

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6832422号
(P6832422)

(45) 発行日 令和3年2月24日 (2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月3日 (2021.2.3)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01 Z N A
A 6 1 K 35/768 (2015.01)	A 6 1 K 35/768
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z

請求項の数 16 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2019-513664 (P2019-513664)	(73) 特許権者	504137912
(86) (22) 出願日	平成30年4月18日 (2018.4.18)		国立大学法人 東京大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/015986		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号	W02018/194089	(73) 特許権者	500094543
(87) 国際公開日	平成30年10月25日 (2018.10.25)		新日本製薬株式会社
審査請求日	令和1年8月29日 (2019.8.29)		福岡県福岡市中央区大手門1-4-7
(31) 優先権主張番号	特願2017-83019 (P2017-83019)	(74) 代理人	100114627
(32) 優先日	平成29年4月19日 (2017.4.19)		弁理士 有吉 修一朗
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100182501
			弁理士 森田 靖之
		(74) 代理人	100175271
			弁理士 筒井 宣圭
		(74) 代理人	100190975
			弁理士 遠藤 聡子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子改変コクサッキーウイルス及び医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コクサッキーウイルス野生型 (CVB3-WT) のゲノムに、正常細胞特異的microRNA (miRNA) の標的配列からなるポリヌクレオチドが少なくとも一つ挿入された変異ゲノムを含み、正常細胞において特異的に増殖が抑制され、

前記正常細胞特異的miRNAの標的配列がmiR-34a及びmiR-34cの少なくとも一方に対応し、

前記ポリヌクレオチドが挿入される位置が、少なくとも、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内における位置742と位置743との間であり、かつ、CVB3-WTゲノムのタンパク質への翻訳を開始する開始コドンのすぐ上流の位置を含む

遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項2】

前記正常細胞特異的miRNAの標的配列がmiR-34aに対応し、

前記ポリヌクレオチドが挿入される位置が、少なくとも、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内における位置742と位置743との間、及び、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内における位置7304と7305との間である

請求項1に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項3】

前記ポリヌクレオチドが、下記 (a)、または (a) において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

請求項 2 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

(a) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ACA
ACC AGC TAA GAC ACT GCC Atc acA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが、下記(c)または(c)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

請求項 2 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

(c) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt TCC
AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA t cac TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA

【請求項 5】

10

前記ポリヌクレオチドが複数個挿入された

請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項 6】

癌細胞において増殖が可能な

請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドが、下記 (a) 若しくは (b)、または (a) 若しくは (b) において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

20

(a) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ACA
ACC AGC TAA GAC ACT GCC Atc acA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA

(b) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtG
CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC Ttc acG CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC T

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチドが、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内のそれぞれに挿入された

請求項 1 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項 9】

コクサッキーウイルス野生型(CVB3-WT)のゲノムに、組織特異的microRNA(miRNA)の標的配列からなるポリヌクレオチドが少なくとも一つ挿入された変異ゲノムを含み、

30

前記組織特異的miRNAがmiR-1及びmiR-217の少なくとも一方を含み、

前記組織特異的microRNAの標的配列からなるポリヌクレオチドが挿入される位置が、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内における位置742と位置743との間、及び、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内における位置7304と位置7305との間の少なくとも一方である

請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが、下記(c)若しくは(d)、または(c)若しくは(d)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

請求項 9 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

40

(c) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt TCC
AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA t cac TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA

(d) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtT
CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT Atc acT CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT A

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチドが、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内のそれぞれに挿入された

請求項 10 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドが、下記(e)若しくは(f)、または(e)若しくは(f)において1～数

50

個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

請求項 9 に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

(e) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ATA
CAT ACT TCT TTA CAT TCC Atc acA TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA

(f) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtA
TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA tca cAT ACA TAC TTC TTT ACA TTC CA

【請求項 1 3】

請求項 1 乃至請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルスを含む

医薬組成物。

10

【請求項 1 4】

癌（好ましくは肺癌、乳癌および悪性中皮腫）またはその前癌状態の処置（予防または治療）のための

請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

局所用または全身投与用の製剤である

請求項 1 3 または 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

癌（好ましくは肺癌、乳癌および悪性中皮腫）またはその前癌状態の処置（予防または治療）において使用するための

20

請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変コクサッキーウイルス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の処置に適用可能な、遺伝子改変コクサッキーウイルス及び医薬組成物に関する。本発明は、腫瘍溶解性ウイルス療法の分野で有用である。

【背景技術】

【0002】

腫瘍溶解性ウイルス療法とは、ウイルスを癌細胞に感染させ、癌組織内でウイルスを増殖させながらウイルスが有する腫瘍溶解性を利用して癌組織を破壊・死滅させる治療法である。DNAウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルスを利用した臨床研究が、脳腫瘍や乳癌を対象として実施されており、安全性と有効性を示す結果が報告されつつある。

30

【0003】

コクサッキーウイルスB群3型(CVB3)は（非特許文献 1～3）、1 本鎖プラス鎖RNAゲノムを有し、細胞質内のみで増殖し、宿主細胞ゲノムに対する変異導入の可能性が低いため、腫瘍溶解性ウイルス療法において安全性が比較的高いと考えられている。また、CVB3 はありふれたウイルスであり、多くの場合、感染しても不顕性感染に留まる。しかしながら、無菌性髄膜炎、ウイルス性心筋炎、膵炎との関連性に関する報告がある。また、CVB3 に関しては、ヒト非小細胞肺癌に対する顕著な腫瘍溶解性が報告されている（非特許文献 4）。

