsxのmRNAの発現量は、「+群」のほうが「一群」よりも3.5倍高かった。

[0096] 以上の結果から、前記「+群」は、前記「一群」に比べ、オステオカルシン、BSP等の骨形成期の骨芽細胞に特異的な分化マーカーが10倍以上上昇しており、また骨芽細胞の成熟に従って上昇するALP、PTH受容体(Pth1r)等の発現も2倍～3倍程度高く、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を一過性に骨芽細胞に感染させることにより、蛍光タンパク質Venusの蛍光強度によって、様々な分化状態にある細胞集団から、骨形成期の骨芽細胞を生きた状態で効率的に分取できることが示された。

[0097] なお、前記Osxは、C2C12筋芽細胞のBMPにより誘導される造骨性の分化のために必要な転写因子として同定されたものであり(「Yagi

K, Tsuji K, Nifuji A et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. J Cell Biochem 2003; 88 (6) : 1077-83.」参照)、また、Osxノックアウトマウスは、骨芽細胞分化を欠くために骨組織を欠くことが知られている(「Nakashima K, Zhou X, Kunkel G et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002; 108 (1) : 17-29.」参照)。

一方、前記Runx2は、Osxノックアウトマウスの前駆細胞において発現していたので、Osxと、Runx2とは、骨芽細胞分化において、異なる役割を有することが示唆されていた。Osx及び、ALP、PTH受容体などの発現が未成熟な骨芽細胞に対して、成熟した骨芽細胞でより高く発現していることは、これまで十分解析されておらず本方法を用いることによって示された新規な知見といえる。

[0098] (試験例4)

<蛍光免疫抗体染色>

前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1、又は前記比較製造例2で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1を前記初代骨芽細胞に感染させ、蛍光免疫抗体染色により比較を行った。なお、コントロールとして、前記比較製造例3で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-2を用いて同様に蛍光免疫抗体染色を行った。結果を図5Aに示した。

[0099] 図5A中、「HDA-d-hOC-Venus」は、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1を感染させた結果を示し、「

「 $\Delta E1-hOC3.8-Venus$ 」は、前記比較製造例2で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1を感染させた結果を示し、「 $\Delta E1-CMV-GFP$ 」は、前記比較製造例3で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-2（コントロール）を感染させた結果を示す。また、図5A中、「Phase」は、位相差顕微鏡（20倍の対物レンズ、露光時間100ms）の撮影結果であり、「Venus」は、蛍光タンパク質Venusの蛍光画像であり、「Anti-OC」は、Alexa Fluor 594でラベルした抗オステオカルシン抗体の蛍光画像であり、「DAPI」は、DAPI入り封入剤で封入したものの蛍光画像である。前記各蛍光画像は、蛍光顕微鏡（20倍の対物レンズ、露光時間1s）の撮影結果である。また、「Merge」は、前記「Venus」、「Anti-OC」、及び「DAPI」をマージした結果である。なお、右下の図中のスケールバーは、100 μm を示す。

[0100] 図5Aの結果から、「HDA-hOC-Venus」及び「 $\Delta E1-hOC3.8-Venus$ 」のいずれも、抗オステオカルシン抗体陽性である骨様結節において蛍光タンパク質Venusの発現が見られたが、明らかに「HDA-hOC-Venus」のほうが「 $\Delta E1-hOC3.8-Venus$ 」よりも明るい蛍光を呈した。一方コントロールに用いた「 $\Delta E1-CMV-GFP$ 」では、骨様結節以外の多くの細胞でも高い蛍光が見られた。

[0101] <FACS解析>

前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1、又は前記比較製造例2で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1を前記初代骨芽細胞に感染させ、FACS解析により比較を行った。なお、コントロールとして、前記比較製造例3で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-2を用いた場合、ウイルス感染を行わなかった場合についても同様にして試験した。結果を図5B~図5Eに示した。

[0102] 図5B~図5Eの結果から、製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウ

イルスベクター-1を用いた場合には、比較製造例2で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1を用いた場合よりも光る細胞の量が6倍多く、光っている細胞の平均の蛍光強度も3倍高かった。

[0103] これらの結果より、本発明の製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1は、既報の論文（「Bilic-Curcic I, Kronenberg M, Jiang X et al. Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz. *Genesis* 2005; 43 (2):87-98.」、*Born AK, Lischer S, Maniura-Weber K. Watching osteogenesis: life monitoring of osteogenic differentiation using an osteocalcin reporter. J Cell Biochem* 2012; 113 (1):313-21.」、*Born AK, Rottmar M, Lischer S et al. Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring. Eur Cell Mater* 2009; 18:49-60, 1-2; discussion」)で使用されている3.8kbの短いプロモーターにVenus遺伝子を連結したもの(比較製造例2で得られたE1/E3欠損型アデノウイルスベクター-1)よりも優れていることがわかった。また、この結果より、3.8kbのプロモーターには含まれず、前記製造例1で得られたヘルパー依存型アデノウイルスベクター-1が保持しているオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の3.8kb~10.1kbの間の配列、又はオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の

8. 8 k b の配列に、成熟骨芽細胞での発現に関わる未知なる発現制御領域が存在する可能性が示唆された。

[0104] 前記各試験例の結果から、Runx2やVitamin D receptor結合配列だけでなく、上流側領域と下流側領域を含めて約19 k bの領域のヒトオステオカルシン遺伝子領域を含むオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの翻訳開始点に蛍光タンパク質Venus遺伝子を挿入した本発明の一態様であるヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いることにより、このウイルスを一過性に感染させることで様々な分化状態にある細胞集団から、骨形成期にある骨芽細胞だけを分取することができることが示された。

[0105] また、本発明のアデノウイルスを介した遺伝子導入は、様々な細胞において、他のウイルスベクターや、非ウイルス的方法よりも効果的である。

これまでに、3.8 k bのヒトオステオカルシンプロモーターの制御下でGFPを発現するトランスジェニックマウスでは、成熟骨芽細胞特異的にGFPを発現することが示されている（「Bilic-Curcic I, Kronenberg M, Jiang X et al. Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz. Genesis 2005; 43 (2): 87-98.」参照）。

