

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-68004  
(P2006-68004A)

(43) 公開日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/15 (2006.01)	C O 7 K 14/15	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 C O 8 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C O 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-228750 (P2005-228750)	(71) 出願人	801000061 財団法人大阪産業振興機構
(22) 出願日	平成17年8月5日(2005.8.5)		大阪府大阪市中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか内
(31) 優先権主張番号	特願2004-231412 (P2004-231412)	(74) 代理人	110000040 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(32) 優先日	平成16年8月6日(2004.8.6)	(72) 発明者	官澤 正▲頭▼ 大阪府大阪狭山市大野東377番地の2 近畿大学医学部免疫学教室内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	阿部 弘之 大阪府大阪狭山市大野東377番地の2 近畿大学医学部免疫学教室内
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 AA20 BA32 CA04 CA09 CA12 DA02 EA02 FA20 最終頁に続く

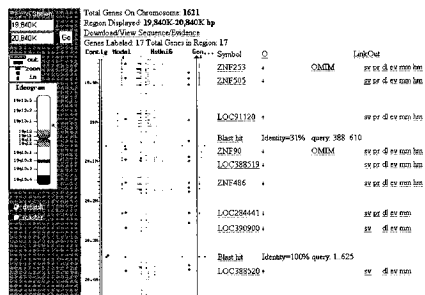
(54) 【発明の名称】新規ヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 I g A腎症の発症に係る新規ヒト内在性レトロウイルスのenv遺伝子を提供する。

【解決手段】 ヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子を開示する。このうち1個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加していてもよい。I g A腎症の発症は、このHC2 env遺伝子が発現して、その発現産物であるHC2 ENVタンパク質が生じ、自己免疫機序によりこのHC2 ENVタンパク質と反応する抗体をヒトが持つ場合に、前記抗体の免疫反応複合体が糸球体メサンジウム領域に沈着して慢性炎症反応が引き起こされるというメカニズムである。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト内在性レトロウイルス H C 2 の e n v 遺伝子であって、下記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかのポリヌクレオチドからなる遺伝子。

( 1 ) 配列表の配列番号 1 の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

( 2 ) 配列表の配列番号 1 において、1 個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、前記 ( 1 ) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

( 3 ) 配列表の配列番号 1 において、1 個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 ( 1 ) のポリヌクレオチドとの相同性が 8 0 % 以上であるポリヌクレオチド。 10

( 4 ) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

( 5 ) 配列表の配列番号 2 において、1 個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗 g p 7 0 抗体 1 2 H 5 . 1、又は抗 R a u s c h e r 白血病ウイルス g p 7 0 抗体と抗原抗体反応するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

( 6 ) 前記 ( 1 ) から ( 5 ) のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

配列表の配列番号 1 の塩基配列において、第 6 9 番目 ( T A )、第 5 2 4 番目 ( T C )、第 5 8 6 番目 ( C G )、第 5 9 2 番目 ( G T )、第 8 8 7 番目 ( C T )、第 9 7 0 番目 ( C T )、第 1 0 0 0 番目 ( C T )、第 1 1 4 0 番目 ( A G )、第 1 1 4 3 番目 ( T C ) 及び第 1 2 1 2 番目 ( C A ) からなる群から選択される少なくとも一つの一塩基多型を含む請求項 1 記載の遺伝子。 20

## 【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが、D N A 及び R N A の少なくとも一方である請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子。

## 【請求項 4】

ポリヌクレオチドであって、請求項 1 に記載の前記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかのポリヌクレオチドの全部又は一部からなるポリヌクレオチド。 30

## 【請求項 5】

ポリヌクレオチドであって、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子のプライマー又はプローブとして使用する請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

ポリヌクレオチドであって、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の全部又は一部を増幅又は検出するためのプライマー又はプローブとして使用する配列表の配列番号 3 から 2 4 及び 3 0 から 3 6 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

請求項 2 記載の遺伝子を検出するためのプローブであって、前記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかのポリヌクレオチドの全部若しくは一部と相補的であり、かつ配列番号 1 における前記一塩基多型の塩基を含む塩基配列からなるプローブ。 40

## 【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の転写産物である m R N A。

## 【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の発現産物であるタンパク質であって、下記 ( 7 ) 又は ( 8 ) のタンパク質。

( 7 ) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質。

( 8 ) 配列表の配列番号 2 において、1 個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗 g p 7 0 抗 50

体 1 2 H 5 . 1、又は抗 R a u s c h e r 白血病ウイルス g p 7 0 抗体と抗原抗体反応するタンパク質。

【請求項 1 0】

I g A 腎症マーカーであって、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子、請求項 8 記載の m R N A、請求項 9 記載のタンパク質、及び、請求項 9 記載のタンパク質を抗原として抗原抗体反応するヒト抗体からなる群から選択される少なくとも一つからなる I g A 腎症マーカー。

【請求項 1 1】

請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の遺伝子発現の測定方法であって、請求項 8 記載の m R N A 量又は請求項 9 記載のタンパク質を測定する遺伝子発現測定方法。

【請求項 1 2】

前記 m R N A の測定が、プライマー又はプローブとして請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを用いた測定である請求項 1 1 記載の測定方法。

【請求項 1 3】

前記タンパク質の測定が、請求項 9 記載のタンパク質を抗原とする抗体を用いた測定である請求項 1 1 記載の遺伝子発現測定方法。

【請求項 1 4】

請求項 9 記載のタンパク質を抗原とするヒト抗体の測定方法であって、請求項 9 記載のタンパク質と前記ヒト抗体とを抗原抗体反応させ、さらに、前記ヒト抗体と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを抗原抗体反応させて請求項 9 記載のタンパク質と前記ヒト抗体と前記標識抗体との複合体を測定するヒト抗体測定方法。

【請求項 1 5】

前記タンパク質が、固相に固定化されている請求項 1 4 記載のヒト抗体測定方法。

【請求項 1 6】

前記ヒト抗体が、血漿中のヒト抗体である請求項 1 4 又は 1 5 に記載のヒト抗体測定方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の遺伝子発現測定方法により請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の遺伝子発現を測定する I g A 腎症の検査キットであって、プライマー若しくはプローブとして使用する請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、又は、請求項 9 記載のタンパク質を抗原とする抗体を含む I g A 腎症の検査キット。

【請求項 1 8】

請求項 1 4 から 1 6 のいずれか一項に記載のヒト抗体測定方法により請求項 9 記載のタンパク質を抗原とするヒト抗体を測定する I g A 腎症の検査キットであって、請求項 9 記載のタンパク質と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを含む I g A 腎症の検査キット。

【請求項 1 9】

前記請求項 9 記載のタンパク質が、固相に固定化されている請求項 1 8 記載の I g A 腎症の検査キット。

【請求項 2 0】

I g A 腎症の治療若しくは予防のための医薬品であって、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の全部若しくは一部と相補的な塩基配列からなり、請求項 1 又は 2 の遺伝子の転写若しくはタンパク質の発現を抑制可能なポリヌクレオチドを含む医薬品。

【請求項 2 1】

I g A 腎症の治療若しくは予防のための医薬品であって、請求項 9 記載のタンパク質のアミノ酸配列における、ヒト内在性レトロウイルス H C 2 の e n v 遺伝子の発現産物を抗原とするヒト抗体に対する抗原決定基（エピトープ）のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する医薬品。

【請求項 2 2】

請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を標的細胞に導入するための発現ベクターであって、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子と、前記遺伝子の発現に必要な調節配列とを含み、前記遺伝子が前記調節配列に発現可能に作

10

20

30

40

50

動的に連結されている発現ベクター。

【請求項 23】

遺伝子導入用レトロウイルスベクターであって、前記ウイルス粒子の被膜タンパク質が、請求項 9 記載のタンパク質の全部又は一部を含む遺伝子導入用レトロウイルスベクター。

【請求項 24】

遺伝子導入用レトロウイルスベクターを使用した遺伝子導入方法であって、前記遺伝子導入用レトロウイルスベクターが、請求項 23 記載の遺伝子導入用レトロウイルスベクターである遺伝子導入方法。

【請求項 25】

遺伝子導入細胞の製造方法であって、請求項 24 記載の遺伝子導入方法により目的遺伝子を標的細胞に導入する工程を含む遺伝子導入細胞の製造方法。 10

【請求項 26】

遺伝子導入用キットであって、請求項 22 記載の発現ベクターにより形質転換されたパッケージング細胞と、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キット。

【請求項 27】

遺伝子導入用キットであって、請求項 22 記載の発現ベクターと、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キット。

【請求項 28】

さらに、gag及びpol遺伝子の少なくとも一方を発現するプラスミドを含む請求項 27 記載の遺伝子導入用キット。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

慢性糸球体腎炎の一型であるIgA腎症は、糸球体メサンジウム領域の細胞性及び基質性増殖反応と、同領域への免疫グロブリンA(IgA)沈着を特徴とする疾患である。IgA腎症は、日本の慢性糸球体腎炎のうち、成人で30%以上、小児で20%以上を占める(非特許文献1参照)。本症は、日本を含むアジア太平洋地域諸国とフランスなど南欧諸国で多発するが、北欧や北米では少ない。この点で、日本を含む本症多発国において、本症についての研究は、特に重要視されるべきである。また、本症の予後は、従来想定されていたよりもはるかに不良であり、腎生検後の20年間に38%前後が末期腎不全に陥るとされる(同文献参照)。 30

【0003】

IgA腎症の成因は、未だ不明のままである。本症の成因としては、IgAを含む流血中の免疫複合体が糸球体メサンジウム領域に沈着して慢性炎症反応が引き起こされるといいう説が有力であるが、IgA免疫複合体を形成する抗原の同定は未だ成功していない(非特許文献2及び3参照)。また、IgA腎症の治療は、対症療法に終始するのみであり、最終的に患者腎機能が低下した場合には、透析療法に頼る以外に無いのが現状である。 40

【0004】

一方、IgA腎症の診断は、蛍光抗体法を用いた腎臓生検によりIgA沈着を確認することで行われているが、腎臓生検は、患者侵襲が極めて大きく、生命に関わる危険性もあり、反復実施は困難であるという問題もある。

【非特許文献1】財団法人 難病医学研究財団 難病情報センター、『診断・治療指針 IgA腎症』、[online]、2004年5月12日検索、インターネット<URL:http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/001\_i.htm>

【非特許文献2】Rantala, I., J. Mustonen, M. Hurme, J. Syrjanen, & H. Helin. Pathogenetic aspects of IgA nephropathy. 『IgA腎症の病原性の観点』 Nephron 88: 193-198, 2001.

【非特許文献3】Smith, A. C., & J. Feehally. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. 『IgA腎症の病因に関する新たな見識』 Springer Semin. Immunopathol. 24: 477-493, 2003.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、IgA腎症の発症に係る遺伝子及びその発現産物であるタンパク質の提供を、その目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

前記目的を達成するために、本発明は、ヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子(以下、HC2env遺伝子ともいう。)であって、下記(1)から(6)のいずれかのポリヌクレオチドからなる遺伝子を提供する。

(1)配列表の配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2)配列表の配列番号1において、1個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3)配列表の配列番号1において、1個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が80%以上であるポリヌクレオチド。

(4)配列表の配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(5)配列表の配列番号2において、1個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗gp70抗体12H5.1、又は抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(6)前記(1)から(5)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0007】

また、前記目的を達成するために、本発明は、ヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子の発現産物であるタンパク質(以下、HC2ENVタンパク質ともいう。)であって、下記(7)又は(8)のタンパク質を提供する。

(7)配列表の配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(8)配列表の配列番号2において、1個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗gp70抗体12H5.1、又は抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応するタンパク質。

【発明の効果】

【0008】

本発明者らは、IgA腎症等の原発性糸球体疾患について鋭意研究を重ね、その過程で、本症患者の血液中には慢性的にIgA免疫複合体が存在するから、IgAが反応する抗原分子は、外来抗原であるよりむしろ一種の自己抗原ではないかという着想を得た。この着想に基づきさらに研究を重ねた結果、本発明者らは、新規なヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子及びそのHC2env遺伝子産物であるタンパク質を発見し、このタンパク質が、IgA腎症と関係があることを突き止め、本発明に到達した。したがって、本発明のHC2env遺伝子やそのHC2env遺伝子産物タンパク質を検出若しくは測定することにより、又は、本発明のHC2env遺伝子産物タンパク質と免疫反応する抗体を検出若しくは測定することにより、IgA腎症の診断が可能となる。また、本発明者らは、本発明のHC2env遺伝子には、一塩基多型が存在することも突き止めており、この多型分析によって、例えば、IgA腎症の発症予測診断や、発症のタイプの診断等

10

20

30

40

50

が可能となる。そして、本発明の遺伝子の転写や発現を抑制したり、若しくは本発明のタンパク質とヒトIgA抗体との免疫反応を阻害することにより、IgA腎症の発症予防若しくは治療が可能となる。さらに、本発明のHC2env遺伝子産物タンパク質は、ヒト内在性ウイルス由来のものであるから、ヒトに反復投与しても免疫反応（中和抗体産生）が起こらないと予想され、これを遺伝子治療用のレトロウイルスベクターに利用することも可能である。