40

【0004】

一方、腫瘍溶解性ウイルス療法への適用が期待されるウイルスの一つとして、コクサッキーウイルスA21(CVA21)が知られており（特許文献 1）、ウイルスゲノムにmiRNAを組み込むことにより、組織特異的にウイルスを増殖させたとの報告がある（非特許文献 5）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特表 2 0 0 7 - 5 2 7 7 1 9 号公報

【非特許文献】

50

【0006】

【非特許文献1】Liu Z. et al. Virology. 265: 206-17 (1999)

【非特許文献2】Gauntt CJ. et al. Virus Res. 41: 89-99 (1996)

【非特許文献3】Henke A. et al. Int J Med Microbiol. 298: 127-34 (2008)

【非特許文献4】Miyamoto, S. et al. Cancer Res. 72 (10), 2609-21 (2012)

【非特許文献5】Russell, SJ. et al. Nat Med. 14 (11), 1278-83 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らのこれまでの検討によると、野生型CVB3(CVB-WT)をin vivoで評価した際に、血清生化学検査においてはAMY、CK、ASTおよびALTの上昇が生じ、また組織診では、膵臓における外分泌組織の破壊、心筋における炎症性湿潤、肝臓における炎症性湿潤が観られた。これらの好ましくない作用は軽減されることが望ましい。

10

【0008】

また、腫瘍溶解性ウイルス療法の利用において安全性を担保する観点からは、好ましくない作用の有無に限らず、ターゲットとなる癌細胞以外の正常細胞においてウイルスの増殖が抑制され、安全性をより一層向上させることが強く望まれている。

【0009】

本発明は、癌の処置を行う腫瘍溶解性ウイルス療法の分野で適用可能であり、抗腫瘍効果及び安全性に優れた遺伝子改変コクサッキーウイルス及び医薬組成物を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らはCVB3-WTのゲノム5'untranslated region(UTR)及び／またはゲノム3'UTRに組織特異的microRNA(miRNA)の標的配列を挿入することを試みた。これにより、miRNAが存在する組織においては、挿入した標的配列にmiRNAを含むRISC複合体が結合し、ウイルスタンパク質の翻訳が阻害されるため、組織特異的にウイルス増殖が抑制されることを期待した。

【0011】

その際、本発明者らは、これまで類似の目的での利用が一切検討されてこなかったmiR-34ファミリーに着目した。

30

【0012】

このmiR-34ファミリーは、癌抑制遺伝子の1種であるp53遺伝子の下流に位置しており、全身の細胞内で細胞周期、アポトーシス、細胞老化等に関与することが報告されている(図1参照)。また、miR-34ファミリーは、全身の正常細胞において高発現が認められている(図2参照)。一方、p53遺伝子は癌細胞において高頻度に欠落等の異常が認められ、これに伴い、miR-34ファミリーについても複数の癌細胞で欠失や発現の低下が報告されている。

【0013】

本発明者らは、上述した、miR-34ファミリーの正常細胞における高発現と、癌細胞における欠失や発現の低下に着目し、CVB3-WTのゲノムにmiR-34の標的配列を挿入することで、癌化していない正常細胞ではウイルスの増殖を抑制し、癌細胞ではウイルスを効率よく増殖させて腫瘍溶解性を発揮させることが可能な安全性に優れた遺伝子改変コクサッキーウイルスの作製を試みるものとした。

40

【0014】

更に、本発明者らは、CVB-WTが引き起こす作用を低減するために、組織特異的に発現しているmiRNAの利用についても検討を行うものとした。1つは膵臓特異的に発現しているといわれているmiR-217であり、もう1つは筋組織および正常細胞特異的に発現しているといわれているmiR-1である。

【0015】

50

また、特定のmiRNAの標的配列のゲノムへの挿入を検討する中で、3'UTR中であっても、挿入する位置によっては、ウイルスの複製が妨げられることが判明し、適切な挿入位置を見出す必要があるとの知見を得ている。そのため、miRNAの標的配列のゲノムへの挿入位置について最適な位置を決定した。また、5'UTR中における特定のmiRNAの標的配列のゲノムへの挿入位置を検討して、ウイルスの複製が妨げられることのない標的配列の挿入位置を決定した。

【0016】

更に、特定のmiRNAの標的配列のゲノムへの挿入位置として、5'UTRを利用することで、挿入した標的配列が、ウイルスのゲノムから脱落しにくくなる可能性があることに着目して検討を行った。

10

【0017】

上記の目的を達成するために、本発明の遺伝子改変コクサッキーウイルスは、コクサッキーウイルス野生型(CVB3-WT)のゲノムに、正常細胞特異的あるいは組織特異的microRNA(miRNA)の標的配列からなるポリヌクレオチドが少なくとも一つ挿入された変異ゲノムを含み、正常細胞において特異的に増殖が抑制される、前記正常細胞特異的miRNAの標的配列がmiR-34a及びmiR-34cの少なくとも一方に対応する構成を備えている。

【0018】

ここで、コクサッキーウイルス野生型(CVB3-WT)のゲノムに、正常細胞特異的あるいは組織特異的microRNA(miRNA)の標的配列からなるポリヌクレオチドが少なくとも一つ挿入された変異ゲノムを含むことによって、miRNAが存在する組織においてウイルスの増殖を抑制可能となる。即ち、挿入した標的配列にmiRNAを含むRISC複合体が結合し、ウイルスタンパク質の翻訳が阻害され、組織特異的にウイルスの増殖を抑制することができる。

20

【0019】

また、正常細胞特異的miRNAの標的配列がmiR-34a及びmiR-34cの少なくとも一方に対応することによって、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織でウイルスの増殖を抑制可能となる。即ち、miR-34aまたはmiR-34cを含むmiR-34ファミリーは、正常細胞において高発現しているため、正常細胞でのウイルスの増殖を抑制して、安全性を高めることができる。また、miR-34aまたはmiR-34cが存在しない組織、即ち、miR-34ファミリーの欠失や発現の低下が見られる癌細胞において、ウイルスを増殖させることができ、抗腫瘍効果を選択的に発揮させることが可能となる。