一方、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、マウスの細胞に加え、ヒトを含む種の細胞において、オステオカルシン依存的なGFPの発現を可視化するために用いることができる点で、有用である。

[0106] また、ヌクレオフェクションを利用し、3.8 k bのオステオカルシンプロモーター下にGFPが位置する構築物をヒト骨髄由来細胞に一過性に導入した例があるが、その導入効率は、高くても25%と低かった（「Born AK, Lischer S, Maniura-Weber K. W

atching osteogenesis: life monitoring of osteogenic differentiation using an osteocalcin reporter. J Cell Biochem 2012; 113 (1):313-21.」
、「Born AK, Rottmar M, Lischer S et al. Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring. Eur Cell Mater 2009; 18:49-60, 1-2; discussion」参照)。

一方、上記試験例で示すように、アデノウイルスベクターの感染効率は、MOI 1,000の場合に60%であり、前記ヌクレオフェクションと比較すると高いものである。

[0107] 本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、ヘルパー依存型アデノウイルスの大きなクローニング容量を利用したものである。即ち、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターの一態様では、蛍光タンパク質遺伝子の発現は、ヒトオステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の10.1kb、及び3'下流側領域の8.8kbという長い制御配列により制御されている。

これまでに、1.7kbのラットオステオカルシンプロモーターという短い制御配列を用いたGFPトランスジェニックマウスの例があるが、この例では、成熟骨芽細胞においてもGFPシグナルが弱く、中枢神経系において漏出発現していた(「Kalajzic Z, Liu P, Kalajzic I et al. Directing the expression of a green fluorescent protein transgene in differentiated osteoblasts: comparison between rat type I collagen and rat osteocalcin p

romoters. Bone 2002; 31 (6) : 654-60 .」参照)。

一方、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いると、上述した試験例で示したように、内在性のオステオカルシンの発現をより正確に反映することができる。

また、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、長い制御要素を受け入れる十分な容量を有しており、レポーター遺伝子の発現を妨げるウイルスエンハンサーが最小であるため、組織特異的な発現において、第1世代のアデノウイルスベクターよりも優れている(「Shi CX, Hitt M, Ng P et al. Superior tissue-specific expression from tyrosinase and prostate-specific antigen promoters/enhancers in helper-dependent compared with first-generation adenoviral vectors. Hum Gene Ther 2002; 13 (2) : 211-24.」参照)。

[0108] 更に、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、標的細胞における染色体へ蛍光タンパク質遺伝子を組み込むことなく、蛍光タンパク質の一過性発現を可能とする。そのため、レトロウイルスやレンチウイルスを用いた場合とは異なり、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターのDNAは、細胞分裂により、感染細胞から最終的に消失する。この特徴は、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを臨床応用(例えば、移植のための成熟骨芽細胞の分取)するうえで、非常に大きな利点である。

[0109] 本発明の態様としては、例えば、以下の態様などが挙げられる。

<1> オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの塩基配列が、レポーター遺伝子を含む塩基配列に置換されており、

前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、

前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含むことを特徴とするヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<2> レポーター遺伝子を含む塩基配列が、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部との間に位置する前記<1>に記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<3> オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域が、前記第1エキソンの翻訳開始点から10.1 kbまでの領域である前記<1>から<2>のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<4> オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域が、前記第1エキソンの終わりから8.8 kbまでの領域である前記<1>から<3>のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<5> レポーター遺伝子を含む塩基配列が、抗生物質耐性遺伝子の塩基配列を含む前記<1>から<4>のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。

<6> 前記<1>から<5>のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、

前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程とを含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の可視化方法である。

<7> 前記<1>から<5>のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、

前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程と、

前記レポーター遺伝子の発現が検出された細胞を分取する工程を含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の製造方法である。

産業上の利用可能性

[0110] 本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、骨形成状態の成熟骨芽細胞を可視化することができるので、前記成熟骨芽細胞の可視化方法、及び製造方法に好適に用いることができる。また、本発明のヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、*in vitro*における成熟骨芽細胞を調べるだけでなく、*in vivo*における成熟骨芽細胞の操作（例えば、骨再生のための細胞ベースの技術）にも有用であると考えられる。

本発明の成熟骨芽細胞の可視化方法は、骨形成状態の成熟骨芽細胞を可視化することができるので、新しい骨形成制御因子の探索などに好適に利用可能である。

本発明の成熟骨芽細胞の製造方法は、従来困難であった骨形成状態の成熟骨芽細胞を生きた状態で分取することができるので、骨芽細胞を用いた組織再生などへの応用が期待できる。