#### 【0009】

なお、後述するとおり、本発明は、従来の常識に反してなされたものであり、かつ本発明者らのみがなしえたものである。すなわち、過去20年間以上にわたり、ヒトのIgA腎症を含む、いわゆる自己免疫疾患に類似した腎系球体病変や血管病変を自然発症するハツカネズミ（マウス）に関する研究が行われ、その過程で、病変部系球体や血管壁に沈着しているマウス内在性レトロウイルスの遺伝子産物が病変形成に関与するのか、それとも血清中に検出される細胞核成分に対する抗体（抗核抗体）が病原性を持つのか議論されてきた。しかし、内在性レトロウイルス遺伝子産物に対する自己抗体が病変形成能を持つことを直接証明した者はいなかった。本発明者らは、自己免疫性の系球体腎炎を自然発症するマウス系統から、内在性レトロウイルスenv遺伝子産物と反応する多数の単クローン性抗体を樹立することに世界で初めて成功し、それらの大半が、病変を自然発症することのない正常マウスへの静脈内移入により系球体病変を誘発しうることを証明した（文献[Tabata, N., M. Miyazawa, R. Fujisawa, Y. A. Takei, H. Abe, and K. Hashimoto. Establishment of monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibodies from MRL/lpr lupus mice and induction of glomerular gp70 deposition and pathology by transfer into non-autoimmune mice. 『MRL/lprループスマウスからの抗レトロウイルスgp70モノクローナル自己抗体の樹立と、非自己免疫マウスへの導入による系球体のgp70沈着と病変の誘導』 J. Virol. 74: 4116-4126, 2000.] 参照）。

10

20

#### 【0010】

本発明は、この際樹立された抗体の一つを用い、これがヒトIgA腎症の病変部に存在する未知抗原と反応することを見出したことに端を発するものである。従来、ヒト内在性レトロウイルスがヒト病変の形成に関与する可能性については、レトロウイルスの専門家であればあるほど否定的な考え方が支配的である。例えば、マウス内在性レトロウイルス研究の第一人者で、ヒト内在性レトロウイルス遺伝子解析の権威でもある英国国立医学研究所（National Institute for Medical Research）のJonathan P. Stoyeや、長年にわたるマウスレトロウイルス研究で名高い米国国立アレルギー感染症研究所（National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases）のJohn L. Portisが、何れもヒトの自己免疫疾患における内在性レトロウイルスの関与について、強く否定的な見解を表明している（文献[Stoye, J. P. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: a skeptical view. 『内在性レトロウイルスの病原可能性：懐疑的見解』 Trends Microbiol. 7: 430, 1999., Portis, J. L. Perspectives on the role of human endogenous retroviruses in autoimmune diseases. 『ヒト内在性レトロウイルスの自己免疫疾患における役割についての見解』 Virology 296:1-5, 2002.] 参照）。

30

40

#### 【0011】

また、従来ヒト内在性レトロウイルスHC2にはenv遺伝子が存在しないと考えられていたが、本発明者らはこの常識を疑い、本発明者らが作製したマウス内在性レトロウイルスenv遺伝子産物に反応するモノクローナル抗体が、ヒト組織と反応するとの驚愕すべき事実から、ヒトゲノム上に存在するマウス内在性レトロウイルス類似遺伝子を詳細に調べた結果、本発明のヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子を見出したのである。したがって、たとえマウス内在性レトロウイルス及びそのenv遺伝子等が従来公知であったとしても、ヒト内在性レトロウイルスHC2にはenv遺伝子が無いとの先入観が一般に流布しているので、当業者にとって、従来の常識に反してヒトにマウス内在性レトロウイルスのそれに類似したenv遺伝子の存在を予想することは困難であり、本発明

50

の H C 2 e n v 遺伝子を取得することは困難であるといえる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の H C 2 e n v 遺伝子は、配列表の配列番号 1 の塩基配列において、第 6 9 番目 ( T A )、第 5 2 4 番目 ( T C )、第 5 8 6 番目 ( C G )、第 5 9 2 番目 ( G T )、第 8 8 7 番目 ( C T )、第 9 7 0 番目 ( C T )、第 1 0 0 0 番目 ( C T )、第 1 1 4 0 番目 ( A G )、第 1 1 4 3 番目 ( T C ) 及び第 1 2 1 2 番目 ( C A ) からなる群から選択される少なくとも一つの一塩基多型を含む遺伝子であってもよい。また、本発明の H C 2 e n v 遺伝子において、前記 ( 1 ) から ( 6 ) のポリヌクレオチドは、D N A であっても R N A であってもよい。但し、R N A においては、配列表上の塩基配列は、t ( チミン ) 塩基を、u ( ウラシル ) 塩基に読み替えるものとする。

10

【0013】

本発明のポリヌクレオチドは、前記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかのポリヌクレオチドの全部又は一部からなるポリヌクレオチドである。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の H C 2 e n v 遺伝子のプライマー又はプローブとして使用することができる。

【0014】

本発明のポリヌクレオチドは、その他の態様として、本発明の H C 2 e n v 遺伝子の全部又は一部を増幅又は検出するためのプライマー又はプローブとして使用するポリヌクレオチドであって、配列表の 3 から 2 4 及び 3 0 から 3 6 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

20

【0015】

また、本発明のプローブは、前記一塩基多型を検出するためのプローブであって、前記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかのポリヌクレオチドの全部若しくは一部と相補的であり、かつ配列表の配列番号 1 における前記一塩基多型の塩基を含む塩基配列からなるプローブである。

【0016】

本発明の m R N A は、本発明の H C 2 e n v 遺伝子の転写産物 m R N A である。

【0017】

本発明の I g A 腎症マーカーは、本発明の H C 2 e n v 遺伝子、本発明の m R N A、本発明の H C 2 E N V タンパク質、及び、本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原として抗原抗体反応するヒト抗体からなる群から選択される少なくとも一つからなる I g A 腎症マーカーである。

30

【0018】

本発明の遺伝子発現測定方法は、本発明の H C 2 e n v 遺伝子の遺伝子発現を測定する方法であって、本発明の m R N A 量又は本発明の H C 2 E N V タンパク質を測定する測定方法である。前記本発明の m R N A 量の測定は、本発明の H C 2 e n v 遺伝子のプライマー又はプローブとして使用する本発明のポリヌクレオチドを用いて行うことが好ましい。また、前記本発明の H C 2 E N V タンパク質の測定は、本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原とする抗体を用いて行うことが好ましい。

【0019】

本発明のヒト抗体測定方法は、本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原とするヒト抗体の測定方法であって、本発明の H C 2 E N V タンパク質と前記ヒト抗体とを抗原抗体反応させ、さらに、前記ヒト抗体と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを抗原抗体反応させて本発明の H C 2 E N V タンパク質と前記ヒト抗体と前記標識抗体との複合体を測定する方法である。本発明のヒト抗体の測定方法において、前記本発明の H C 2 E N V タンパク質は、固相に固定化されていることが好ましい。また、本発明のヒト抗体測定方法において、前記ヒト抗体は、血漿中のヒト抗体であることが好ましい。

40

【0020】

本発明の I g A 腎症の検査キットは、本発明の遺伝子発現測定方法により本発明の H C 2 e n v 遺伝子の遺伝子発現を測定する I g A 腎症の検査キットであって、プライマー若

50

しくはプローブとして使用する本発明のポリヌクレオチド、又は、本発明のHC2ENVタンパク質を抗原とする抗体を含むIgA腎症の検査キットである。

【0021】

本発明のIgA腎症の検査キットは、その他の態様として、本発明のヒト抗体の測定方法により本発明のHC2ENVタンパク質を抗原とするヒト抗体を測定するIgA腎症の検査キットであって、本発明のHC2ENVタンパク質と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを含むIgA腎症の検査キットである。本発明のIgA腎症の検査キットにおいて、前記本発明のHC2ENVタンパク質は、固相に固定されていることが好ましい。

【0022】

本発明の医薬品は、IgA腎症の治療及び予防の少なくとも一方のための医薬品であって、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子と相補的な塩基配列からなり、本発明のHC2env遺伝子の転写若しくはタンパク質の発現を抑制可能なポリヌクレオチドを含む医薬品である。

10

【0023】

本発明の医薬品は、その他の態様として、IgA腎症の治療及び予防の少なくとも一方のための医薬品であって、本発明のHC2ENVタンパク質のアミノ酸配列における、ヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子の発現産物を抗原とするヒト抗体に対する抗原決定基(エピトープ)のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する医薬品である。

【0024】

本発明の発現ベクターは、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を標的細胞に導入するための発現ベクターであって、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子と、前記遺伝子の発現に必要な調節配列とを含み、前記遺伝子が前記調節配列に発現可能に作動的に連結されている発現ベクターである。

20

【0025】

本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、前記ウイルス粒子の被膜タンパク質が、本発明のHC2ENVタンパク質の全部又は一部を含む遺伝子導入用レトロウイルスベクターである。

【0026】

本発明の遺伝子導入方法は、遺伝子導入用レトロウイルスベクターを使用した遺伝子導入方法であって、前記遺伝子導入用レトロウイルスベクターが、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターである遺伝子導入方法である。

30

【0027】

本発明の遺伝子導入細胞の製造方法は、本発明の遺伝子導入方法により目的遺伝子を標的細胞に導入する工程を含む遺伝子導入細胞の製造方法である。

【0028】

本発明の遺伝子導入用キットは、本発明の発現ベクターにより形質転換されたパッケージング細胞と、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キットである。

【0029】

本発明の遺伝子導入用キットは、その他の態様として、本発明の発現ベクターと、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キットである。本発明の遺伝子導入用キットにおいて、さらに、gag及びpol遺伝子の少なくとも一方を発現するプラスミドを含むことが好ましい。

40

【0030】

次に、本発明について詳細に説明する。

【0031】

まず、本発明のHC2env遺伝子について説明する。本発明のHC2env遺伝子は、前述のとおり、下記(1)から(6)のいずれかに記載のポリヌクレオチドからなる遺伝子である。

(1) 配列表の配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

50

(2) 配列表の配列番号1において、1個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 配列表の配列番号1において、1個若しくは数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が80%以上であるポリヌクレオチド。

(4) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(5) 配列表の配列番号2において、1個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗gp70抗体12H5.1、又は抗Rauscher白血球ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(6) 前記(1)から(5)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0032】

配列表の配列番号1の塩基配列は、本発明者らが見出したヒト内在性レトロウイルスHC2のenv遺伝子の塩基配列の一例である。なお、配列表の配列番号1の塩基配列は、ヒトゲノムデータベースに存在するが、この塩基配列が本発明のHC2env遺伝子であるという報告は従来なく、本発明者らが初めて見出したものである。図4に示すとおり、本発明者らは、本発明のHC2env遺伝子が、ヒト第19染色体短腕の19p13.1付近に存在することを同定した。

#### 【0033】

前記ヒト内在性レトロウイルスHC2は、文献[Kabat, P., M. Tristem, R. Opavsky, & J. Pastorek. Human endogenous retrovirus HC2 is a new member of the S71 retrovirus subgroup with a full-length pol gene. 『ヒト内在性レトロウイルスHC2は、完全長pol遺伝子をもつS71レトロウイルスのサブグループである』Virology 226: 83-94, 1996.]に開示されているが、従来は、env遺伝子を持たないHC2のグループに属するプロウイルスであるとされていた。同様に、これまでの報告においては、HC2グループのプロウイルスは全て不完全であり、env遺伝子は欠失したものであると考えられていた。しかし、本発明者らの研究によって、同文献において誤って3'LTR(末端反復配列)とされていた部分に、本発明のHC2env遺伝子が存在することが確認された。本発明のHC2env遺伝子のヒト染色体上の位置は、これまで報告されたHC2及びそのグループの内在性レトロウイルスの位置と異なる。これらのことより、本発明のHC2env遺伝子は、HC2グループに属する新規のプロウイルスの一部であるといえる。

#### 【0034】

さらに、本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、ヒト染色体上において、本発明のHC2env遺伝子の終始コドンの下流に真の3'LTRが存在し、gag-pol遺伝子領域の上流に5'LTRが存在することを新たに見出し、更に、これらの新たなLTRが機能することを確認した(実施例1、図5及び6参照)。これらの事実も、従来、ヒト内在性レトロウイルスHC2の3'LTRと考えられていた部分は真のLTRではなく、本発明のHC2env遺伝子の一部であり、本発明の遺伝子が、HC2プロウイルスのenv遺伝子であることを明確に示している。

#### 【0035】

本発明のHC2env遺伝子において、前記(2)のポリヌクレオチドの配列表の配列番号1の塩基配列における欠失、置換もしくは付加が可能な塩基数としては、例えば、1個~376個であり、1個~282個が好ましく、より好ましくは1個~188個である。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするとは、2つのDNA断片がSambrook Jらによって記載されたような標準的なハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する(文献[Expression of cloned genes in E. coli(

10

20

30

40

50

Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62及び11.45-11.61] 参照)。より具体的には、例えば、下記式で求められる  $T_m$  値を基準としてハイブリダイゼーション及び洗浄（例えば、約  $2.0 \times SSC$ 、 $50^\circ C$ ）を行うことを意味する。

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - (600 / N)$$

（式中、 $N$  はポリヌクレオチドの鎖長であり、 $\%G + C$  はポリヌクレオチド中のグアニン及びシトシン残基の含有量である。）

【0036】

また、本発明の  $HC2env$  遺伝子において、前記(3)のポリヌクレオチドの前記相同性としては、例えば、80%以上であり、85%以上が好ましく、より好ましくは、90%以上である。 10