30

【0020】

また、ポリヌクレオチドが挿入される位置がCVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内の少なくとも一方である場合には、宿主細胞内におけるウイルスの複製の際に、複製が妨げられにくくなる。即ち、5'UTR領域または3'UTR領域は、タンパク質に翻訳されない非翻訳領域であることから、標的配列のCVB3-WTゲノムへの挿入による影響が、宿主細胞でのウイルスRNAの翻訳に及びにくくなり、ウイルスRNAの翻訳が適正になされるものとなる。これに伴い、タンパク質の合成、ウイルス粒子の複製が進み、ウイルスの増殖が可能となり、癌細胞への抗腫瘍効果を発揮させることができる。

【0021】

また、ポリヌクレオチドが挿入される位置がCVB3-WTゲノムの3'UTR領域内における位置7304と7305との間である場合には、宿主細胞内におけるウイルスの複製の際に、より一層、複製が妨げられにくいものとなる。

40

【0022】

この位置7304と7305との間とは、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内であり、かつ、CVB3-WTゲノムのタンパク質への翻訳を終了させる終始コドン（位置7298、7299、7300が終始コドン構成）を構成する塩基配列から4塩基分下流にずれた位置である。即ち、3'UTR領域内であり、終始コドンに近い位置となっているため、複製に必要な3'UTRの立体構造を保持しつつ、翻訳が適切に終了することが可能となる。この結果、より安定的に、癌細胞においてウイルスを増殖させ癌細胞を破壊することが可能となる。

【0023】

50

また、ポリヌクレオチドが挿入される位置がCVB3-WTゲノムの5'UTR領域内における位置742と743との間である場合には、宿主細胞内におけるウイルスの複製の際に、より一層、複製が妨げられにくいものとなる。また、ポリヌクレオチドがCVB3-WTゲノムに挿入された状態が維持されやすく、ポリヌクレオチドがゲノムから脱落しにくくすることができる。

【0024】

この位置742と743との間とは、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内であり、かつ、CVB3-WTゲノムのタンパク質への翻訳を開始する開始コドン（位置743、744、745が開始コドンを構成）を構成する塩基配列のすぐ上流に該当する位置である。即ち、5'UTR領域内であり、開始コドンに隣接する位置となっているため、複製に必要な5'UTRの立体構造を保持しつつ、翻訳が適切に終了することが可能となる。また、5'UTR領域に挿入したポリヌクレオチドは、3'UTR領域に挿入したポリヌクレオチドよりもゲノム上から脱落しにくくなっていた。この結果、より安定的に、正常細胞においてウイルスの増殖を妨げ、癌細胞においては効率よくウイルスを増殖させ癌細胞を破壊することが可能となる。

【0025】

また、標的配列からなるポリヌクレオチドが複数個挿入された場合には、miRNAが存在する組織において、miRNAを含むRISC複合体が標的配列に結合する確率を高めることができ、さらにウイルスゲノム変異が起きた場合にもmiRNAからの逸脱を回避することが可能になるため、組織特異的なウイルスの増殖抑制をより一層確実なものにできる。

【0026】

また、挿入されるポリヌクレオチドが、下記（a）若しくは（b）、または（a）若しくは（b）において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである場合には、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列がスパーサー配列を介して4つ並べられたものとなる。これにより、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織で、より一層確実に、ウイルスの増殖を抑制することができる。また、miR-34aまたはmiR-34cが存在しない組織、即ち、癌細胞において、ウイルスを増殖させることができ、抗腫瘍効果を選択的に発揮させることが可能となる。なお、ここでは、ポリヌクレオチドが挿入される領域は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内のみの構成、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内のみの構成、及びCVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内の両方の構成を含むものである。

- (a) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ACA
ACC AGC TAA GAC ACT GCC Atc acA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA
- (b) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtG
CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC Ttc acG CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC T

【0027】

また、ポリヌクレオチドが、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内のそれぞれに挿入された場合には、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列の挿入される数が増えることとなり、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織で、更に一層確実に、ウイルスの増殖を抑制することができる。また、仮に、5'UTR領域内または3'UTR領域内の一方の領域で、挿入したポリヌクレオチドがゲノムから脱落したとしても、もう一方の領域に挿入したポリヌクレオチドが存在することで、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織で、安定して、ウイルスの増殖を抑制することができる。

【0028】

また、組織特異的miRNAがmiR-1及びmiR-217の少なくとも一方を含む場合には、膵臓や肝臓、または筋組織で組織特異的に、遺伝子改変コクサッキーウイルスの増殖を抑制可能となる。即ち、CVB3-WTを膵臓や肝臓、または筋組織の細胞に導入した際に生じる好ましくない作用を低減または抑止することができる。

【0029】

また、ポリヌクレオチドが、下記(c)若しくは(d)、または(c)若しくは(d)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである

場合には、2つのmiR-34aの標的配列及び2つのmiR-217の標的配列から構成されたポリヌクレオチド、または、2つのmiR-34cの標的配列及び2つのmiR-217の標的配列から構成されたポリヌクレオチドが、miRNAのターゲットとなる配列として、CVB3-WTのゲノムに挿入される。これにより、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織だけでなく、miR-217が存在する組織、でウイルスの増殖を抑制可能となる。この結果、遺伝子改変コクサッキーウイルスを使用した際の安全性をより一層高めることができる。特に、CVB3-WTを用いた際に、好ましくない副作用が強く発生するのは脾臓であり、miR-217は脾臓での高発現が認められるため、脾臓での副作用の発生を抑止して、安全性の向上に寄与するものとなる。なお、ここでのポリヌクレオチドの配列では、個別の標的配列の間にスペーサー配列が介在している。また、ここでは、ポリヌクレオチドが挿入される領域は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内のみの構成、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内のみの構成、及びCVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内の両方の構成を含むものである。