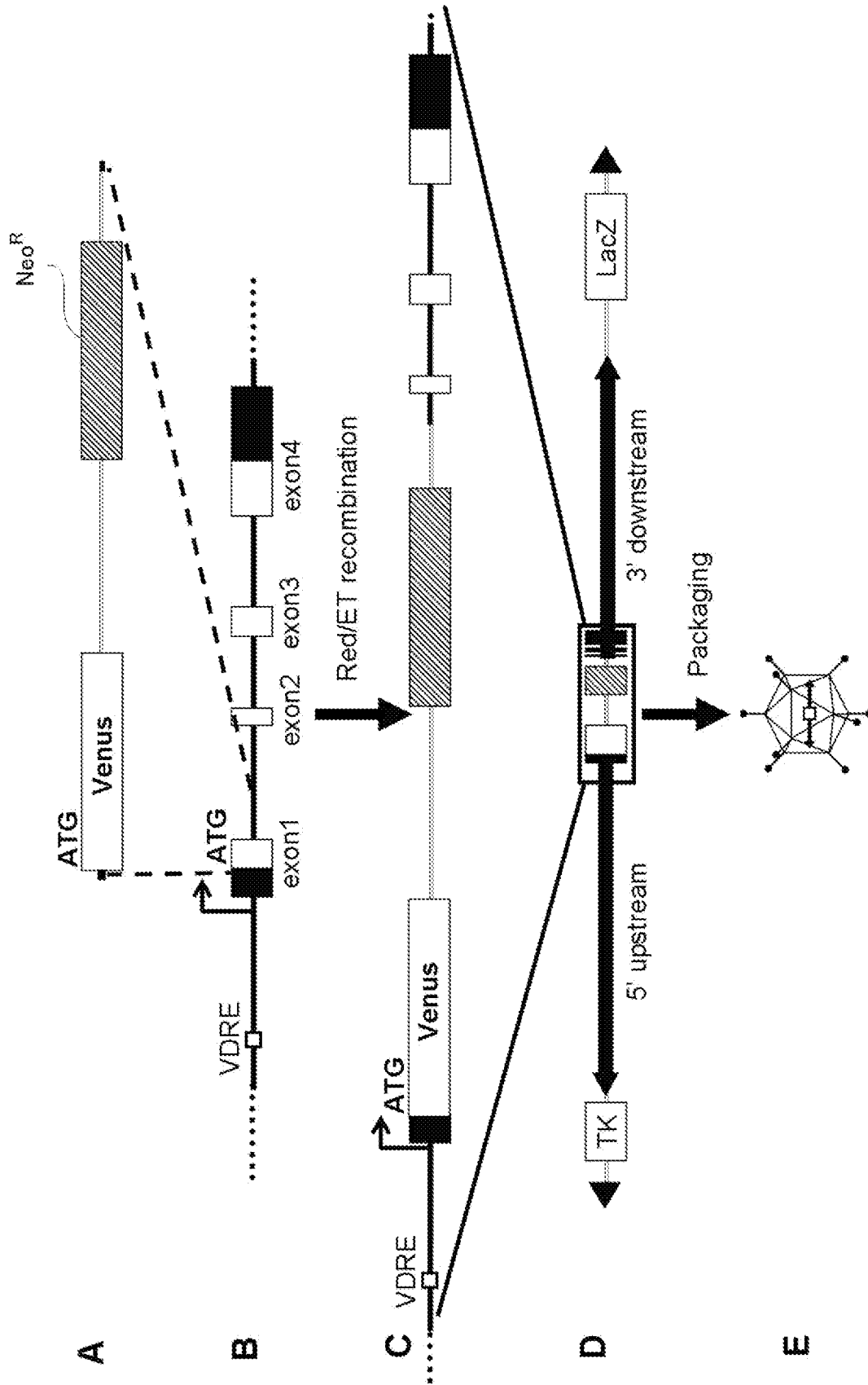
請求の範囲

- [請求項1] オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの塩基配列が、レポーター遺伝子を含む塩基配列に置換されており、
- 前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、
- 前記オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部とを含むことを特徴とするヘルパー依存型アデノウイルスベクター。
- [請求項2] レポーター遺伝子を含む塩基配列が、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域の少なくとも一部と、オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域の少なくとも一部との間に位置する請求項1に記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクター。
- [請求項3] オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの5'上流側領域が、前記第1エキソンの翻訳開始点から10.1 kbまでの領域である請求項1から2のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクター。
- [請求項4] オステオカルシン遺伝子の第1エキソンの3'下流側領域が、前記第1エキソンの終わりから8.8 kbまでの領域である請求項1から3のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクター。
- [請求項5] レポーター遺伝子を含む塩基配列が、抗生物質耐性遺伝子の塩基配列を含む請求項1から4のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクター。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、
- 前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程とを含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の可視化方法。
- [請求項7] 請求項1から5のいずれかに記載のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを骨芽細胞に感染させる工程と、

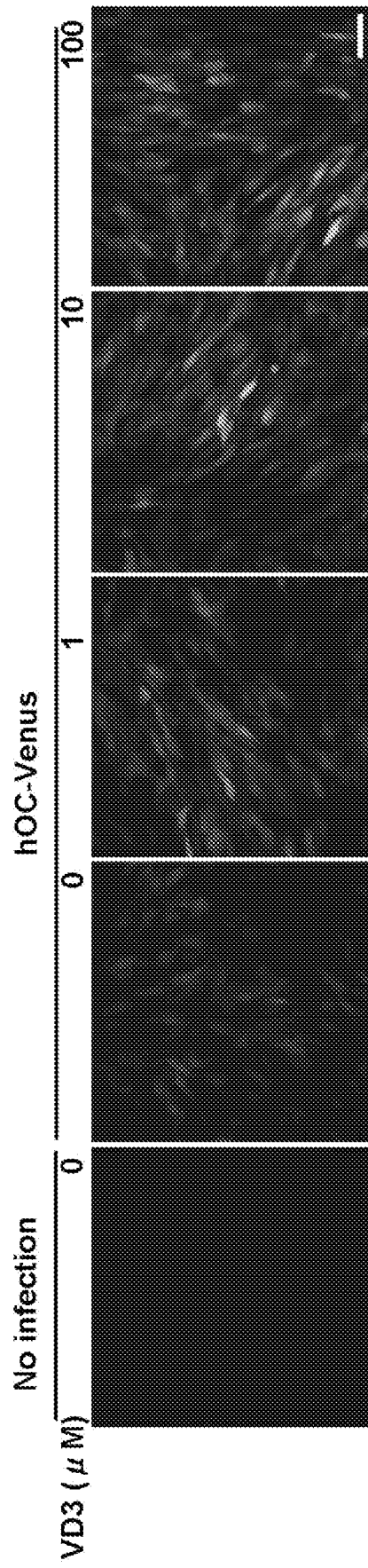
前記感染した骨芽細胞におけるレポーター遺伝子の発現を検出する工程と、

前記レポーター遺伝子の発現が検出された細胞を分取する工程を含むことを特徴とする成熟骨芽細胞の製造方法。

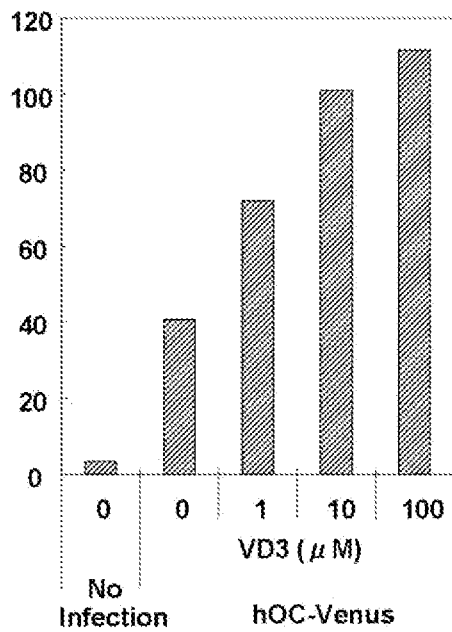
[1]