【0037】

また、本発明の  $HC2env$  遺伝子において、前記(4)及び(5)のポリヌクレオチドがコードするタンパク質は、後述する本発明の  $HC2ENV$  タンパク質である。前記(5)のポリヌクレオチドがコードするタンパク質について、配列表の配列番号2のアミノ酸における欠失、置換もしくは付加が可能な残基数としては、コードされるタンパク質が、マウスモノクローナル抗体である抗  $gp70$  抗体  $12H5.1$ 、又は抗  $Rauscher$  白血病ウイルス  $gp70$  抗体と抗原抗体反応するものであれば、特に制限されないが、例えば、1個～125個であり、1個～94個が好ましく、より好ましくは1個～62個であり、さらにより好ましくは1個～31個である。 20

【0038】

本発明の  $HC2env$  遺伝子において、前記ポリヌクレオチドは、特に限定されず、例えば、DNAであってもよく、RNAであってもよい。但し、RNAにおいては、前記ポリヌクレオチドの配列表の塩基配列は、 $t$  (チミン) 塩基を、 $u$  (ウラシル) 塩基に読み替えるものとする。

【0039】

本発明の  $HC2env$  遺伝子の製造方法は、特に制限されず、例えば、従来公知の方法により前記(1)から(6)のポリヌクレオチドを化学合成して製造してもよく、酵素的にインビボ又はインビトロで製造してもよい。また、本発明の  $HC2env$  遺伝子は、例えば、以下のようにしてクローニングすることができる。まず、例えば、公的ヒトゲノム計画の公認クローン配布者（例えば、Invitrogen社、Research Genetics社）から本発明の  $HC2env$  遺伝子を含む細菌人工染色体 (BAC) クローン（クローン名： $CTC-575C13$ ）を入手する。そして、定法により前記BACのDNAを精製し、例えば、下記プライマー  $011295ORF-L$  及び  $011295ORF-R$ （配列表の配列番号3及び4）を用いて  $HC2env$  遺伝子全長をPCR法で増幅し、適当なプラスミドベクター（例えば、 $pBluescriptII$ 等）挿入することでクローニングできる。必要に応じて挿入した配列の塩基配列決定を行い、配列表の配列番号1と完全に同一であることを確認することが好ましい。 30

【0040】

【化1】

プライマー

配列番号

011295ORF-L: 5'-aga ggg gcc cta gaa aca tgg gtc ccg aag-3' 3

011295ORF-R: 5'-ggt ggg gcc cca gtt att aac aag ggt gtc ata ttg-3' 4

【0041】

また、本発明の  $HC2env$  遺伝子をより選択的に増幅するPCR法に用いることができるプライマー対としては、下記フォワードプライマー  $Primer L$  とリバースプライマー  $Primer R$  との組合せ（配列表の配列番号5及び6）があげられる。

【0042】

## 【化2】

選択的PCR法用プライマー配列番号

Primer L: 5'-atg ggt ccc gaa gcc tgg gtc agg c-3' 5

Primer R: 5'-aat ata agc act ggg tta aga aag gaa agg-3' 6

## 【0043】

本発明のHC2env遺伝子は、配列表の配列番号1の塩基配列において、第69番目(T A)、第524番目(T C)、第586番目(C G)、第592番目(G T)、第887番目(C T)、第970番目(C T)、第1000番目(C T)、第1140番目(A G)、第1143番目(T C)及び第1212番目(C A)に、それぞれ括弧内に示す一塩基多型が存在する。したがって、本発明のHC2env遺伝子は、これらの一塩基多型を含む遺伝子であってもよい。

## 【0044】

本発明のHC2env遺伝子の前記一塩基多型を検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、まず、ヒト染色体DNA上に多数散在する類似遺伝子を避けて本発明の遺伝子のみを選択的にPCR法を用いて増幅し、そして、本発明の遺伝子領域内にハイブリダイズするプライマーを用いて前記PCR産物の塩基配列を決定し、前記一塩基多型を検出する方法等があげられる。また、前記一塩基多型を検出する他の方法としては、前記(1)から(6)のいずれかのポリヌクレオチドの全部若しくは一部と相補的であり、かつ配列表の配列番号1における前記一塩基多型の塩基を含む塩基配列からなるプローブを使用し、ハイブリダイゼーションにより検出する方法があげられる。

## 【0045】

本発明のHC2env遺伝子をより選択的に増幅できるプライマー対である前記Primer L及びPrimer R(配列表の配列番号5及び6)を用いた前記一塩基多型の検出方法の一例を、図14に示す。同図に示すとおり、Primer Lは、本発明の遺伝子5'末端のAをその配列5'末端に有し、Primer Rは、本発明の遺伝子の3'フランキンク領域にハイブリダイズする。Primer Rがハイブリダイズする領域は、繰り返し配列を含まない領域であり、NCBI-BLASTデータベース検索により、配列解析済みのヒト染色体DNA上に完全同一の配列は存在しないことが判明している。すなわち、前記プライマー対を用いることにより、本発明の遺伝子のみを選択的に増幅することが出来る。次に、こうして増幅したHC2env遺伝子を含むDNAを鋳型として、本発明の遺伝子領域内にハイブリダイズするプライマーを用いた塩基配列決定を行い、得られた塩基配列を相互に比較することにより、一塩基多型を検出することが出来る。塩基配列決定に用いる前記プライマーとしては、例えば、配列表の配列番号9から16の塩基配列かななるコード鎖用プライマー及び配列表の配列番号17から24の塩基配列かななる非コード鎖用プライマーがあげられる。これらのプライマーを下記表1に示す。

## 【0046】

## 【表1】

(表1)

コード鎖プライマー: 配列番号	非コード鎖プライマー: 配列番号
5'-TGGGTCAGGCCCTTAAA-3' 9	5'-TCAGTTATTAACAAGGGT-3' 17
5'-CCCATGAAGAGCAACATA-3' 10	5'-TACTGTACCTTTTATGAC-3' 18
5'-TTCAACTCTTCCATAAG-3' 11	5'-CGTACCAATGGCTGCTGA-3' 19
5'-AAACACCCTGACAAAGTT-3' 12	5'-AGAGACTGAGGTGCTTAT-3' 20
5'-GTGCTCTACAATAGGAG-3' 13	5'-GTGAGGTTAAGGAGATGG-3' 21
5'-GTACAGTGGACCAAGG-3' 14	5'-GTCTTAATCCCCATGACA-3' 22
5'-GTAGTTCTTCAAACTGC-3' 15	5'-AACATTTTGGAGCCCTTT-3' 23
5'-AAGTTTAATTTTGGGCC-3' 16	5'-AAGGAGTAGGAAGGCTCA-3' 24

40

50

## 【0047】

次に、本発明のポリヌクレオチドについて説明する。本発明のポリヌクレオチドは、前記(1)から(6)のいずれかのポリヌクレオチドの全部又は一部からなるポリヌクレオチドである。本発明のポリヌクレオチドは、特に限定されず、例えば、DNAであってもよく、RNAであってもよい。但し、RNAにおいては、配列表上の塩基配列は、t(チミン)塩基を、u(ウラシル)塩基に読み替えるものとする。また、本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖であってもよく、二本以上の複数鎖であってもよい。本発明のポリヌクレオチドは、前記(1)から(6)のいずれかのポリヌクレオチドの一部からなるオリゴヌクレオチドを含む。ここで、オリゴヌクレオチドとは、通常、数個～数十個のヌクレオチドが3',5'-ホスホジエステル結合によって重合したものをいうが、本発明において、オリゴヌクレオチドの長さは、特に制限されず、例えば、10mer～50merであって、好ましくは、12mer～32merである。これらのオリゴヌクレオチドは、本発明のHC2env遺伝子を検出するためのプライマー若しくはプローブや、後述するとおり、本発明のHC2env遺伝子の遺伝子転写産物mRNAを検出・測定するためのプライマー若しくはプローブとして使用することができる。

10

## 【0048】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、前記(1)から(6)のいずれかのポリヌクレオチドの塩基配列以外からなる配列であって、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を増幅又は検出するためのプライマー又はプローブとして使用できるポリヌクレオチドを含んでもよい。

20

## 【0049】

本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を増幅又は検出するためのプライマー又はプローブとして使用できる本発明のポリヌクレオチドの具体例としては、配列表の配列番号3から24及び配列番号30から36のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。これらのポリヌクレオチドのプライマー又はプローブとしての使用方法は、特に制限されないが、例えば、前述又は後述のとおりである。

## 【0050】

本発明のポリヌクレオチドをプライマー又はプローブとして使用して本発明のHC2env遺伝子を検出する方法としては、例えば、サザンブロット法、ノザンブロット法、PCR法、塩基配列決定による方法等があげられる。本発明のポリヌクレオチドは、それぞれの検出方法に応じ、必要に応じて、標識物質等で修飾されても良い。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子検出用プローブとして使用する場合、例えば、配列表の配列番号1の塩基配列からなる本発明のHC2env遺伝子全長を鋳型として、ランダムプライマー法にて標識を加えることで作製できる。前記プローブの標識物質としては、例えば、<sup>32</sup>Pのような放射性物質、ジゴキシゲニンのような非放射性化学物質等があげられる。

30

## 【0051】

次に、本発明のmRNAについて説明する。本発明のmRNAは、本発明のHC2env遺伝子の転写産物のmRNAである。本発明のmRNAは、本発明のHC2env遺伝子の転写活性の指標となるから、本発明のmRNAの発現量を測定することにより、例えば、後述のとおり、IGA腎症の病勢を判定したり、予後の予測を行うことができる。

40

## 【0052】

次に、本発明のHC2ENVタンパク質について説明する。本発明のHC2ENVタンパク質は、本発明のHC2env遺伝子の発現産物のタンパク質であって、下記(7)又は(8)のタンパク質である。

(7) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(8) 配列表の配列番号2において、1個若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、マウスモノクローナル抗体である抗gp70抗体12H5.1、又は抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応するタンパク質。

## 【0053】

50

前記(8)のタンパク質について、配列表の配列番号2のアミノ酸における欠失、置換もしくは付加が可能な残基数としては、前記(8)のタンパク質が、マウスモノクローナル抗体である抗gp70抗体12H5.1、又は抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応するものであれば、特に制限されないが、例えば、1個~125個であり、1個~94個が好ましく、より好ましくは1個~62個であり、さらにより好ましくは1個~31個である。

#### 【0054】

本発明のHC2ENVタンパク質は、後述の実施例に示すように、抗gp70マウスモノクローナル抗体12H5.1、あるいは公知の抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体と抗原抗体反応する。したがって、前記12H5.1抗体又は抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体を用いれば、本発明のHC2ENVタンパク質を検出、測定できる。前記12H5.1抗体は、後述のように、マウス内在性異種指向性レトロウイルスenv遺伝子産物gp70に特異的に反応するモノクローナル抗体であり、前記抗Rauscher白血病ウイルスgp70抗体は、内在性及び外来性のマウスレトロウイルスenv遺伝子産物gp70と特異的に反応するポリクローナル抗体である。本発明のタンパク質の製造及び精製方法としては、特に制限されず、従来公知の方法で製造及び精製できるが、例えば、本発明のHC2env遺伝子のC末端に(His)<sub>6</sub>等の標識ペプチドを融合させた発現ベクターを培養細胞株等に導入して発現させ、前記標識ペプチドに対するアフィニティークラム等を用いて精製する方法があげられる。

#### 【0055】

次に、本発明のIgA腎症マーカーについて説明する。本発明のIgA腎症マーカーは、本発明のHC2env遺伝子、本発明のmRNA、本発明のHC2ENVタンパク質、及び、本発明のHC2ENVタンパク質を抗原として抗原抗体反応するヒト抗体からなる群から選択される少なくとも一つからなるIgA腎症マーカーである。

#### 【0056】

本発明のHC2env遺伝子からなるIgA腎症マーカーは、前記一塩基多型を遺伝子マーカーとして、例えば、多型分析に基づくIgA腎症の発症予測診断や、発症のタイプの診断等に利用することができる。また、本発明のmRNA及び本発明のHC2ENVタンパク質からなるIgA腎症マーカーは、前記mRNAの発現量の多寡により血中のHC2ENVタンパク質抗原の濃度が変化し、また、HC2ENVタンパク質の濃度によりこれに対する抗体産生量が増減しそれにより病勢が憎悪したり軽快したりすると考えられるから、被験者の病勢を判定し、又は予後の予測を行って、例えば、強力な治療を行うべきか、経過観察にとどめるべきか等の治療方針の決定に利用できる。

#### 【0057】

さらに、本発明のHC2ENVタンパク質を抗原として抗原抗体反応するヒト抗体(以下、抗HC2ENVタンパク質抗体ともいう。)からなるIgA腎症マーカーは、例えば、IgA腎症や、その他の原発性糸球体疾患、多発性硬化症、糖尿病等の自己免疫機序の関与が疑われる疾患を有する患者を、血清等の体液中に前記抗HC2ENVタンパク質抗体が存在する群とそうでない群とに分類することでき、この分類に基づいて、治療薬・治療法に対する患者の反応性や治療効果を比較することで、前記抗HC2ENVタンパク質抗体を有する患者群と、そうでない患者群とのそれぞれにおいて、有効性の高い治療薬・治療法の選定や開発を可能とする。また、この本発明の抗HC2ENVタンパク質抗体からなるIgA腎症マーカーは、その抗体価もしくは反応特異性に基づき、被験者の病態の重篤度・活動度と比較対照することで、新規の病勢指標として利用できる。