10

(c) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TAt cac TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA

(d) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtT CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT Atc acT CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT A

【0030】

また、ポリヌクレオチドが、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内のそれぞれに挿入された場合には、miR-34a及びmiR-217、またはmiR-34c及びmiR-217の標的配列の挿入される数が増えることとなり、miR-34a及びmiR-217、または、miR-34c及びmiR-217が存在する組織で、更に一層確実に、ウイルスの増殖を抑制することができる。また、仮に、5'UTR領域内または3'UTR領域内の一方の領域で、挿入したポリヌクレオチドがゲノムから脱落したとしても、もう一方の領域に挿入したポリヌクレオチドが存在することで、miR-34a及びmiR-217、または、miR-34c及びmiR-217が存在する組織で、安定して、ウイルスの増殖を抑制することができる。

20

【0031】

また、ポリヌクレオチドが、下記(e)若しくは(f)、または(e)若しくは(f)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドである場合には、2つのmiR-34aの標的配列及び2つのmiR-1の標的配列から構成されたポリヌクレオチド、または、2つのmiR-34cの標的配列及び2つのmiR-1の標的配列から構成されたポリヌクレオチドが、miRNAのターゲットとなる配列として、CVB3-WTのゲノムに挿入される。これにより、miR-34aまたはmiR-34cが存在する組織だけでなく、miR-1が存在する組織、でウイルスの増殖を抑制可能となる。この結果、遺伝子改変コクサッキーウイルスを使用した際の安全性をより一層高めることができる。なお、ここでのポリヌクレオチドの配列では、個別の標的配列の間にスペーサー配列が介在している。また、ここでは、ポリヌクレオチドが挿入される領域は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内のみの構成、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内のみの構成、及びCVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内の両方の構成を含むものである。

30

(e) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ATA CAT ACT TCT TTA CAT TCC Atc acA TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA

40

(f) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtA TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA tca cAT ACA TAC TTC TTT ACA TTC CA

【発明の効果】

【0032】

本発明に係る遺伝子改変コクサッキーウイルスは、癌の処置を行う腫瘍溶解性ウイルス療法の分野で適用可能であり、抗腫瘍効果及び安全性に優れたものとなっている。

また、本発明に係る医薬組成物は、癌の処置を行う腫瘍溶解性ウイルス療法の分野で適用可能であり、抗腫瘍効果及び安全性に優れたものとなっている。

【図面の簡単な説明】

【0033】

50

【図1】miR-34ファミリーの発現と細胞周期等への関与を示す概略ブロック図である。

【図2】ヒトの生体内における各組織での各miRNA (miR-1、miR-217、miR-34a及びmiR-34c) の発現量を示すグラフである。

【図3】miR-34aの配列とmiR-34cの配列を示す概略図である。

【図4】miR-34aまたはmiR-34cの標的配列搭載CVB3の概略図である。図中に示した配列をpBluescript II-CVB3の7304と7305bpの間にIn-Fusionクローニング法を用いて挿入する。

【図5】CVB3のゲノム上の5'UTR領域内（位置742と743bpとの間）及び3'UTR領域内（位置7304と7305bpとの間）への標的配列の挿入位置を示す概略図である。

【図6】CVB3-WTのゲノムの5'UTR内の位置742-743bpの間にmiR-34cの標的配列を4つ挿入した配列を示している。

【図7】miR-34a及びmiR-217の標的配列、または、miR-34c及びmiR-217の標的配列搭載CVB3の概略図である。

【図8】肺がん細胞株NCI-H1299(H1299)細胞で産生したCVB3-WT及び遺伝子改変CVB3を用いて、H1299細胞でウイルス力価の測定を行った試験結果を示すグラフである。

【図9】癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3の腫瘍溶解効果の有無を示す模式図である。

【図10】通常の癌細胞、miRNA-34aを高発現させた癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34aT-5、CVB3-miR-34aT-53、CVB3-34a&217T-53の腫瘍溶解効果の有無を示す模式図である。

【図11】癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、CVB3-1&217T、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3の腫瘍溶解効果の有無を示す模式図である。

【図12】H1299細胞にCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3を感染させて(MOI=0.001)細胞生存率を評価したグラフである。

【図13】H1299細胞にCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3を感染させて(MOI=0.01)細胞生存率を評価したグラフである。

【図14】BEAS-2B細胞にCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3を感染させて(MOI=0.001)細胞生存率を評価したグラフである。

【図15】Het-1A細胞にCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3を感染させて(MOI=0.001またはMOI=0.01)72時間後の細胞生存率を示したグラフである。

【図16】癌細胞(MOI=0.001)及び正常細胞(MOI=0.1)にCVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3、CVB3-miR-34aT-53、CVB3-34a&217T-53を感染させて72時間後の細胞生存率を評価したグラフである。

【図17】癌細胞(MOI=0.001)及び正常細胞(MOI=0.1)にCVB3-WT、CVB3-1&217T、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3を感染させて72時間後の細胞生存率を評価したグラフである。

【図18】(a)は、治療群(CVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3)及び未治療群のマウスにおける腫瘍体積(NCI-H1299)の経時的変化を示すグラフであり、(b)は、同マウスの生存率を示すグラフである。

【図19】治療群(CVB3-WT、CVB3-miR-34aT-3、CVB3-miR-34cT-3)及び未治療群のマウスにおける体重の変化を示すグラフである。

【図20】CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53、CVB3-1&217Tを投与したマウス(一回投与群)における血液生化学検査の結果を示すグラフである。