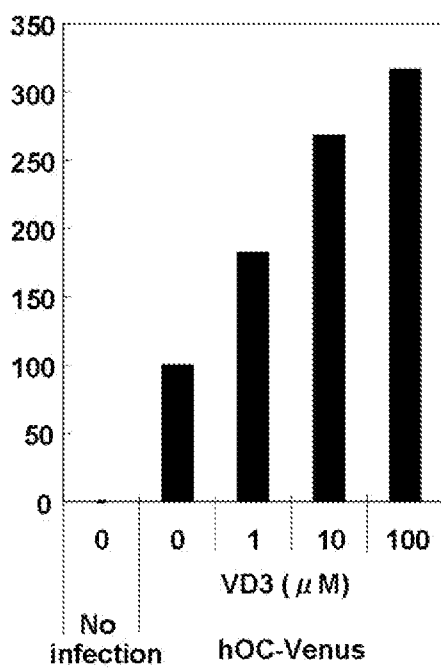
[2A]



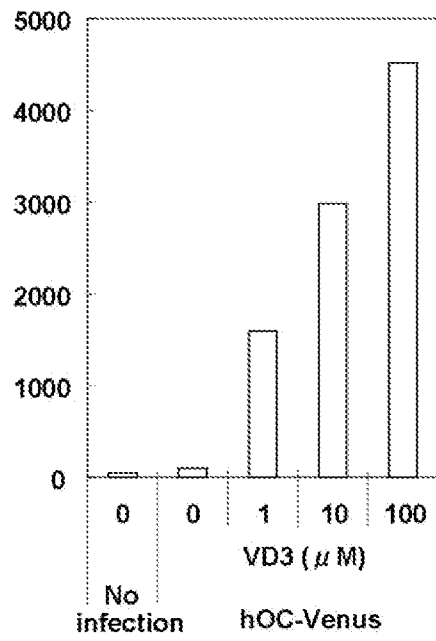
[圖2B]



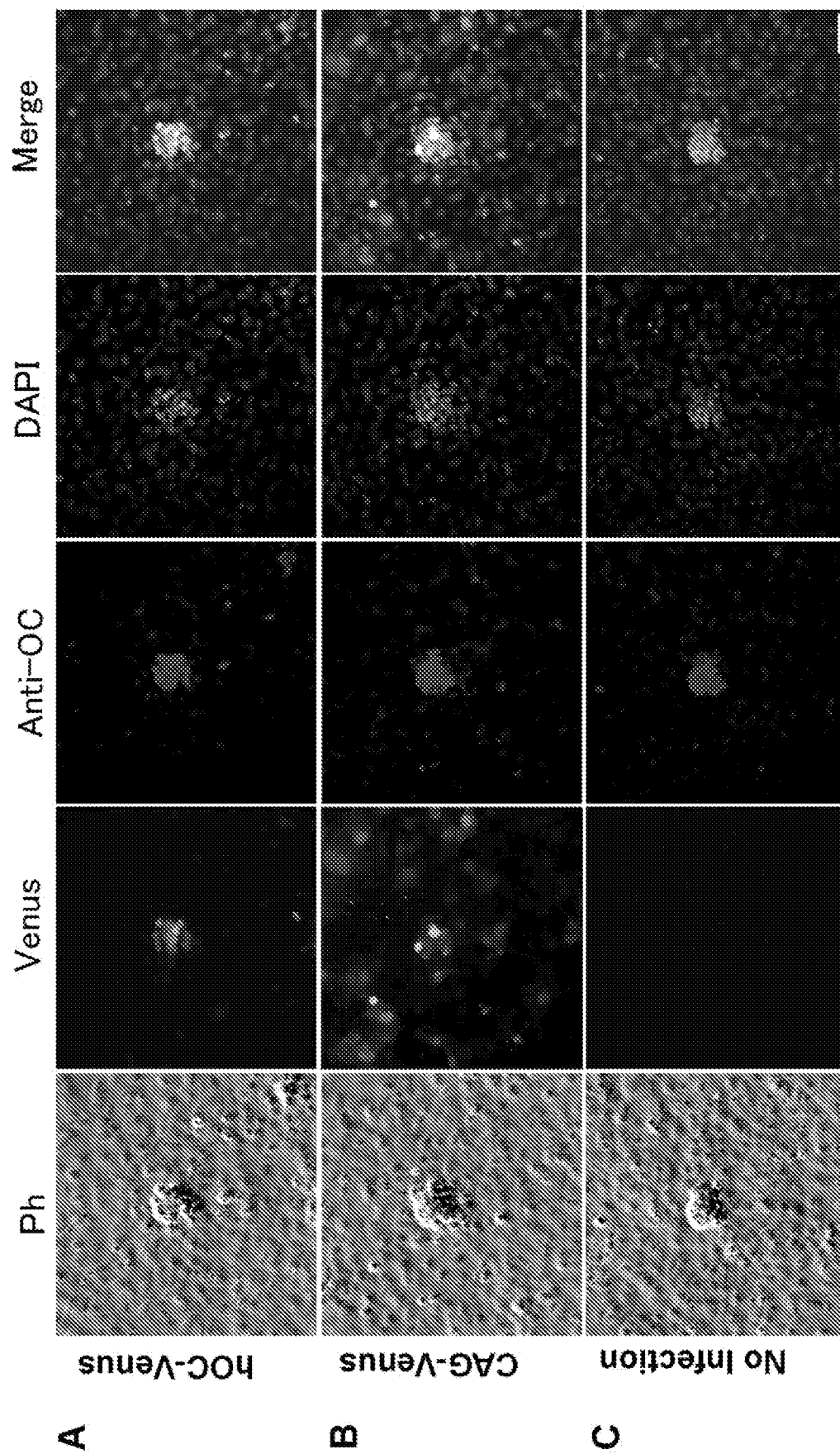
[圖2C]