#### 【0058】

次に、本発明の遺伝子発現測定方法について説明する。本発明の遺伝子発現測定方法は、本発明のHC2env遺伝子の遺伝子発現を測定する方法であって、本発明のmRNA又は本発明のHC2ENVタンパク質を測定する遺伝子発現測定方法である。

#### 【0059】

本発明のmRNAを測定する本発明の遺伝子発現測定方法は、例えば、本発明のHC2

10

20

30

40

50

e n v 遺伝子のプライマー又はプローブとして使用する本発明のポリヌクレオチドを用いて行うことが好ましい。そのプライマーの具体例としては、前記 0 1 1 2 9 5 O R F - L と前記 0 1 1 2 9 5 O R F - R (配列表の配列番号 3 と 4) の対、前記 P r i m e r L と前記 P r i m e r R (配列表の配列番号 5 と 6) の対、及び、下記 H C 2 e n v 0 1 1 L 1 と下記 H C 2 e n v 0 1 1 R (配列表の配列番号 7 と 8) の対等があげられる。これらの中でも、前記プライマー対としては、H C 2 e n v 0 1 1 L 1 と H C 2 e n v 0 1 1 R の対が好ましい。前記 R T - P C R 法による m R N A の測定は、リアルタイム R T - P C R 法や、コンペティティブ R T - P C R 法等であってもよく、その方法及び試薬は、特に制限されず従来公知のものを利用できる。また、前記ノーザンブロット法には、例えば、配列表の配列番号 1 7 ~ 2 4 の塩基配列からなる本発明のポリヌクレオチドをプローブとして使用でき、使用する試薬等は、特に制限されず従来公知のものを利用できる。

【 0 0 6 0 】

【 化 3 】

### プライマー

### 配列番号

HC2env011L1: 5'-tag aaa cat ggg tcc cga ag-3'

7

HC2env011R : 5'-tca gtt att aac aag ggt gtc ata ttg-3'

8

【 0 0 6 1 】

測定対象となる H C 2 e n v 遺伝子の m R N A は、例えば、被験者の末梢血単核球から回収することができる。その回収方法は、特に制限されず、例えば、前記末梢血単核球から T R I z o l 試薬 ( I n v i t r o g e n 社製 ) 等を用いた通常の方法により総 R N A の一部として抽出する方法や、前記末梢血単核球をフィットヘマグルチニン等のレクチンにより刺激した後に、上記と同様にして抽出する方法があげられる。

【 0 0 6 2 】

本発明の H C 2 E N V タンパク質を測定する本発明の遺伝子発現測定方法は、例えば、本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原とする抗体を用いて、従来公知の免疫学的測定方法により行うことができる。前記免疫学的測定方法としては、特に制限されないが、ウエスタンプロット、E L I S A、サンドウィッチ E L I S A 等があげられる。前記本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原とする抗体は、本発明の H C 2 E N V タンパク質を用いて従来公知の方法で作製してもよいが、前記抗 g p 7 0 マウスモノクローナル抗体 1 2 H 5 . 1、又は、抗 R a u s c h e r 白血病ウイルス g p 7 0 抗体を使用してもよい。

【 0 0 6 3 】

本発明の m R N A の発現量の多寡により、血中の H C 2 E N V タンパク質抗原の濃度や、本発明の H C 2 E N V タンパク質に対する抗体産生量に変化し、それにより病勢が憎悪したり軽快したりすると考えられる。したがって、本発明の遺伝子発現測定方法によれば、被験者の病勢を判定し、あるいは、予後の予測を行って、例えば、強力な治療を行うべきか、経過観察にとどめるべきか等の治療方針に役立てることができる。

【 0 0 6 4 】

次に、本発明のヒト抗体測定方法について説明する。本発明のヒト抗体測定方法は、本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原とするヒト抗体 (抗 H C 2 E N V タンパク質抗体) の測定方法であって、本発明の H C 2 E N V タンパク質と前記ヒト抗体とを抗原抗体反応させ、さらに、前記ヒト抗体と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを抗原抗体反応させて本発明の H C 2 E N V タンパク質と前記ヒト抗体と前記標識抗体との複合体を測定する方法である。

【 0 0 6 5 】

本発明のヒト抗体測定方法において、具体的な測定方法は、従来公知の方法を利用でき、特に制限されないが、例えば、前記本発明の H C 2 E N V タンパク質は、固相に固定化されていることが好ましい。この測定方法の一例を図 1 5 に示す。同図に示すとおり、前記本発明の H C 2 E N V タンパク質を抗原 1 として一般的な方法によりプラスチックプレートやフィルター膜等の固相に固定化し、この固定化抗原 1 と前記試料中の測定対象であ

るヒト抗体 2 とを反応させた後、標識化抗体（標識化二次抗体）3 を、前記ヒト抗体 2 と免疫反応させて結合させる。そして、前記標識化抗体 3 の標識を測定することにより、試料中の前記抗原 1 に反応する前記ヒト抗体 2 の有無やその定量を行うことができる。前記試料としては、例えば、ヒトの血液、血清、血漿、唾液、関節液、脳脊髄液等のヒト免疫グロブリンが存在する体液を用いることができる。前記標識化抗体 3 の標識（標識化抗体を用いた測定法）としては、例えば、放射性標識（放射免疫測定法（RIA））、酵素標識（酵素免疫定量法（ELISA））又は蛍光標識（蛍光免疫測定法（FIA））等があげられる。

#### 【0066】

本発明のヒト抗体測定方法により、例えば、前記抗HC2ENVタンパク質抗体の検出や前記抗HC2ENVタンパク質抗体の抗体価の定量等を実施できる。さらに、本発明のヒト抗体測定方法によれば、例えば、IgA腎症や、その他の原発性糸球体疾患、多発性硬化症、糖尿病等の自己免疫機序の関与が疑われる疾患を有する患者を、血清等の体液中に抗HC2ENVタンパク質抗体が存在する群とそうでない群とに分類することができる。この分類に基づいて、治療薬・治療法に対する患者の反応性や治療効果を比較することで、前記抗HC2ENVタンパク質抗体を有する患者群と、そうでない患者群とのそれぞれにおいて、有効性の高い治療薬・治療法の選定や開発が可能となる。また、本発明の測定方法により、被験者の抗HC2env遺伝子産物抗体の抗体価もしくは反応特異性を得ることができるが、これを被験者の病態の重篤度・活動度と比較対照し、新規の病勢指標とすることができる。

10

20

#### 【0067】

次に、本発明のIgA腎症検査キットについて説明する。本発明のIgA腎症検査キットは、本発明の遺伝子発現測定方法により本発明のHC2env遺伝子の遺伝子発現を測定する検査キットであって、プライマー若しくはプローブとして使用する本発明のポリヌクレオチド、又は、本発明のHC2ENVタンパク質を抗原とする抗体を含むIgA腎症の検査キットである。本発明のIgA腎症検査キットは、必要に応じ、前記本発明の遺伝子発現測定方法に必要な従来公知の試薬、例えば、総RNA抽出試薬、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、標識化合物、バッファー等を含むことが好ましい。

#### 【0068】

本発明のIgA腎症検査キットは、その他の態様として、本発明のヒト抗体測定方法により抗HC2ENVタンパク質抗体を測定するIgA腎症検査キットであって、本発明のHC2ENVタンパク質と、前記ヒト抗体を抗原とする標識抗体とを含むIgA腎症の検査キットである。本発明のIgA腎症検査キットは、必要に応じ、前記本発明のヒト抗体測定方法に必要な従来公知の試薬、例えば、標識化合物、発色試薬、バッファー等を含むことが好ましい。

30

#### 【0069】

次に、本発明の医薬品について説明する。本発明の医薬品は、IgA腎症の治療及び予防の少なくとも一方のための医薬品であって、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子と相補的な塩基配列からなり、本発明のHC2env遺伝子の転写若しくはタンパク質の発現を抑制可能なポリヌクレオチドを含む医薬品である。すなわち、この医薬品は、例えば、アンチセンス法、siRNA法、miRNA法等のRNAi（RNA干渉）を適用した医薬品である。本発明の医薬品において、薬学的に許容できる補助剤や賦形剤を含むことが好ましい。

40

#### 【0070】

本発明の医薬品は、その他の態様として、IgA腎症の治療及び予防の少なくとも一方のための医薬品であって、本発明のHC2ENVタンパク質のアミノ酸配列における、抗HC2ENVタンパク質抗体に対する抗原決定基（エピトープ）のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する医薬品である。なお、本発明の医薬品は、前記ポリペプチドに加え又はそれに代えて、抗HC2ENVタンパク質抗体と抗原抗体反応する低分子化合物を含んでいても良い。本発明の医薬品において、薬学的に許容できる補助剤や賦形剤を含むこと

50

が好ましい。

【0071】

次に、本発明の発現ベクターについて説明する。本発明の発現ベクターは、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を標的細胞に導入するための発現ベクターであって、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子と、前記遺伝子の発現に必要な調節配列とを含み、前記遺伝子が前記調節配列に発現可能に作動的に連結されている発現ベクターである。本発明の発現ベクターを用いれば、本発明のHC2ENVタンパク質の全部又は一部を発現するように標的細胞を形質転換することができる。そして、前記形質転換により製造される形質転換細胞は、例えば、後述するとおり、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞として利用できる。この場合、本発明の発現ベクターにおいて、前記本発明のHC2env遺伝子の一部としては、特に制限されないが、本発明のHC2ENVタンパク質のレセプター結合ドメイン(RBD)が含まれることが好ましい。

10

【0072】

本発明の発現ベクターは、例えば、一本鎖、二重鎖、環状又はスーパーコイルのDNA分子やRNA分子等であってよい。また、本発明の発現ベクターの製造方法は、特に制限されず、例えば、公知の調節配列を備えた発現ベクターに、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を前記調節配列に発現可能に挿入する方法があげられる。前記公知の発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等のウイルスベクターや、pBK-CMV、pcDNA3、pZeoS V(インビトロゲン社製)等の非ウイルスベクターがあげられる。前記調節配列とは、細胞内において、作動的に連結された本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子の発現に必要な塩基配列をであって、例えば、真核細胞に適した調節配列としては、プロモーター、ポリアダニル化シグナル、エンハンサー等があげられる。前記作動的に連結とは、各構成要素が機能を果たすことができるように並置していることを意味する。

20

【0073】

次に、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターについて説明する。本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、前記ウイルス粒子の被膜タンパク質が、本発明のHC2ENVタンパク質の全部又は一部を含む遺伝子導入用レトロウイルスベクターである。前記本発明のHC2ENVタンパク質の一部としては、特に制限されないが、本発明のHC2ENVタンパク質のレセプター結合ドメイン(RBD)が含まれることが好ましい。本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、後述のとおり、例えば、遺伝子治療に使用することができる。また、その他、研究目的や医薬品等の生産のために標的細胞に遺伝子を導入することに使用できる。

30

【0074】

レトロウイルスは、その粒子中のRNAゲノムを逆転写酵素により二本鎖DNAへと変換し、DNA化したウイルスゲノムは、プロウイルスとして感染宿主細胞染色体に組込まれる。したがって、ウイルスゲノム中に異種遺伝子を組込んだ遺伝子組換えレトロウイルスを用いて、任意の目的遺伝子を標的細胞染色体に組込み、この遺伝子を永続的に保有する形質転換細胞を得ることが可能である。レトロウイルスは、安定した遺伝子導入の手段として、研究目的や治療目的等に広く活用されている。遺伝子導入用レトロウイルスは、RNAのウイルス粒子への取込みに必要な配列と目的遺伝子とを含んだ組換えRNAゲノムを、ウイルス粒子形成に必要なタンパク質、ならびに、感染宿主細胞内のRNAゲノム逆転写及び染色体組込みに必要なタンパク質を産生している細胞内で発現させることにより作製できる。ウイルス粒子の形成に必要なタンパク質がgag遺伝子産物であり、RNAゲノムの逆転写及び染色体組込みに必要なタンパク質がpol遺伝子産物である。env遺伝子産物は、ウイルス産生細胞から出芽した感染性ウイルス粒子がどのような標的細胞に吸着・侵入できるかを決定する。

40

【0075】

50

従来の遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、マウス細胞に遺伝子導入を行う場合には、同種指向性マウスレトロウイルス、中でもモロニー白血病ウイルス等のenv遺伝子が、粒子表面タンパク質の形成に用いられている。また、ヒト細胞に遺伝子導入しようとする場合には、異種指向性(xenotropic)あるいは両指向性(amphotropic)マウスレトロウイルスのenv遺伝子が用いられており、さらに、より広範囲の細胞への感染性を確保するため、ウシ水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus: VSV)のウイルス粒子表面タンパク質を用いることもある。しかしながら、このような組換えウイルスベクターをヒトに接種する場合、接種されるウイルスベクターの粒子表面タンパク質である異種由来レトロウイルスのenv遺伝子産物又はVSVウイルス粒子表面タンパク質に対して、免疫反応が起こることが知られている。また、ウイルス粒子表面タンパク質をヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)やヒト免疫不全症ウイルス(HIV)等のヒトレトロウイルスのものに置換した場合であっても、これらの感染症ヒトレトロウイルスは内在性のものではなく、体外から感染するものであるため、そのenv遺伝子産物に対しては免疫反応が起こる。実際、HTLVやHIVの感染に対して中和抗体産生を含む宿主免疫反応が生じることが知られている。