【図21】CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53、CVB3-1&217Tを投与したマウス(二回投与群)における血液生化学検査の結果を示すグラフである。

【図22】CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53、CVB3-miR-34aT-53、CVB3-1&217Tを投与したマウス(二回投与群)における血液生化学検査の結果を示すグラフである。

【図23】CVB3のゲノム及び標的配列を挿入したCVB3のゲノムにおける標的部位付近のPCR産物の電気泳動の結果を示す模式図である。

【図24】CVB3のゲノム及び標的配列を挿入したCVB3のゲノムにおける標的部位付近のPCR産物の電気泳動の結果を示す模式図である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明に関し、数値範囲を「X～Y」で表すときは、その範囲は両端の値XおよびYを含む。本発明に関し、「Aおよび／またはB」というときは、A、Bのうち、少なくとも一方を指す趣旨である。

【0035】

[遺伝子改変コクサッキーウイルス]

<miR標的配列挿入によるCVB3の安全性向上>

本発明によって提供される遺伝子改変コクサッキーウイルスの一態様は、コクサッキーウイルスB3野生型(CVB3-WT)のゲノムに、組織特異的microRNA(miRNA)の標的配列からなるポリヌクレオチドが少なくとも一つ挿入された変異ゲノムを含む、遺伝子改変コクサッキーウイルスである。このような遺伝子改変コクサッキーウイルスは、組織特異的に増殖が抑制されうる。

10

【0036】

本発明に用いる正常細胞特異的miRNA（およびその標的配列）は、miR-34a及びmiR-34cの少なくとも一方である。miR-34aまたはmiR-34cは、全身の正常細胞において高発現が認められているmiR-34ファミリーの1つである。miR-34aまたはmiR-34cは、一種類のみ用いてもよく、2種類を組み合わせて用いてもよい。

【0037】

図3にmiR-34aの配列（配列番号1）と、miR-34cの配列（配列番号2）を示している。

20

【0038】

本発明では、正常細胞あるいは組織特異的miRNAの標的配列の挿入される位置は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内または3'UTR領域内であることが好ましい。また、正常細胞あるいは組織特異的miRNAの標的配列の挿入される位置は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内及び3'UTR領域内のそれぞれの領域であることが更に好ましい

【0039】

また、組織特異的miRNAの標的配列の挿入される位置は、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内である場合、CVB3-WTゲノムの位置7344より上流または位置7345より下流であることがより好ましく、位置7304と7305との間であることがさらに好ましい。

【0040】

30

本発明者らのこれまでの検討によると、一般的なCVB3産生細胞であるHeLa細胞において7304-7305bpの間に標的配列を挿入した遺伝子改変CVB3は増殖を認めたが、7344-7345bpの間に挿入した遺伝子改変CVB3は増殖を認めなかった。また、miRNAの発現抑制を行ったHaLa細胞においても同様の現象が見られた。したがって、上記のとおり、組織特異的miRNAの標的配列の挿入される位置は、CVB3-WTゲノムの3'UTR領域内であることが好ましく、CVB3-WTゲノムの位置7344より上流または位置7345より下流であることがより好ましく、位置7304と7305との間であることがさらに好ましい。

【0041】

また、組織特異的miRNAの標的配列の挿入される位置は、CVB3-WTゲノムの5'UTR領域内である場合、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間であることが好ましい。

40

【0042】

また、挿入されるmiR-34aまたはmiR-34cの標的配列の個数は、複数個、例えば2～6個であることが好ましい。

【0043】

特に好ましい態様においては、挿入されるポリヌクレオチドが、下記(a)または(b)である。あるいは、(a)または(b)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドであって、(a)または(b)と同様に機能することができ、即ち、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）、CVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）、及び、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）とCVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）のそれぞれの領域のうち、

50

少なくとも1つに挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞特異的に増殖を抑制することができるものである。あるいは、(a)または(b)に示したヌクレオチド配列と、少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは98%、さらに好ましくは99%の配列同一性を有する配列からなるポリヌクレオチドであって、(a)または(b)と同様に機能することができるもの、即ち、CVB3-WTゲノムの各位置に挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞特異的に増殖を抑制することができるものである。

(a) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Atc acA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA (配列番号3)

(b) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtG CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC Ttc acG CAA TCA GCT AAC TAC ACT GCC T (配列番号4)

【0044】

なお、あるヌクレオチド配列において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列を有するポリヌクレオチドを得るための手法、およびヌクレオチド配列に関する配列同一性の計算方法（例えば、BLASTアルゴリズムを用いて計算することができる。）は、当業者にはよく知られている。この点は以下に示すヌクレオチド配列についても同様である。

【0045】

また、CVB3-WTの各組織での好ましくない作用を低減する観点から、本発明に用いる組織特異的miRNA（およびその標的配列）は、miR-1及びmiR-217の少なくとも一方を含むものであってもよい。miR-217は膵臓特異的に、miR-1は筋組織および正常細胞特異的に発現しているといわれている。miR-1及びmiR-217は、miR-34a及びmiR-34cの少なくとも一方と組み合わせて用いられる。また、miR-1とmiR-217を組み合わせてもよい。

【0046】

挿入されるmiR-1またはmiR-217の標的配列の個数は、目的の効果を奏するものであれば、種々選択できるが、複数個、例えば2～6個であることが好ましい。

【0047】

また、その他の特に好ましい態様においては、挿入されるポリヌクレオチドが、下記(c)または(d)である。あるいは、(c)または(d)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドであって、(c)または(d)と同様に機能することができるもの、即ち、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）、CVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）、及び、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）とCVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）のそれぞれのうち、少なくとも1つに挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞特異的に増殖を抑制することができるものである。また、膵臓において組織特異的に増殖を抑制することができるものである（図7参照）。あるいは、(c)または(d)に示したヌクレオチド配列と、少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは98%、さらに好ましくは99%の配列同一性を有する配列からなるポリヌクレオチドであって、(c)または(d)と同様に機能することができるもの、即ち、CVB3-WTゲノムの各位置に挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞特異的に増殖を抑制することができるものである。また、膵臓において組織特異的に増殖を抑制することができるものである。