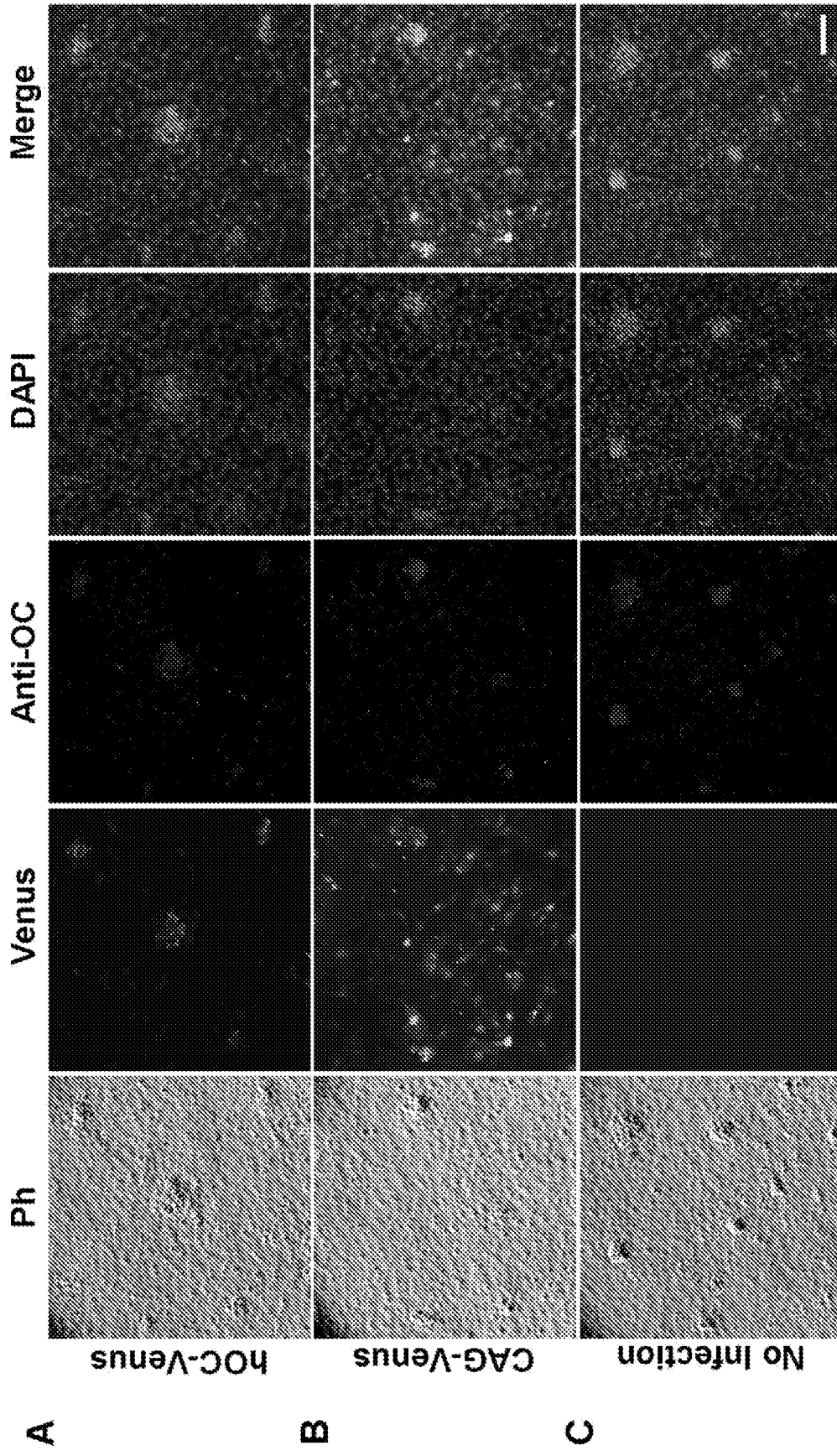
[図2D]



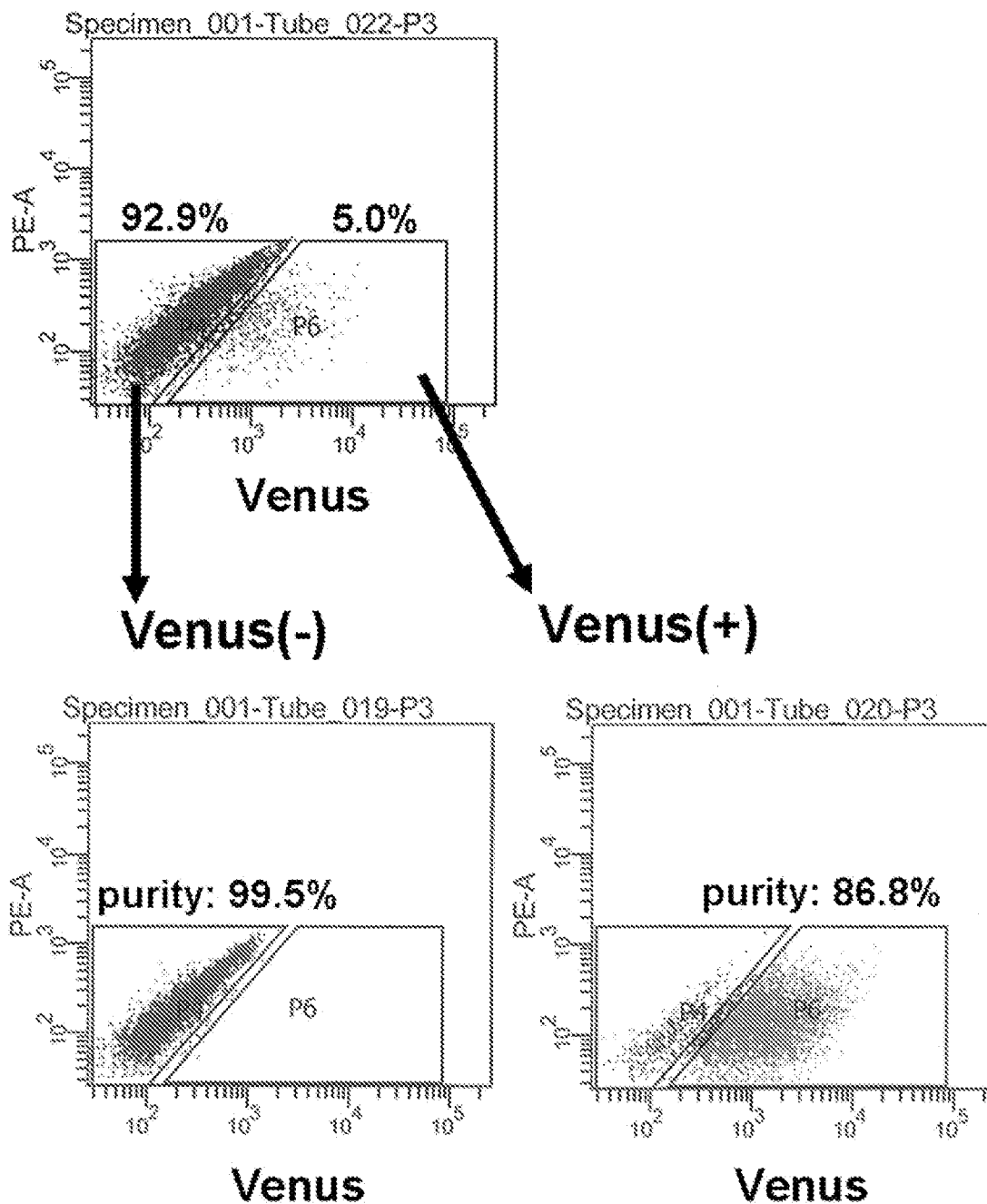
[3A]