10

## 【0076】

それに対し、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターでは、粒子表面タンパク質としてHC2ENVタンパク質が発現する。HC2env遺伝子が元々ヒト染色体上に存在しているため、HC2ENVタンパク質に対しては、自己免疫性疾患患者を除き、通常免疫反応は起こらない。したがって、本発明のHC2ENVタンパク質を粒子表面タンパク質として有する本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、たとえ同ベクターを反復投与しても中和抗体産生等の免疫反応は起こらず、同一ベクターを用いて繰り返し遺伝子導入することが可能となる。

20

## 【0077】

本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターの製造方法は、特に制限されず、ウイルス粒子表面タンパク質が本発明のHC2ENVタンパク質の全部又は一部を含むものとする他は従来公知の方法で製造でき、例えば、図16に示すようにして製造できる。まず、導入したい遺伝子4、パッケージングシグナル(配列)及びLTR等を含む遺伝子導入プラスミド5を作製する。前記遺伝子導入プラスミド5としては、例えば、pCMV(Clonotech社製)等を使用できる。次に、この遺伝子導入プラスミド5をパッケージング細胞6に導入する。前記パッケージング細胞6は、本発明のHC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を有し、同遺伝子産物であるHC2ENVタンパク質の全部又は一部を含むタンパク質を表面タンパク質7として発現する細胞である。そして、前記パッケージング細胞6から発芽した本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクター8を回収する。前記パッケージング細胞6は、さらに、gag遺伝子及びpol遺伝子が発現することが好ましい。前記導入目的遺伝子4の種類は、特に制限されない。

30

## 【0078】

次に、本発明の遺伝子導入方法について説明する。本発明の遺伝子導入方法は、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターを使用した遺伝子導入方法である。本発明の遺伝子導入方法は、特に制限されず、従来のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法において、前記レトロウイルスベクターに代えて、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターを使用して行うことができる。本発明の遺伝子導入方法によれば、例えば、前述のとおり、中和抗体産生等の免疫反応を抑制しつつ繰り返し遺伝子導入することができ、例えば、遺伝子治療に有用である。

40

## 【0079】

次に、本発明の遺伝子導入細胞の製造方法について説明する。本発明の遺伝子導入細胞の製造方法は、本発明の遺伝子導入方法により目的遺伝子を標的細胞に導入する工程を含む遺伝子導入細胞の製造方法である。前記目的遺伝子は特に制限されない。また、前記標的細胞も特に制限されず、例えば、インビボ又はインビトロのヒト細胞があげられる。

## 【0080】

50

次に、本発明の遺伝子導入用キットについて説明する。本発明の遺伝子導入用キットは、本発明の発現ベクターにより形質転換されたパッケージング細胞と、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キットである。

#### 【0081】

また、本発明の遺伝子導入用キットは、その他の態様として、本発明の発現ベクターと、配列を有する遺伝子導入プラスミドとを含む遺伝子導入用キットであってもよい。本発明の遺伝子導入用キットにおいて、さらに、gag及びpol遺伝子の少なくとも一方を発現するプラスミドを含むことが好ましい。例えば、本発明の発現ベクターと前記gag及びpol遺伝子を発現するプラスミドとにより適当な細胞を形質転換することで、本発明の遺伝子導入用ウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞を製造することができ

10

#### 【0082】

以下に、本発明の実施例によりさらに本発明について説明する。これらの実施例は、本発明を何ら限定するものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0083】

(IgA腎症患者系球体沈着抗原の検出)

IgA腎症確定診断のために施行された腎生検により採取された患者組織の一部を、直ちにドライアイスを加えたイソペンタン中で凍結固定し、凍結保存した。クリオスタットで作製された凍結組織切片は、95%エタノールで再固定後、免疫複合体中の抗原構造露出化のため6M尿素液(6M urea, 0.1M glycine-HCl, pH 3.5)で4、1時間処理したのち、各種既知ウイルス抗原に特異的なマウスのモノクローナル抗体と反応させた。各抗ウイルス抗体の腎組織との反応は、FITC標識抗マウス免疫グロブリン二次抗体により検出した。陰性対照として、一次抗体の代わりに希釈液のみと反応させ、その後、前記蛍光標識二次抗体を反応させた切片を用意した。その結果、マウス内在性異種指向性レトロウイルスenv遺伝子産物gp70に対するモノクローナル抗体12H5.1のみが、IgA腎症患者由来の組織の一部(約30%)と反応した。その結果を図1に示す。同図の3つの写真は、IgA腎症患者系球体内に沈着する抗原分子を、前記12H5.1抗体及びFITC標識抗マウスIgG二次抗体により検出した代表的な3例を示している。同図に示すとおり、系球体メサンジウム領域に強い顆粒状の蛍光が認められた。

20

30

#### 【0084】

前記抗gp70抗体クローン12H5.1は、文献[Tabata, N. et al. Establishment of monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibodies from MRL/lpr lupus mice and induction of glomerular gp70 deposition and pathology by transfer into non-autoimmune mice. 『MRL/lprループスマウスからの抗レトロウイルスgp70モノクローナル自己抗体の樹立と、非自己免疫マウスへの導入による系球体のgp70沈着と病変の誘導』 J. Virol. 74: 4116-4126, 2000.]に開示されるものであり、系球体腎炎を含む自己免疫病変を自然発症するMRL/MpJ-lpr/lprマウスから多数のハイブリドーマ細胞を作製し、ワクシニアウイルスベクターを用いて強制発現させたマウス内在異種指向性レトロウイルスenv遺伝子産物(gp70)との反応性により、抗gp70抗体産生クローンとして単離したものである。

40

#### 【0085】

(前記マウスenv遺伝子(gp70)に相同なヒトゲノム遺伝子の検出)

ヒトIgA腎症患者の系球体病変に存在する、マウスレトロウイルスenv遺伝子産物と特異的に反応する抗体により検出される抗原をコードする遺伝子を確認するため、前記マウスレトロウイルスenv遺伝子配列に基づき作製したプローブを用い、ヒトゲノムDNAライブラリーに対するサザンブロット解析を行った。

#### 【0086】

前記プローブは、12H5.1抗体のスクリーニングに用いたマウス内在性異種指向性

50

レトロウイルス cDNA クローン ( p G P 6 - 8 ) 由来の e n v 遺伝子全長を含むプラスミドをテンプレートとし、配列番号 2 5 ( g g a a g a a g a a g g a c a a g a c t g ) の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして作製した<sup>3 2</sup> P 標識 DNA プローブを使用した。図 2 に、前記マウス内在性異種指向性レトロウイルス e n v 遺伝子産物のアミノ酸配列及び同遺伝子の塩基配列を示す。同図における下線部を付した塩基配列が、前記プローブの配列である。

【 0 0 8 7 】

また、前記 DNA ライブラリーは、I g A 腎症患者及び健常人ボランティアより、書面による説明の上、署名・捺印入りの同意書を得て、末梢血約 2 0 m l の提供を受け作製した。前記末梢血を比重遠心法により単核球を分離し、従来公知の方法により、タンパク質分解酵素による消化とクロロフォルム・フェノール抽出との反復によりゲノム DNA を調製し、これを、制限酵素 S a u 3 A I の限定分解後、E M B L 3 フェージベクターに組み込むことで、前記ヒトゲノム DNA ライブラリーとした。

10

【 0 0 8 8 】

前記ヒトゲノム DNA ライブラリーに対して行ったサザンプロットの結果を、図 3 に示す。同図において、上に示す番号はフェージのクローン名であり、B 及び E は、同クローンをそれぞれ B a m H I ( 同図において B ) 及び E c o R I ( 同図において E ) で完全分解した試料であることを示す。同図に示すとおり、マウス内在性異種指向性レトロウイルス e n v 遺伝子と極めて高い相同性を示すごく少数の遺伝子配列が、ヒトゲノム DNA 中に存在することが確認できた。

20

【 0 0 8 9 】

( データベース検索によるヒト内在性レトロウイルス H C 2 e n v 遺伝子の同定 )

マウス内在性異種指向性レトロウイルス e n v 遺伝子産物のアミノ酸配列と相同性を示すアミノ酸配列をコードするヒトゲノム DNA 中の配列を、National Center for Biotechnology Information ( N C B I , National Institutes of Health , U . S . A . ) に登録されているヒト染色体の細菌人工染色体 ( B A C ) コンティグ塩基配列データベースを利用し、T B A S T N により検索した。前記検索条件は、前記マウス e n v 遺伝子産物 g p 7 0 のアミノ酸配列と全体として 3 0 ~ 4 0 % の相同性を示し、その中でも、前記 1 2 H 5 . 1 抗体のエピトープを含む N - 末端領域により高い相同性を示すものを選択した。その結果、配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子として、配列表の配列番号 1 の塩基配列からなるヒト内在性異種指向性レトロウイルス H C 2 e n v 遺伝子を同定した。前記データベースを利用して検索した結果、配列表の配列番号 1 の塩基配列からなる完全長の前記ヒト H C 2 e n v 遺伝子は、図 4 に示すとおり、第 1 9 染色体短腕の 1 9 p 1 3 . 1 領域付近に存在することが示された。一連の作業を以下により詳細に記す。

30

【 0 0 9 0 】

マウス内在性異種指向性レトロウイルス e n v 遺伝子産物のアミノ酸配列を Query として、N C B I に登録されているヒトゲノムコンティグ塩基配列データベースを T B L A S T N により相同性検索した。この際、Query として用いた配列は、前記 1 2 H 5 . 1 抗体が反応することが示された、マウス内在性異種指向性レトロウイルス e n v 遺伝子産物 ( A c c e s s i o n N o . X 5 9 3 0 5 ) の N 末端 1 9 1 アミノ酸であり、そのアミノ酸配列は以下の通りである ( 配列表の配列番号 2 6 ) 。

40

【 0 0 9 1 】

【 化 4 】

MEGSAFSKPLKDKINPWGPLIVMGI LVRAGASVQRDSPHQIFNVTWRVTN  
LMTGQTANATSL LGTMDTFPKLYFDLCLDVG DYWDDPEPDIGDGCRTPG  
GRRRRLRYDFYVCPGHTVPI GCGGPGEGYCGKWCETTQQAYWKPSSSWD  
LISLKRGNTPKDQGPCYDSSVSSGVQGATPGGRCNPLVLEF ( 配列番号 2 6 )

50

## 【0092】

その結果、36個の塩基配列がリストアップされた。これらの塩基配列のなかに、ガンマレトロウイルス（マウス内在性異種指向性レトロウイルスも、この仲間に分類される）のenv遺伝子産物に特徴的な配置をとったシステイン残基、及びアミノ酸モチーフ（FYLCF）を有する配列が複数見出された。

## 【0093】

次に、見出した塩基配列が、既知のいかなるウイルス遺伝子産物に類似した蛋白質をコードするのかを知るため、検索によって得られたアミノ酸配列をQueryとして、GenBankのnrデータベースをTBLASTN検索した。その結果、見出した塩基配列は、文献[Kabat, P., M. Tristem, R. Opavsky, & J. Pastorek. Human endogenous re 10  
trovirus HC2 is a new member of the S71 retrovirus subgroup with a full-length pol gene. 『ヒト内在性レトロウイルスHC2は、完全長pol遺伝子をもつS71レトロウイルスのサブグループである』Virology 226: 83-94, 1996.]において記載された、ヒト内在性レトロウイルスHC2（Accession No. Z70664）の「3'-LTR領域」に極めて類似することが判明した。この結果から、従来env遺伝子を持たないと報告されたHC2の、「3'-LTR領域」と報告された部分が、実はenv遺伝子領域に相当し、マウス内在性異種指向性レトロウイルスenv遺伝子産物と類似したアミノ酸配列をもつ分子をコードする可能性が示唆された。

## 【0094】

Kabatらが報告したHC2（Accession No. Z70664）において 20  
誤って「3'-LTR領域」とされた部分に存在するオープンリーディングフレームを、ORF Finder（NCBI）にて検索したところ、以下のようなアミノ酸配列を持つタンパク質をコード出来ることが判明した（配列表の配列番号27）。

## 【0095】

## 【化5】

LKRTSYCHPHHADGSESGWHSFLDSSLHQKGEQSPARNMDPQA  
WAMPLKTAHKSSEAIGLIIFIYLFCLFPPITPSAPLYSFLLTSTFT  
VCFANTTWKAGTSKEVSFAVDLCALFPEPAQTHEKQPNLPVMGAG  
NVNLAAGSRHTGSRTRCGSSKGAEKGLQSVDFYLCPGNHPDSSCLD  
SYQFFCPHWSCVTLATYPGGLTWSSTL （配列番号27） 30

## 【0096】

そこで、ヒト染色体DNA上の類似塩基配列を系統的に探索するために、この配列をQueryとして、NCBIヒトゲノムコンティグ塩基配列データベースを、再度TBLASTNにより相同性検索した。その結果、96個の塩基配列がリストアップされた。これらの塩基配列及びその3'側2kbpを含む領域のオープンリーディングフレームを探索したところ、ヒトゲノムコンティグデータベースに含まれる第19番染色体ゲノムコンティグ上に、626アミノ酸からなる、マウス白血病ウイルスenv遺伝子産物類似のポリペプチドをコード出来る塩基配列（すなわち、本発明のHC2env遺伝子）を新規に同定した。なお、この塩基配列は、GenBank Accession NT\_0112 40  
95（region: 11743043 - 11744923）として、NCBIから入手することが出来る。但し、この塩基配列から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列については、これまで一切報告がなされていない。