(c) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TAt cac TCC AAT CAG TTC CTG ATG CAG TA (配列番号5)

(d) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtT CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT Atc acT CCA ATC AGT TCC TGA TGC AGT A (配列番号6)

【0048】

また、その他の特に好ましい態様においては、挿入されるポリヌクレオチドが、下記(e)または(f)である。あるいは、(e)または(f)において1～数個のヌクレオチドを欠失、置換若しくは付加した配列からなるポリヌクレオチドであって、(e)または(f)と同様に機能

10

20

30

40

50

することができるもの、即ち、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）、CVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）、及び、CVB3-WTゲノムの位置742と743との間（5'UTR領域）とCVB3-WTゲノムの位置7304と7305との間（3'UTR領域）のそれぞれのうち、少なくとも1つに挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞・組織特異的に増殖を抑制することができるものである。また、筋組織において組織特異的に増殖を抑制することができるものである。あるいは、(e)または(f)に示したヌクレオチド配列と、少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは98%、さらに好ましくは99%の配列同一性を有する配列からなるポリヌクレオチドであって、(e)または(f)と同様に機能することができるもの、即ち、CVB3-WTゲノムの各位置に挿入され、遺伝子改変コクサッキーウイルスを構成したときに、正常細胞特異的に増殖を抑制することができるものである。また、筋組織において組織特異的に増殖を抑制することができるものである。

10

(e) ACA ACC AGC TAA GAC ACT GCC Acg atA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA acc ggt ATA CAT ACT TCT TTA CAT TCC Atc acA TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA（配列番号7）

(f) GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTc gat GCA ATC AGC TAA CTA CAC TGC CTa ccg gtA TAC ATA CTT CTT TAC ATT CCA tca cAT ACA TAC TTC TTT ACA TTC CA（配列番号8）

【0049】

〔遺伝子改変ウイルスの調製、その他〕

本発明の遺伝子改変ウイルスは、CVB3-WTを遺伝子操作することにより調製できる。CVB3-WTは、検体等から既知のウイルス単離方法によって単離できる。ウイルス単離方法の例は、遠心分離、培養細胞によるウイルスの増殖等である。いったん遺伝子改変コクサッキーウイルスが調製されれば、ウイルスの生産のための分子生物学的な種々の方法を用いて、当該遺伝子改変コクサッキーウイルスを増やすことができる。

20

【0050】

遺伝子改変の元となるCVB3は、癌細胞への高い感染性を獲得するよう、天然に存在しているウイルスを、多数回の継代にわたって細胞株において培養することによって生物選抜してもよい。生物選抜に好適な細胞株の例は、CAR、DAF等を発現する癌細胞株である。

【0051】

本発明にしたがって調製された遺伝子改変コクサッキーウイルスの評価は、当業者にはよく知られたin vitroまたはin vivoの種々の手段により、安全性、効力、力価等の様々な側面について評価することができる。例えば、癌細胞に対する攻撃性（溶解性、傷害性）は、CVB3に暴露された癌細胞の細胞株の生存を試験することで確認することができる。細胞株の生存を試験する方法には、例えば、固定した細胞を染色液で染色して、染色された生細胞の数を定量する方法、クリスタルバイオレット法、アポトーシス特異的なマーカーを定量する方法等がある。これらの方法を用いて、CVB3とインキュベーションされた癌細胞の細胞株について、所定時間後に生存している癌細胞を定量することで、結果的に、CVB3の感染による細胞傷害性によって、死滅した癌細胞を定量することができる。

30

【0052】

本発明者らが、遺伝子改変CVB3（miR-34aの標的配列またはmiR-34cの標的配列が挿入されたもの）の産生および力価の測定に関して、H1299細胞で産生した遺伝子改変CVB3を用いて、H1299細胞でウイルス力価の測定を行ったところ、遺伝子改変CVB3のウイルス力価はCVB3-WTのウイルス力価にやや劣るものの、十分なウイルス力価を有する結果を示した（図8参照）。したがって、本発明の一態様においては、遺伝子改変ウイルス産生およびウイルス力価測定には、H1299細胞が適切である。本発明により、遺伝子改変コクサッキーウイルスの、力価測定または増殖のためには、対応する正常細胞特異的miRNAの発現量が高くない細胞（例えば、H1299細胞）の使用が提案される。

40

【0053】

〔医薬組成物〕

<適用疾患>

本発明によって提供される医薬組成物の一態様は、上述の遺伝子改変CVB3を有効成分と

50

して含む。医薬組成物が処置の対象とする癌種は、特に限定されず、固形癌および液性癌を含む。CVB3は、固形癌および液性癌の癌細胞に対する細胞傷害性を有する。CVB3による癌細胞に対する細胞傷害性は、ウイルスが癌細胞に感染し、癌細胞の細胞質で複製することによる癌細胞の溶解によるか、ウイルスの感染に起因する癌細胞内のカスパーゼの活性化によるアポトーシスによる。CVB3は、細胞表面のCARを認識して、当該細胞に感染することができる。なお、本発明に関し、疾患または状態に関連して「処置（する）」というときは、予防および治療を含む。