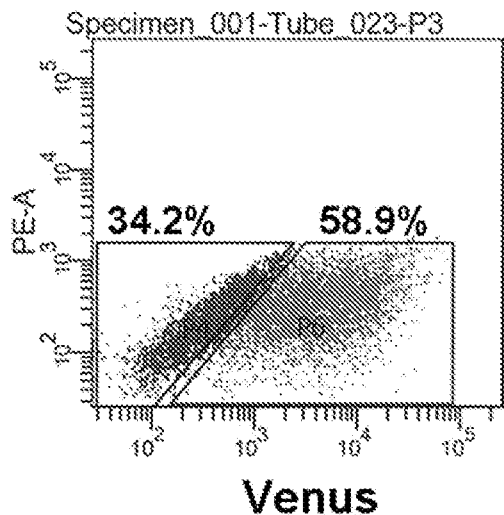
[3B]



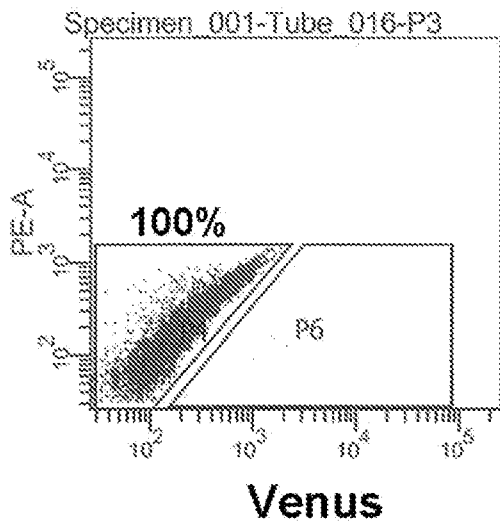
[圖4A]



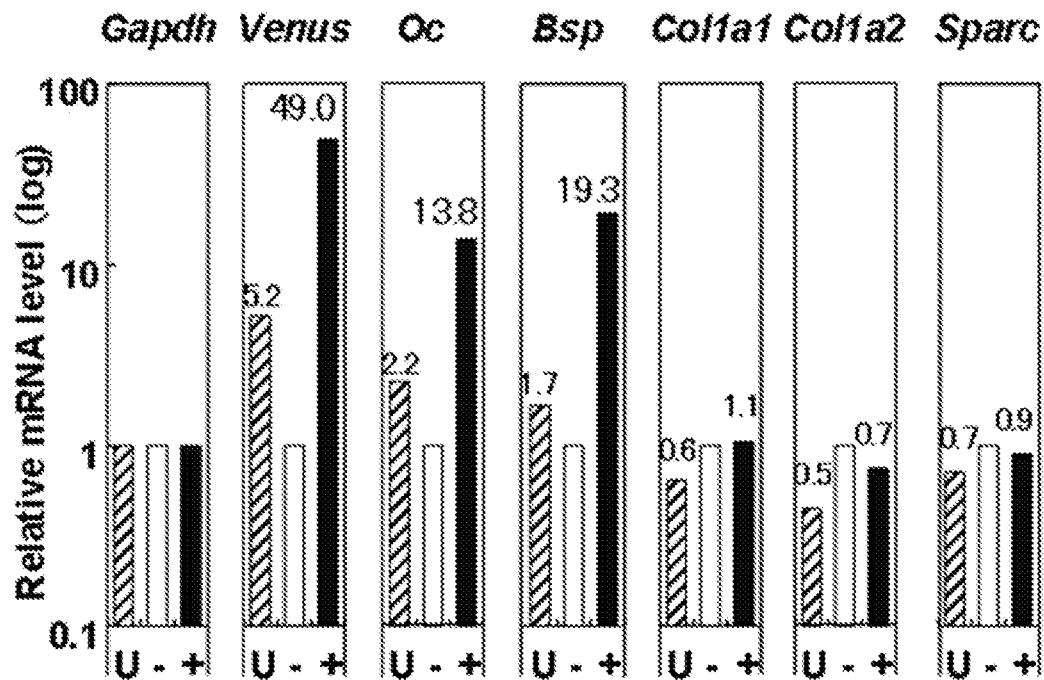
[圖4B]