## 【0097】

（HC2env遺伝子を含む細菌人工染色体（BAC）クローンの入手）

HC2env遺伝子が、BACクローンCTC-575C13の挿入ヒト染色体断片上に存在することが、NCBIヒトゲノムコンティグ塩基配列データベースの記載により判明したので、このBACクローンを公的ヒトゲノム計画の公認クローン配布者であるResearch Genetics社（Invitrogen社）から購入した。BAC DNAの精製は、Large Construct Kit（QIAGEN K. K. 50

、Tokyo)にて行った。精製したBAC DNAは、その挿入配列両端の塩基配列を決定し、GenBankデータベースに登録済みのBACクローンCTC-575C13挿入塩基配列(Accession No. AC078899)に照合して、間違いのないことを確認した。この際用いたベクター上の配列決定用プライマーT7及びSp6は、下記のとおりである(配列表の配列番号28及び29)。

【0098】

【化6】

プライマー	配列番号
T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	28
Sp6: 5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'	29

10

【0099】

(HC2env遺伝子の単離)

上記のように調製したBAC DNAをテンプレートとし、下記プライマー対011295ORF-L及び011295ORF-R(配列表の配列番号3及び4)を用いてHC2env遺伝子オープンリーディングフレーム全長をPCR法にて増幅し、プラスミドベクターpSC11-MCS/Hisにサブクローニングした。このようにして得たプラスミドクローンのうち、独立した5クローンに関して挿入全長の塩基配列を決定した。その結果、それらの挿入配列が互いに100%一致すること、また、配列表の配列番号1に記載したHC2env遺伝子の塩基配列と100%一致することが確認された。

20

【0100】

【化7】

プライマー	配列番号
011295ORF-L: 5'-aga ggg gcc cta gaa aca tgg gtc ccg aag-3'	3
011295ORF-R: 5'-ggt ggg gcc cca gtt att aac aag ggt gtc ata ttg-3'	4

【0101】

(真性3'LTR及び5'LTRの同定と確認)

上述のとおり、過去の報告において3'LTRとされていた部分が実際にはLTRではなく、本発明のHC2env遺伝子が存在することを支持する証拠として、本発明者らは、ヒト染色体上における本発明のHC2env遺伝子の終始コドンの下流に、その塩基配列の特徴から真性のLTRであると判断される構造、すなわち、3'LTRを見出し、さらに、本発明のHC2env遺伝子と同じ染色体上のgag-pol遺伝子領域上流に、前記3'LTRと96%の相同性を持つ5'LTRを確認した。これらのLTRの配列及びその構造を図5に示す。同図に示すとおり、新たに見出した3'LTR及び5'LTRには、レトロウイルスLTRの特徴であるCCAATボックスやTATAボックス、及びポリアデニル化シグナルが存在する。

30

【0102】

次に、新たに見出された前記3'LTR及び5'LTRが、実際に機能しているLTRであることを、HC2env遺伝子の3'RACE(rapid amplification of cDNA ends)法、5'RACE法、及びcDNA全長増幅により確認した。その結果をまとめたものを図6に示す。同図に示すとおり、HC2プロウイルスから発現するmRNAの3'末端の構造は、新たに見出された前記3'LTR内のポリアデニル化シグナル部位と一致し、5'末端の構造も新たに見出された前記5'LTR内の転写開始部位構造と一致した。さらに、本発明のHC2env遺伝子が発現するに際しては、新たに同定した5'LTRより転写されたmRNA前駆体が、HC2env遺伝子上流でスプライシングを受けて本発明のHC2env遺伝子配列全体を含む成熟mRNAが形成されることも確認された(図6参照)。

40

50

## 【0103】

ここで、各RACE反応に用いたcDNAは、ヒト甲状腺総RNAからSMART RACE cDNA増幅キット(Becton Dickinson Bioscience社製)を用いて作製した。SMART RACE法のマニュアルに従ってPCR反応を行い、得られた各断片をTOPOクローニングキット(Invitrogen社製)を用いて同キットのプラスミドベクターにサブクローニングし、各挿入断片の塩基配列をベクター上に設定したプライマーを用いて解析した。また、本発明のHC2env遺伝子発現産物全長の増幅に用いたcDNAは、ヒト甲状腺総RNAからSuper script II(Invitrogen社製)を用いて作製した。env遺伝子の3'RACE法に用いたプライマーは、HC2env3RACE1であり、pol遺伝子の3'RACE法に用いたプライマーは、HC2pol3RACE1であり、5'RACE法に用いたプライマーは、5RACEpol-envであり、cDNAの全長増幅に用いたプライマー対は、HC2PV-L及びHC2PV-Rであり、それぞれのプライマーの塩基配列は、下記のとおりである(配列番号30~34)。

10

## 【0104】

## 【化8】

<u>RACE用プライマー</u>	<u>配列番号</u>
HC2env3RACE1: 5'-GCC ATT GGT ACG GCT GCC CTG GTT CA-3'	30
HC2pol3RACE1: 5'-GTG CAC CCC TTA CCA GGC TGG GTT CT-3'	31
5RACEpol-env: 5'-CCG TTG GCG TCG TGA GGA TGA TGG TGT G-3'	32
<u>全長増幅用プライマー</u>	
HC2PV-L: 5'-TCT AAC TCG CTC GGG TAT AAC ATT-3'	33
HC2PV-R: 5'-GAG CTC AAA CGC AAC GCA ACA ATT CTA C-3'	34

20

## 【0105】

このように、従来ヒト内在性レトロウイルスHC2の3'LTRと考えられていた部分は、真のLTRではなく、本発明のHC2env遺伝子の一部であり、また、本発明のHC2env遺伝子全体を含むmRNAの発現が認められた。したがって、本発明の遺伝子が、HC2プロウイルスのenv遺伝子であることは疑いを容れない。

30

## 【実施例2】

## 【0106】

(HC2env遺伝子発現産物mRNAの検出)

本発明のHC2env遺伝子がヒト組織において発現していることを、HC2env遺伝子発現産物mRNAをRT-PCR法により検出して確認した。各種ヒト組織より通常の方法によって抽出した総RNAを鋳型として、Super script II(Invitrogen社製)によりcDNAを作製した。得られたcDNAを鋳型とし、下記プライマー対HC2env011L1及びHC2env011R(配列表の配列番号7及び8)を使用した通常のRT-PCR法によりHC2env遺伝子cDNAの増幅を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分離後、エチジウム・ブロマイド染色により検出した。

40

## 【0107】

## 【化9】

<u>プライマー</u>	<u>配列番号</u>
HC2env011L1: 5'-tag aaa cat ggg tcc cga ag-3'	7
HC2env011R: 5'-tca gtt att aac aag ggt gtc ata ttg-3'	8

## 【0108】

その結果を図7に示す。同図において、RTaseの行に+又は-で示されているのは、それぞれの試料となる各組織の総RNAにSuper script II逆転写酵素を加えた場合と加えない場合であり、ゲノムDNAの混入によるPCR産物検出を否定す

50

るための陰性対照である。同図に示すとおり、HC2env遺伝子発現産物であるmRNAが、腎臓、前立腺、肺等に特異的に検出できた。

#### 【実施例3】

##### 【0109】

(HC2env遺伝子産物タンパク質であるHC2ENVタンパク質の発現)

実施例1でクローニングされた前記HC2env遺伝子を、図8に示すワクシニアウイルストランスファーベクターpSC11-MCS/Hisに挿入し、前記HC2env遺伝子の全長を発現する組換えワクシニアウイルスを作製した。前記pSC11-MCS/Hisは、文献[Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4<sup>+</sup> T-cell epitope in p15<sup>ga</sup> of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting to the plasma membrane in immunogenicity. 『フレンドマウス白血病ウイルスのp15<sup>ga</sup>における防御性CD4<sup>+</sup>T細胞エピトープの同定と、MAタンパク質の細胞膜への局在がその免疫原性に果たす役割』J. Virol. 78: in press, 2004.]に開示されるワクシニアウイルストランスファーベクターであって、C-末端に(His)<sub>6</sub>標識を融合させることが可能なワクシニアウイルス発現ベクターである。前記ベクターに、前記HC2env遺伝子の3'側末端が前記ポリヒスチジン[(His)<sub>6</sub>]残基とインフレームとなるように挿入し、HC2env遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスベクターを得た。

##### 【0110】

組換えHC2ENVタンパク質の発現確認は、上記組換えワクシニアウイルスを感染させたサルCV-1細胞株を、(His)<sub>6</sub>に対する市販抗体を用いて染色する間接蛍光抗体法によって行った。即ち、上記組換えワクシニアウイルスを感染させたCV-1細胞を、3.7%フォルムアルデヒドで固定し、0.4% Triton X-100で細胞膜除去処理する。(His)<sub>6</sub>に対する抗体(商品名His-probe, Santa Cruz Biotechnology社製)を反応させ、洗浄後、さらにFITC標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Goat Anti-Rabbit IgG, H+L chain specific, FITC Conjugate, Southern Biotechnology Associates社製)を反応させた。洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果を図9に示す。同図に示すとおり、同図中央から右上半分の領域のウイルス感染細胞において強い蛍光が検出され、前記組換えHC2ENVタンパク質の発現が確認された。一方、同図左下のウイルス非感染細胞には、抗体の結合による蛍光の局在は見られなかった。

##### 【0111】

前記組換えワクシニアウイルスが感染したCV-1細胞内で発現する組換えHC2ENVタンパク質の精製は、次のように行った。まず、前記感染細胞を回収した後、細胞可溶化バッファー(例えば、6M Guanidine-HCl, 20mM NaPO<sub>4</sub> pH7.8, 500mM NaCl)で処理し、細胞を可溶化した。次に、注射針を通して細胞ゲノムDNAを細断し、さらに遠心して上清を回収した。そして、回収した上清から、市販のニッケルキレート・レジンを充填したカラムを用いて、(His)<sub>6</sub>標識HC2ENVタンパク質を精製した。

#### 【実施例4】

##### 【0112】

(HC2env遺伝子のキメラ遺伝子産物の発現と検出)

HC2env遺伝子全長を含むプラスミドをテンプレートとし、下記プライマー対HC-start-RI及びHC2-Sma-3(配列表の配列番号35及び36)を用いて、HC2env遺伝子の開始コドンからレセプター結合ドメイン(Receptor-Binding Domain: RBD)までを含む領域(配列表の配列番号2の第1~217番目のアミノ酸配列をコードする配列表の配列番号1の第1~651番目の塩基配列)をPCR法により増幅した。

##### 【0113】

10

20

30

40

50

配列表の配列番号2に示すHC2env遺伝子産物のアミノ酸配列を、公知の異種指向性マウス白血病ウイルス及び両指向性マウス白血病ウイルスのenv遺伝子産物のアミノ酸配列と比較すると、75番目のシステイン(Cys)を含むAsp-Leu-Cys-Val(又はAsp)-Leuの配列が、マウス白血病ウイルスに共通して保存されている配列と等しいこと、132番目のCysを含むAsp-Phe-Tyr-Leu(又はVal)-Cys-Pro-Glyの配列も、マウス白血病ウイルスに共通して保存されている配列と等しいこと、186番目のCysの下流に続くAsn-Pro-Leuの配列も、Cysを含めてマウス白血病ウイルスと全く共通であること、206番目のSerから始まるSer-Trp-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyrの配列と、その下流で220番目のThrから始まるThr-Met-Pheの配列も、マウス白血病ウイルスと完全に一致すること、更に、235番目のProから始まるPro-Lys(又はArg)-Pro-Ile-Gly-Proの配列、292番目のAsnから始まるAsn-Leu-Thrの配列、そしてそのすぐ下流で302番目のCysから始まるCys-Trp-Leu-Cys-Leuの配列も、マウス白血病ウイルスと共通であることが分かる。これらの特徴的なアミノ酸配列から、HC2env遺伝子産物のうち75番目のCysと114番目のCysに囲まれた領域が、マウス白血病ウイルスのレセプター結合ドメイン(RBD)中の標的レセプター特異性の決定に重要なVRA領域に相当すること、186番目のCysが、マウス白血病ウイルスでRBDのカルボキシル末端側境界に相当するCysに対応すること、及び、235番目のProからが、プロリン・リッチ領域(PRR)であることが容易に推測できる。なお、これら特徴的なアミノ酸配列の保存されたCys残基、及びVRA領域やPRR領域の定義については、文献[Battini JL, Heard JM, Danos O. Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. 『両指向性、異種指向性、及び多指向性マウス白血病ウイルスの被膜糖タンパク質におけるレセプター選択の決定基』J Virol.66(3):1468-75,1992]を参照できる。

#### 【0114】

後述の実施例6で示すとおり、実際に、配列表の配列番号2のHC2env遺伝子産物における217番目のグリシンまで、即ち、RBDと推定される領域までを含んだ組換えタンパク質は、標的霊長類細胞表面に結合する。また、PRR領域と推測される部分のアミノ酸配列が実際にプロリン残基に富むことも、配列表の配列番号2のアミノ酸配列から明らかである。