【0054】

CVB3は、固形癌および液性癌の癌細胞に対する細胞傷害性を有するが、固形癌であって、特に強い細胞傷害性が誘導される癌細胞は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、悪性中皮腫、大腸癌、結腸直腸癌、食道癌、下咽頭癌、ヒトBリンパ腫、乳癌および子宮頸癌からなる群から選択されるいずれかの癌の細胞である。したがって本実施の形態に係る医薬組成物は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、悪性中皮腫、大腸癌、結腸直腸癌、食道癌、下咽頭癌、ヒトBリンパ腫、乳癌および子宮頸癌からなる群より選択されるいずれかを対象に適用されるのが好ましい。

10

【0055】

肺癌は、罹患者数が上位の癌種である。本実施の形態に係る医薬組成物により、より多くの肺癌患者の治療に貢献できる。大腸癌、結腸直腸癌は、欧米型食生活の定着した日本において罹患者が増加しており、死亡率も増加している。本実施の形態に係る医薬組成物により、大腸癌、結腸直腸癌に対する治療薬の選択肢が増えることは患者にとって有益である。食道癌は、手術切除後の再発率が30～50%と高く、既存の薬剤に対する感受性が低い。本実施の形態に係る医薬組成物によって食道癌の治療成績の向上が期待できる。

20

【0056】

また、本実施の形態に係る医薬組成物は、CDDP抵抗性、ゲフィチニブ抵抗性またはオキサリプラチン抵抗性の癌の細胞に対して強い細胞傷害性を有する。このため、これらの抗癌剤に抵抗性を示す、いわゆる難治性癌に対する有効な治療を提供することができる。

【0057】

また、本実施の形態に係る医薬組成物は、CVB3を含む場合、癌幹細胞に対しても強い細胞傷害性を示す。癌幹細胞は、癌再発の原因の1つと考えられており、癌の転移および再発の防止に有用である。

30

【0058】

<剤形、用法、用量>

また、本実施の形態に係る医薬組成物は、種々の剤形とし、種々の投与経路を採ることができる。すなわち、本実施の形態に係る医薬組成物は、局所用の製剤とすることもできる、全身投与用の製剤とすることもできる。例えば、注射剤または点滴剤とし、癌種に応じて腫瘍内投与、静脈投与、胸腔内投与、腹腔内投与とすることができる。特に、食道癌、大腸癌等の消化器癌の多くは、内視鏡等で腫瘍組織を視認しながら、医薬組成物を腫瘍組織に直接注射できる。この場合、内視鏡等で注射した部位を確認できるため、出血しても対処しやすいという利点もある。他に、経口投与でもよいし、筋肉、皮下、直腸、膣、鼻腔等を介して投与してもよい。

40

【0059】

本実施の形態に係る医薬組成物は、遺伝子改変CVB3に加えて、キャリア、希釈剤または補助剤等を含むようにしてもよい。キャリアとしては、例えば、リポソーム、ミセル等が好ましい。リポソームは、脂質と膜安定性に寄与するステロイドまたはステロイド前駆体との組み合わせを含む。この場合、脂質としては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド、ガングリオシド等のホスファチジル化合物が挙げられる。リポソームまたはミセルで覆われたCVB3は、宿主の免疫応答を低下させることができる。

【0060】

希釈剤としては、例えば、脱塩水、蒸留水および生理的食塩水等が挙げられる、また、

50

補助剤としては、植物系オイル、セルロース誘導体、ポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル等が挙げられる。

【0061】

経口投与の場合、当該医薬組成物は、甘味剤、崩壊剤、希釈剤、コーティング剤、保存剤等を含有してもよい。

【0062】

本実施の形態に係る医薬組成物は、CVB3が、癌を治療するのに十分な量となるように投与される。投与量は、患者の体重、年齢、性別、腫瘍組織の大きさ等に基づいて決定される。例えば、当該医薬組成物を液剤とする場合、CVB3が液剤1mlに $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ TCID₅₀ (50%組織培養感染量) 含まれていればよい。好ましくは、CVB3が液剤1mlに 1×10^5 TCID₅₀以上含まれていればよい。当該医薬組成物は、単回で投与してもよいし、複数回で投与してもよい。また、当該医薬組成物は、徐放製剤として持続的に投与してもよい。

10

【0063】

<他の製剤との併用>

本実施の形態に係る医薬組成物は、抗癌剤と併用してもよい。当該医薬組成物と異なる作用機序を有する抗癌剤を併用することで、抗腫瘍効果の向上が期待できる。抗癌剤は、特に限定されないが、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、悪性中皮腫、大腸癌、結腸直腸癌、食道癌、下咽頭癌、ヒトBリンパ腫、子宮頸癌および膀胱癌等の治療に用いられるものが望ましい。具体的には、抗癌剤は、CDDP (シスプラチン)、ゲフィチニブ、オキサリプラチンなどである。

20

【0064】

[その他]

本発明の実施の形態に係る医薬組成物は、癌細胞に感染可能な、CVB3 (遺伝子改変体を含む。以下同様。) に由来するポリヌクレオチドを有効成分として含んでもよい。CVB3に由来するポリヌクレオチドは、それぞれCVB3から直接単離されたウイルスRNA、合成RNA、単離されたウイルスRNAの塩基配列に対応するcDNAであってもよい。ウイルスRNAを単離するには、任意の方法を使用することができる。ウイルスRNAを単離する方法は、例えば、フェノール/クロロホルム抽出の使用に基づく方法等である。また、当該ポリヌクレオチドは、ウイルスを生じさせるためのポリヌクレオチドを組み込んだウイルスプラスミドや発現ベクターであってもよい。発現ベクターには、例えば、ウイルスを生じさせるために必要なウイルスタンパク質をコードするRNAを発現することができるプラスミドが含まれる。発現ベクターには、挿入されたポリヌクレオチドが機能的に連結された転写調節制御配列が含まれてもよい。ここでの転写調節制御配列は、例えば、転写を開始させるためのプロモーター、転写されたmRNAに対するリボソームの結合を可能にするための発現制御エレメント等である。