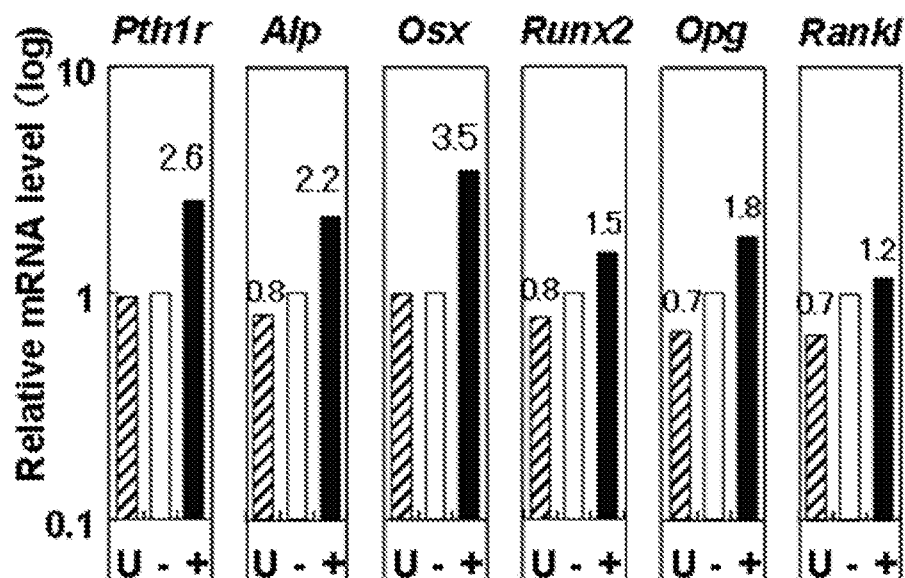
[4C]



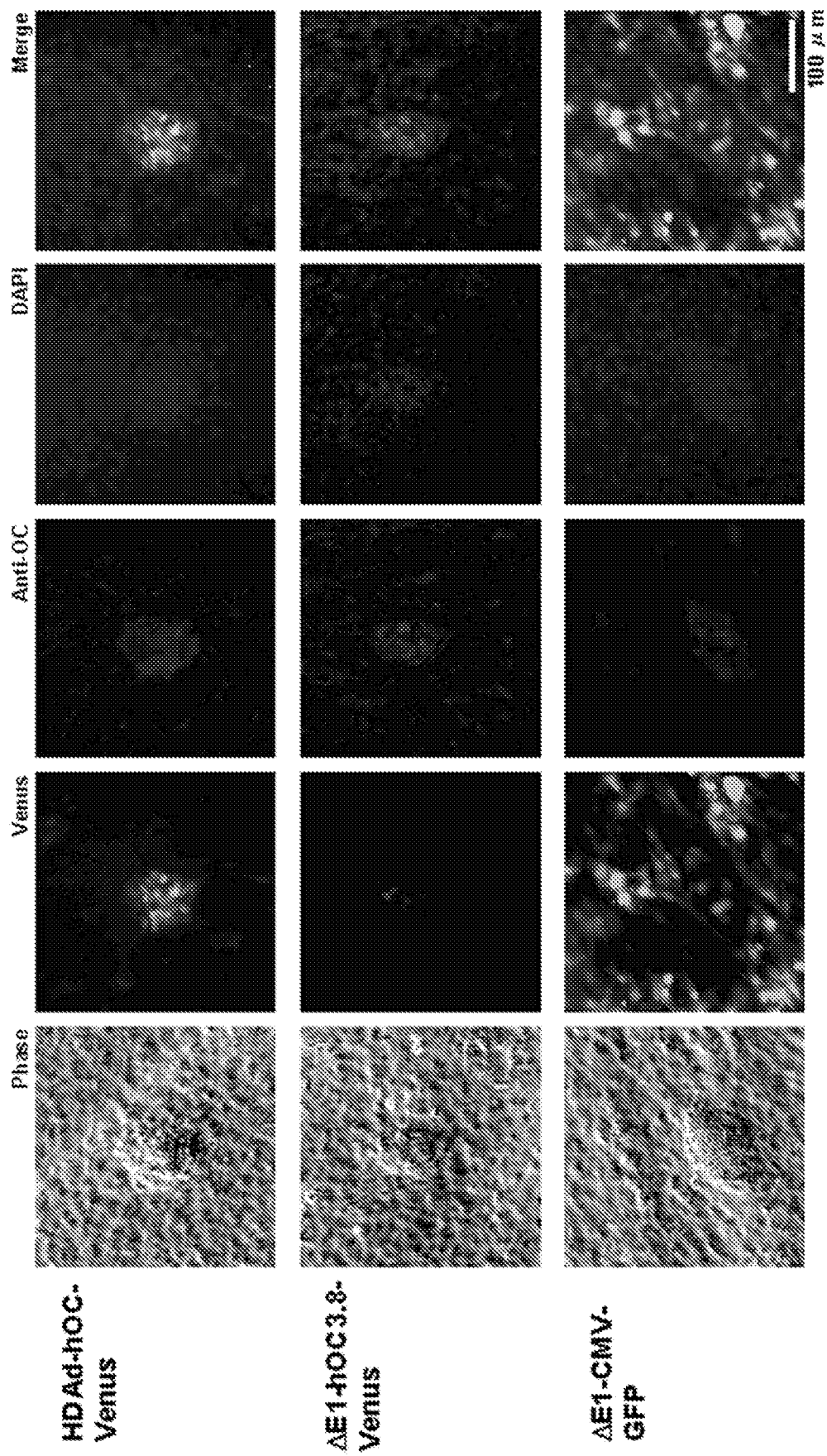
[4D]



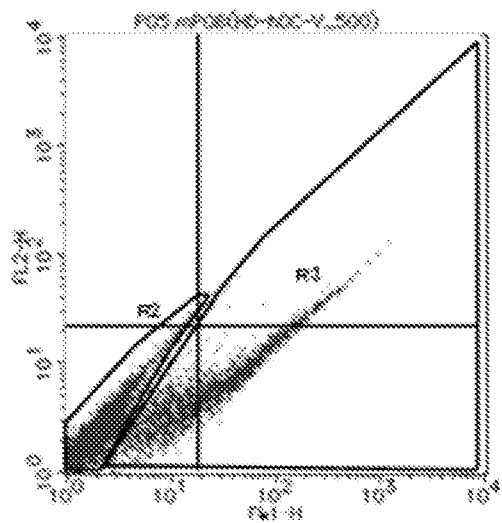
[4E]