#### 【0115】

#### 【化10】

#### プライマー

#### 配列番号

HC2-start-RI: 5'-GGA ATT CAT GGG TCC CGA AGC CTG GGT-3' 35

HC2-Sma-3 : 5'-GGG TCA AAT CCT GGG ATA TAA AGT C-3' 36

#### 【0116】

前記PCR法により得られた増幅産物を制限酵素EcoRIとSmaIとで消化後、クローニングベクターpBSII-KS(+)(Stratagene社製)に組込んだ。一方、フレンドマウス白血病ウイルス(F-MuLV)のenv遺伝子を含むプラスミド(文献[Iwashiro, M., T. Kondo, T. Shimizu, H. Yamagishi, K. Takahashi, Y. Matsubayashi, T. Masuda, A. Otaka, N. Fujii, A. Ishimoto, M. Miyazawa, M. N. Robertson, B. Chesebro, and K. Kuribayashi. Multiplicity of virus-encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells. J. Virol. 67: 4533-4542, 1993.]に記載のp20-8参照)から制限酵素SmaIを用いてRBDの下流から終始コドンまでの領域を切り出し、上記のHC2envRBDの下流に組込んだ。こうして作製したプラスミド(pBS/HC2/F-MuLV)から制限酵素NotIを用いてHC2-RBD/F-MuLVenvキメラ遺伝子全長を含むDNA断片を切り出し、発現ベクターpCM

V (Becton Dickinson Bioscience社製)に組込んで、pC.HC2.ver1とした。この発現プラスミドは、下記に示すキメラenv遺伝子産物タンパク質を発現する。

【0117】

【化11】

M-----RBD----- | -----PRR-----TM----STOP  
                   HC2  F-MuLV

【0118】

上記キメラenv遺伝子産物タンパク質において、Mは、開始コドンに対応するメチオニン残基を示し、PRRは、レトロウイルスenv遺伝子産物に特徴的なプロリン残基に富んだ領域(proline-rich region)を示し、TMは、細胞膜貫通領域(Trans-Membrane region)を示し、STOPは、終始コドンを示す。

10

【0119】

同様に、フレンドマウス白血病ウイルスF-MuLVenv遺伝子全長を含む前記プラスミドp20-8をテンプレートとし、下記プライマー対clone57-5kpn及びclone57-3kpn(配列表の配列番号37及び38)を用いて、F-MuLVenv遺伝子の開始コドンからRBDの直前までを含む領域をPCR法により増幅した。

20

【0120】

【化12】

プライマー

配列番号

clone57-5kpn: 5'-GGG GTA CCG CGG CCG CAG AAT CGA CAT GGC GT-3' 37

clone57-3kpn: 5'-GCG GTA CCA GGG TGG TTG CCT GAT ATT G-3' 38

【0121】

こうして得られた増幅断片と、前記pBS/HC2/F-MuLVの制限酵素KpnI処理断片(HC2ENVタンパク質のRBDを含む配列表の配列番号2の第63~217番目のアミノ酸配列をコードする断片)とを連結して得られたプラスミドから、再び制限酵素NotIを用いてF-MuLV/HC-RBD/F-MuLVenv遺伝子を含むDNA断片を切り出し、前記発現ベクターpCMVに組み込み、pC.HC2.ver2とした。この発現プラスミドは、下記に示すキメラenv遺伝子産物タンパク質を発現する。

30

【0122】

【化13】

M----- | -RBD--- | -----PRR-----TM----STOP  
       F-MuLV      HC2  F-MuLV

40

【0123】

上記キメラenv遺伝子産物タンパク質において、M、PRR、TM、及びSTOPは、前述と同様である。また、上記キメラenv遺伝子産物タンパク質において、開始コドンからリーダーペプチド部分を経てRBD直前までと、PRRからTMを経て終始コドンまでとがF-MuLVenv遺伝子由来であり、RBDを含む部分がHC2env遺伝子由来である。

【0124】

これらのキメラenv遺伝子のタンパク質としての発現を確認するために、ウエスタンブロット法による解析を行った。陰性対照の空のpCMVプラスミド、pC.HC2.ver1、pC.HC2.ver2、及び陽性対照のF-MuLVenv遺伝子全長を含

50

む p C . F - M u L V を、 L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 ( I n v i t r o g e n 社製)を用いたりポフェクション法で、サル由来 C o s 7 細胞株に導入し、24時間培養後細胞を回収した。回収した細胞を、リン酸緩衝平衡塩類溶液にて洗浄後、細胞溶解液(1% NP40、プロテアーゼ阻害剤カクテル、PMSFを含む T N E 緩衝液)により溶解し、遠心分離(12,000rpm、10分間)を行った。得られた各上清サンプルを8% SDS - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Immobilon - P (MILLIPORE社製)膜に転写した。転写後の膜を10%スキムミルク液でブロッキングした後に、一次抗体として抗 R a u s c h e r 白血病ウイルス g p 7 0 抗体の2,000倍希釈液を反応させ、さらに、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ヒツジ I g G 抗体の10,000倍希釈液を反応させた後、ECL plus (Amersham Biosciences Corp.社製)を用いたケミルミネセンス法により、発現タンパク質への抗体の結合を検出した。その結果を図10に示す。同図に示すとおり、精製 F - M u L V 粒子中の g p 7 0 分子と同じ位置に、抗 R a u s c h e r 白血病ウイルス g p 7 0 抗体の反応するタンパク質の発現を検出することができ、いずれのキメラ e n v 遺伝子からも、キメラ e n v 遺伝子産物のタンパク質が翻訳されることが示された。

10

#### 【実施例5】

##### 【0125】

( I g A 腎症患者血漿中の抗 H C 2 E N V タンパク質抗体の検出)

実施例3で得た組換え H C 2 E N V タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルス発現ベクターを感染させた細胞を3.7%フォルムアルデヒドで固定後、0.4% T r i t t o n X - 1 0 0 で処理して細胞膜を除去し、これに、I g A 腎症患者の血漿を14倍に希釈した試料を反応させ、洗浄後、さらに、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を反応させることで、I g A 腎症患者血漿中に存在する抗 H C 2 e n v 遺伝子産物タンパク質抗体、すなわち、抗 H C 2 E N V タンパク質抗体を検出した。その結果の一例を図11に示す。同図に示すとおり、同図中央部の組換えウイルス感染細胞集団に、I g A 患者血漿中の抗体の結合による強い蛍光の集積が認められた。

20

##### 【0126】

(比較例1)

実施例3で得た組換え H C 2 E N V タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルスベクターを感染させた細胞に代え、前記 H C 2 e n v 遺伝子とは全く無関係なヒト細胞内シグナル伝達分子 H S - 1 の断片を発現する組換えワクシニアウイルスベクターの感染細胞を用いたほかは、実施例5と同様にして、I g A 患者血漿中の抗体の結合を検出した。その結果を図12に示す。同図に示すとおり、同図左側に一部ごく弱い蛍光が認められるほかは、実施例5とは異なり、強い蛍光の集積は認められなかった。

30

##### 【0127】

実施例1、3、5及び比較例1の結果からわかるように、I g A 腎症患者の血漿中には、本発明の遺伝子の発現産物であるタンパク質と免疫反応を起こす抗体(I g A)が存在する。したがって、I g A 腎症の発症は、本発明の遺伝子が発現して、その発現産物であるタンパク質が生じ、自己免疫機序によりこのタンパク質と反応する抗体をヒトが持つ場合に、前記抗体の免疫反応複合体が糸球体メサンジウム領域に沈着して慢性炎症反応が引き起こされるといふメカニズムであるといえる。

40

#### 【実施例6】

##### 【0128】

( H C 2 E N V タンパク質の R B D のヒト細胞への結合)

H C 2 e n v 遺伝子を発現するウイルスベクターが、ヒト細胞に対する遺伝子導入用ベクターとして実用性を持つためには、当該 H C 2 e n v 遺伝子産物である H C 2 E N V タンパク質に、ヒト又は霊長類細胞表面への結合性があることが必要である。そこで、H C 2 E N V タンパク質が霊長類細胞に対して表面結合活性を有することを確認した。

##### 【0129】

実施例4に記載の方法と同様にして、前記プライマー対 H C - s t a r t - R I 及び H

50

C2-Sma-3 (配列表の配列番号35及び36)を用いてHC2env遺伝子の開始コドンからレセプター結合ドメイン(RBD)までを含む領域をPCR法により増幅した。次に、前記増幅断片の3'末端(アミノ酸配列のC末端)を、緑色蛍光タンパク質EGFP遺伝子の5'末端にインフレームで続くように、pCSI.EGFPベクター(文献[Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. Cell 115(4): 449-59, 2003.]参照。)に組み込み、HC2env遺伝子のRBD部分がEGFPに結合したキメラタンパク質を発現するプラスミドを作製した。

#### 【0130】

陰性対照として、EGFPのみを発現するpEGFP-C1(Invitrogen社製)を準備し、陽性対照として、ヒトT細胞白血病ウイルスHTLV-IIenv遺伝子のRBD部分がEGFPに結合したキメラタンパク質を発現するpHTLV2-EGFP(同文献参照)を準備した。

#### 【0131】

これらのプラスミドを、それぞれ単独で、リン酸カルシウム法によるトランスフェクションによりヒト293FT細胞に導入して48時間培養を続けた後、細胞を剥離して遠心分離し、得られた遺伝子導入細胞のペレットをタンパク質分解酵素抑制剤カクテル(Roche Diagnostics社製)を含むリン酸緩衝生理食塩水に浮遊させて、液体窒素と42の温浴とによって4回凍結融解を繰り返した。その後、細胞由来ゲノムDNAを、浮遊液を繰り返し注射針に通すことにより粉碎し、氷上で30秒ずつ2回超音波処理を行った後、7,000×g、10分間遠心した上清を可溶性細胞抽出物とした。これら抽出物のタンパク質濃度は、EGFPの蛍光強度により平準化し、前記Manel, Nらの文献に記載されている方法に従って標的細胞への結合を行った。標的細胞としては、霊長類CV-1細胞及びCOS7細胞を例として使用した。

#### 【0132】

蛍光セルソータによる解析の結果を、図13に示す。同図に示すとおり、HC2env遺伝子産物であるHC2ENVタンパク質のRBD部分にEGFPによる標識を施した分子は、標的細胞であるCV-1細胞及びCOS7細胞に対して、明らかに有意な表面結合活性を示すことが確認された。

#### 【実施例7】

#### 【0133】

(HC2env遺伝子を発現するウイルスベクターによるヒト細胞への遺伝子導入)  
HC2env遺伝子を発現するウイルスベクターが、ヒト細胞への遺伝子導入に利用できることを確認した。遺伝子導入用レトロウイルスベクターは、図16に示すようにして作製した。すなわち、まず、導入したい遺伝子4、パッケージングシグナル(配列)及びLTR等を含む遺伝子導入プラスミド5を作製する。次に、この遺伝子導入プラスミド5をパッケージング細胞6に導入する。前記パッケージング細胞6は、HC2env遺伝子の全部又は一部を含む遺伝子を有し、同遺伝子産物であるHC2ENVタンパク質の全部又は一部を含むタンパク質を表面タンパク質7として発現する細胞である。そして、前記パッケージング細胞6から発芽した組換えレトロウイルスベクター8を回収する。

#### 【0134】

図16に示すレトロウイルスベクター構築系において、パッケージング細胞6に導入するHC2env遺伝子発現ベクターとして、実施例4に記載のプラスミドpC.HC2.ver2を準備し、gag/pol発現ベクターとして、文献[Kim, F.J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.-L., and Sitbon, M. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. J. Virol. 77: 963-969, 2003]に記載されるマウス白血病ウイルス由来のpCLEC-(ScaCl)を準備した。また、導入する遺伝子4が組込まれた遺伝子導入プラスミド5として、同文献に記載の-ガラクトシダーゼ発現プラスミドpCLLacZを準備

10

20

30

40

50

した。ここで、導入するHC2env遺伝子発現ベクターとして実施例4に記載のプラスミドpC.HC2.ver2を使用したのは、PRR以下の領域がF-MuLVのenv遺伝子産物の同領域と交換されることによりSU/TM切断部位の配列が最適化されたHC2ENVタンパク質7を使用するためである。

#### 【0135】

これら3つのプラスミドをリン酸カルシウム法によって293T細胞へコトランスフェクションし、翌日、培養液を交換して、さらに一日培養後、培養上清を回収してウイルス液とした。予め12穴培養プレートに播き込んでおいたヒトHeLa又は293T細胞に、前記ウイルス液をポリブレンと共に加え、翌日培養液を交換した。更に一日培養した後、細胞を0.5%グルタルアルデヒドにて固定・洗浄後、LacZ染色液を加えて37

10

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0136】

本発明のHC2env遺伝子及びその発現産物であるHC2ENVタンパク質は、例えば、IgA腎症の診断、治療に利用することができ、その他、遺伝子導入用レトロウイルスベクターにも利用できる。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0137】

【図1】図1は、IgA腎症患者糸球体内に沈着する抗原分子をマウスモノクローナル抗体12H5.1で検出した蛍光顕微鏡写真の一例を示す図である（実施例1）。

【図2】図2は、マウス内在性異種指向性レトロウイルスenv遺伝子産物のアミノ酸配列及び同遺伝子の塩基配列を示す図である（実施例1）。

【図3】図3は、ヒトゲノムDNAライブラリーに対して行ったサザンプロットの結果を示す図である（実施例1）。

【図4】図4は、本発明のHC2env遺伝子のヒトゲノムにおける位置を示すデータベース検索結果の一例を示す図である。

30

【図5】図5は、本発明のHC2env遺伝子が存在するHC2プロウイルスの3'LTR及び5'LTRの配列と構造を示す図である。

【図6】図6は、本発明のHC2env遺伝子について、5'RACE、3'RACE及び全長cDNA増幅を行った結果をまとめた図である（実施例1）。

【図7】図7は、本発明のHC2env遺伝子のヒト組織における発現をRT-PCR法により確認した結果の一例の写真である（実施例2）。

【図8】図8は、本発明のHC2env遺伝子を組込んだ組換えワクシニアウイルス発現ベクターを示す模式図である。

【図9】図9は、本発明のHC2env遺伝子の発現を間接蛍光抗体法で検出した蛍光顕微鏡写真の一例を示す図である（実施例3）。

40

【図10】図10は、本発明のHC2ENVタンパク質を含むキメラENVタンパク質の発現をウエスタンプロット法で確認した結果の一例の写真である（実施例4）。

【図11】図11は、本発明のHC2env遺伝子の発現を間接蛍光抗体法で検出した蛍光顕微鏡写真のその他の例を示す図である（実施例5）。

【図12】図12は、本発明のHC2env遺伝子の発現を間接蛍光抗体法で検出した蛍光顕微鏡写真のさらにその他の例を示す図である（比較例1）。

【図13】図13は、本発明のHC2ENVタンパク質の霊長類細胞に対する表面結合活性の一例を示す図である（実施例6）。

【図14】図14は、本発明のHC2env遺伝子の一塩基多型を検出する方法の一例を示すフロー図である。

50

【図15】図15は、本発明のヒト抗体測定方法の一例の模式図である。

【図16】図16は、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターの製造方法の一例を示す模式図である。

【図17】図17は、本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクターによりヒト細胞に遺伝子が導入された結果の一例を示す写真である（実施例7）。

【符号の説明】

【0138】

- 1：本発明のHC2ENVタンパク質又はその一部
- 2：被験者の血清又は体液中の抗体
- 3：標識二次抗体
- 4：遺伝子導入目的遺伝子
- 5：遺伝子導入プラスミド
- 6：パッケージング細胞
- 7：表面タンパク質
- 8：本発明の遺伝子導入用レトロウイルスベクター

10

【配列表フリーテキスト】

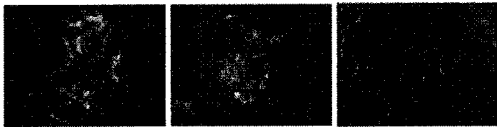
【0139】

配列番号3：プライマー 011295ORF-L  
 配列番号4：プライマー 011295ORF-R  
 配列番号5：プライマー L  
 配列番号6：プライマー R  
 配列番号7：プライマー HC2env011L1  
 配列番号8：プライマー HC2env011R  
 配列番号9～16：コード鎖プライマー  
 配列番号17～24：非コード鎖プライマー  
 配列番号25：envプロンプ用プライマー  
 配列番号28：プライマー T7  
 配列番号29：プライマー Sp6  
 配列番号30：プライマー HC2env3RACE1  
 配列番号31：プライマー HC2pol3RACE1  
 配列番号32：プライマー 5RACEpol-env  
 配列番号33：プライマー HC2PV-L  
 配列番号34：プライマー HC2PV-R  
 配列番号35：プライマー HC2-start-RI  
 配列番号36：プライマー HC2-Sma-3  
 配列番号37：プライマー clone57-5kpn  
 配列番号38：プライマー clone57-3kpn

20

30

【 図 1 】



【 図 2 】

```

→ sp70
gcc tgg gta caa cat gac agc oot cac cag atc ttc aat git act
A S V Q R D S P H Q I F N V T

tgg aga gtt acc aac cta atg aca gga caa aca gct aac gac acc
M R V T H L M T G O T A N A T

tcc ctc cta ggg agc atg aca gac acc ttc oot aac cta tat ttt
S L L G T M T D T F P K L Y F

gac ctg tgt gat tta gta gga gac tac tgg gat gac cca gaa ccc
D L C D L V G D Y W D D P E P

gat att gga gat tgc ccc act ccc gga gga gga gga gga
D I G D G C R T P G G R R R R I

aga ctg tat gac ttc tat gtt tgc ccc ggt cat act gta cca ata
R L Y D F Y V C P G H T V P I

ggg tat gga gga cgg gga gag ggc tac tgt ggc aaa tgg gaa tgt
G C G G P G E G Y C G K W G C

gag acc gct gga cag gca tac tgg aag cca tca tca tca tgg gac
E T T G Q A Y W K P S S S W D

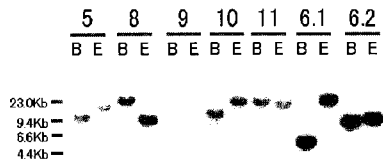
cta att tcc ctt aag cga gaa aac cct aag gat cag ggc ccc
L I S L K R G N T P K D Q G P

tgt tat gat tcc tcc gtc tcc agt agc ctg cgg gat gac gaa ccc
C Y D S S V S S G V Q G A T P

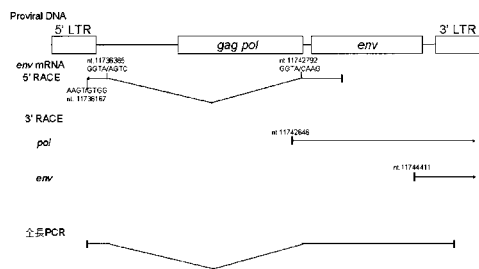
ggg gat gga tgc aac ccc ctg gta tta gaa ttc
G G R C N P L V L E F

```

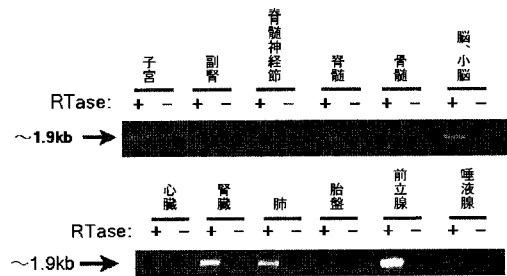
【 図 3 】



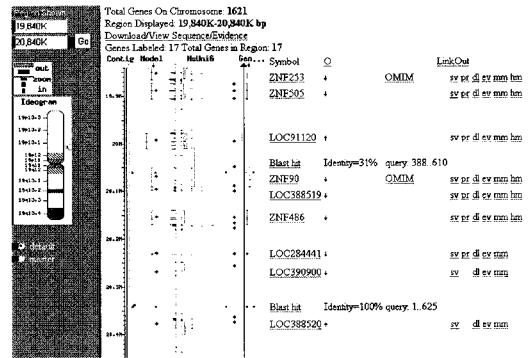
【 図 6 】



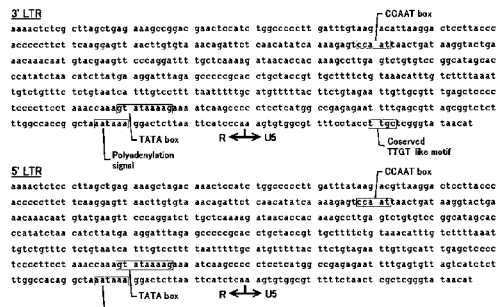
【 図 7 】



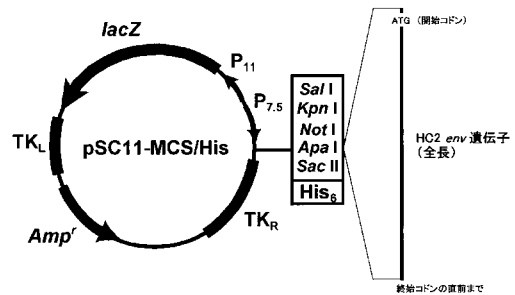
【 図 4 】



【 図 5 】



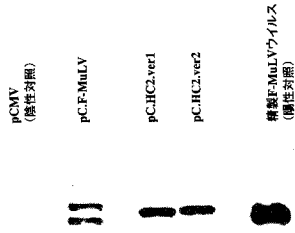
【 図 8 】



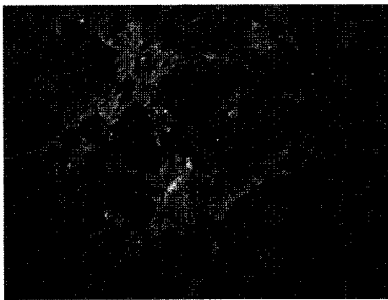
【 図 9 】



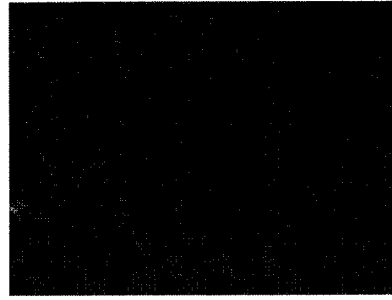
【図10】



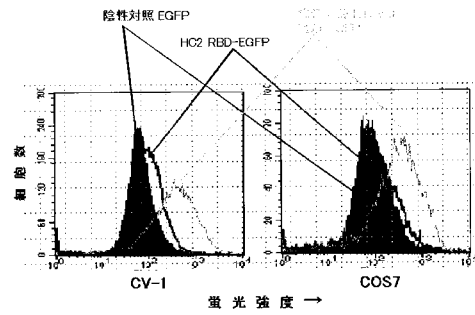
【図11】



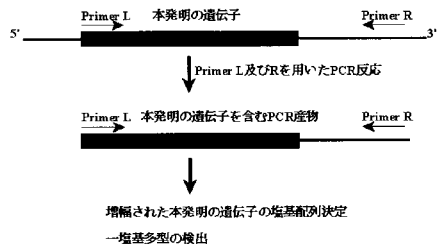
【図12】



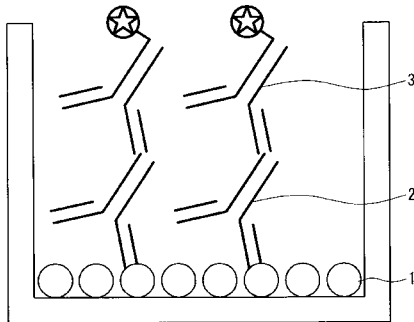
【図13】



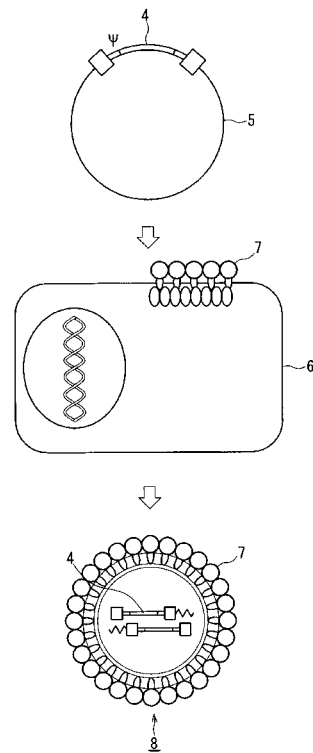
【図14】



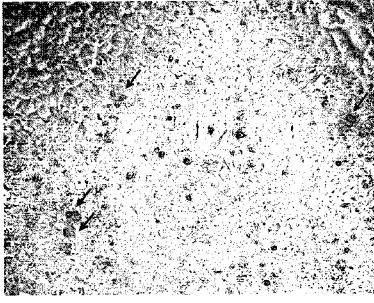
【図15】



【図16】



【 図 1 7 】



【 配 列 表 】

2006068004000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/566 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/566	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	
	A 6 1 P 43/00	1 0 5

Fターム(参考) 4B063 QA08 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS34 QX04  
 4B065 AA90X AA97Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA27 MA01  
 NA14 ZA812 ZB212  
 4C085 AA02 BB01 CC24 EE01 GG01  
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB21  
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	env新人类内源逆转录病毒HC2基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006068004A</a>	公开(公告)日	2006-03-16
申请号	JP2005228750	申请日	2005-08-05
申请(专利权)人(译)	大阪产业振兴机构		
[标]发明人	宫澤正顯 阿部弘之		
发明人	宫澤 正▲顯▼ 阿部 弘之		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/15 C12Q1/68 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/566 A61K48/00 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61P13/12 A61P43/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/15 C12Q1/68.A C12N5/00.B G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/53.D A61K48/00 A61K31/7088 A61K37/02 A61K39/00.H A61P13/12 A61P43/00.105 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA20 4B063/QA08 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4B063/QX04 4B065/AA90X 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA27 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZB212 4C085/AA02 4C085/BB01 4C085/CC24 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB21 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2004231412 2004-08-06 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供与IgA肾病发展有关的新人类内源性逆转录病毒的env基因。公开了人内源性逆转录病毒HC2的env基因。其中，一个或几个碱基可以被删除，取代或添加。IgA肾病的发作是，当表达此HC2env基因时，会产生表达产物HC2ENV蛋白，并且人类具有通过自身免疫机制与该HC2ENV蛋白反应的抗体，即该抗体的免疫反应复合物它是机体沉积在肾小球系膜区并触发慢性炎症反应的机制。 [选择图]图4