[5A]



[圖5B]

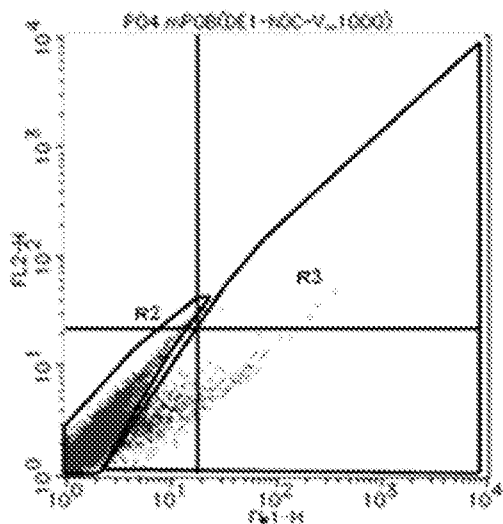


R3: 32%

MFI(R3): 45

MFI(Total): 16

[圖5C]

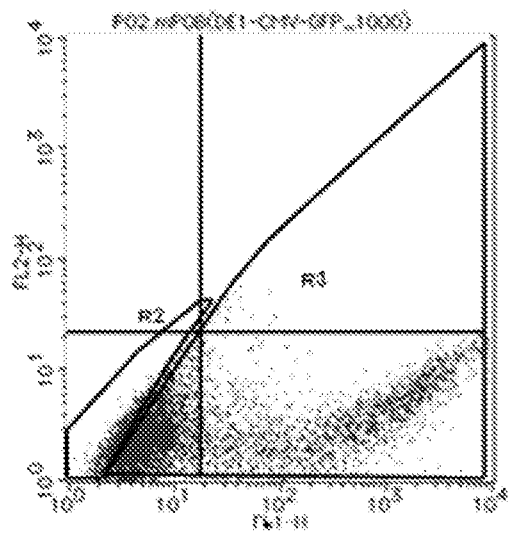


R3: 5.3%

MFI(R3): 15

MFI(Total): 3.0

[圖5D]

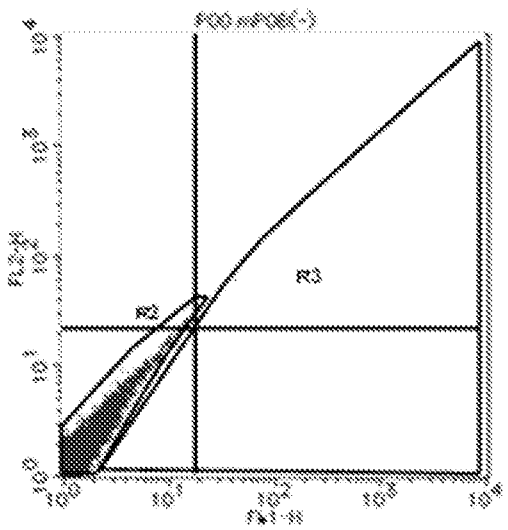


R3: 63%

MFI(R3): 431

MFI(Total): 272

[圖5E]

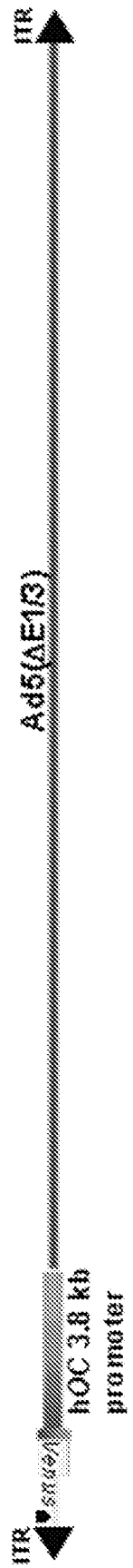


R3: 0.0%

MFI(R3): **

MFI(Total): 2.0

[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/065679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i, C12Q1/02(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BORN AK et al., Watching osteogenesis: life monitoring of osteogenic differentiation using an osteocalcin reporter, J Cell Biochem., JAN-2012, Vol.113, p.313-321	1-7
Y	BORN AK et al., Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring, Eur Cell Mater., 2009, Vol.18, p.49-62	1-7
Y	DANTHINNE X et al., Production of first generation adenovirus vectors: a review, Gene Ther., 2000, Vol.7, p.1707-1714	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 August, 2013 (27.08.13)

Date of mailing of the international search report
10 September, 2013 (10.09.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/065679

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-527128 A (The University of Virginia Patent Foundation), 16 September 2003 (16.09.2003), claims; paragraph [0156] & EP 1272615 A	1-7
Y	Kazuo KOKUBU et al., "Real Time Hone Keisei Kassei Hyoka o Mezashita Transgenic Mouse no Sakusei", Dai 56 Kai Japanese Association for Laboratory Animal Science Sokai Koen Yoshishu, 2009, vol.56, page 232	1-7
Y	BILIC-CURCIC I et al., Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz, Genesis, 2005, Vol.43, p87-98	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/065679

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, GeneCards

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct, WPI, GeneCards

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	BORN AK et al., Watching osteogenesis: life monitoring of osteogenic differentiation using an osteocalcin reporter, J Cell Biochem., JAN-2012, Vol.113, p.313-321	1-7
Y	BORN AK et al., Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring, Eur Cell Mater., 2009, Vol.18, p.49-62	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27.08.2013	国際調査報告の発送日 10.09.2013
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北田 祐介 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	DANTHINNE X et al., Production of first generation adenovirus vectors: a review, Gene Ther., 2000, Vol.7, p.1707-1714	1-7
Y	JP 2003-527128 A (ザ ユニバーシティ オブ ヴァージニア パテント ファウンデーション) 2003.09.16, 特許請求の範囲、【0156】 & EP 1272615 A	1-7
Y	国分 一男 他, リアルタイム骨形成活性評価を目指したトランスジェニックマウスの作製, 第56回日本実験動物学会総会講演要旨集, 2009, Vol.56, p.232	1-7
Y	BILIC-CURCIC I et al., Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz, Genesis, 2005, Vol.43, p87-98	1-7