30

【0065】

発現ベクターとしては、例えば、pSV2neo、pEF-PGk、puro、pTk2、非複製アデノウイルスシャトルベクター、サイトメガロウイルスプロモータ等を用いることができる。ウイルスを生じさせるために必要なウイルスタンパク質をコードするcDNAは、ウイルスRNAまたはそのフラグメントを逆転写することによって調製することができる。

40

【0066】

本実施の形態に係る医薬組成物は、癌細胞に感染可能な、CVB3に由来するポリヌクレオチドに加えて、例えば、リボソーム等のキャリアを含むようにしてもよい。CVB3に由来するポリヌクレオチドは、例えば配列番号1または2の配列からなるポリヌクレオチド、および/または配列番号3~8、19、20、25、26のいずれか一の配列からなるポリヌクレオチドを含むものであってもよい。

【0067】

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲は、実施例に限定されない。

【0068】

本発明における組織特異的miRNAの標的配列の種類と、この標的配列が挿入されるCVB3-

50

WTゲノムの位置の一例として、以下の表1に示す内容を挙げる。

【0069】

【表1】

No.	name(Virus)	5'UTR(between 742 & 743)	3'UTR(between 7304 & 7305)
1	CVB3-34aT-3	—	miR-34aT×4
2	CVB3-34cT-3	—	miR-34cT×4
3	CVB3-34aT-5	miR-34aT×4	—
4	CVB3-34cT-5	miR-34cT×4	—
5	CVB3-34aT-53	miR-34aT×4	miR-34aT×4
6	CVB3-34cT-53	miR-34cT×4	miR-34cT×4
7	CVB3-34a&217T-53	miR-34aT×2 & miR-217T×2	miR-34aT×2 & miR-217T×2
8	CVB3-34c&217T-53	miR-34cT×2 & miR-217T×2	miR-34cT×2 & miR-217T×2

【0070】

表1の内容を説明すると、表の左側から番号、ウイルス名称、CVB3-WTのゲノム5' untranslated region (UTR) 内の位置742-743bpの間に挿入された標的配列の種類、及びCVB3-WTのゲノム3' untranslated region (UTR) 内の位置7304-7305bpの間に挿入された標的配列の種類となっている。例えば、No.7のウイルス (CVB3-34a&217T-53) であれば、5'UTR内の位置742-743bpの間と、3'UTR内の位置7304-7305bpの間とのそれぞれに、miR-34aの標的配列2つとmiR-217の標的配列2つとを組み合わせたポリヌクレオチドが挿入された改変ウイルスとなっている。標的配列としては合計8つのmiRNA標的配列がゲノム上に挿入されている。即ち、5'UTR内の位置742-743bpの間に、miR-34aの標的配列2つとmiR-217の標的配列2つが挿入されている。また、3'UTR内の位置7304-7305bpの間に、miR-34aの標的配列2つとmiR-217の標的配列2つが挿入されている。

【実施例】

【0071】

I. miRNA標的配列挿入によるCVB3の安全性向上

本研究の目的は、腫瘍溶解性野生型CVB3 (CVB-WT) の遺伝子改変ウイルスについて正常細胞での増殖を抑制する点にある。我々はCVB3-WTのゲノム3' untranslated region (UTR)、特にCVB3ゲノムの7304-7305bpの間に、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列を挿入し、遺伝子改変ウイルスを作製した。また、我々は、CVB3-WTのゲノム5' untranslated region (UTR)、特にCVB3ゲノムの742-743bpの間に、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列を挿入し、遺伝子改変ウイルスを作製した。更に我々は、CVB3-WTのゲノムの5'UTR内の位置742-743bpの間と、3'UTR内の位置7304-7305bpの間とのそれぞれに、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列を4つ挿入、あるいはmiR-34aの標的配列2つとmiR-217の標的配列2つとを組み合わせたポリヌクレオチドを挿入し、遺伝子改変ウイルスを作製した。挿入したmiR-34a、miR-34cまたはmiR-217の標的配列に、正常細胞で高発現したmiR-34a、miR-34cまたはmiR-217を有したRISC複合体が結合し、ウイルスタンパク質の翻訳等を阻害するため、正常細胞での増殖抑制が可能となる。

【0072】

I-1. 標的配列のCVB3ゲノムへの挿入とウイルス力価

我々は、全身の正常細胞において高発現が認められているmiR-34ファミリーを構成する2つのmiRNA、即ち、miR-34a及びmiR-34cに着目し、各miRNAの標的配列が4つ連続している二種類のmiRNA標的配列 (miR-34aT×4+(miR-34aT×4-)、miR-34cT×4+(miR-34cT×4-)) を作製した。

また、miR-34aの標的配列2つとmiR-217の標的配列2つとを組み合わせたmiRNA標的配列 (miR-34aT×2&miR-217T×2+(miR-34aT×2&miR-217T×2-)) を作製した。

miR-34aまたはmiR-34cの標的配列をそれぞれCVB3ゲノムの7304-7305bpの間に挿入した。また、miR-34aまたはmiR-34cの標的配列をそれぞれCVB3ゲノムの742-743bpの間に挿入した。更に、miR-34a及びmiR-217の標的配列を、CVB3ゲノムの742-743bpの間と、CVB3ゲノムの7304-7305bpの間のそれぞれに挿入した。標的配列のゲノムへの挿入は、In-Fusion クローニング (TaKaRa社) 法を用いて行った (図4、図5及び図6参照)。In-Fusion クローニング法は、市販のキットを購入することで、容易に実施することができる (TaKaRa社)。各遺伝子改変CVB3はどちらも (CVB3-miR-34aT、CVB3-miR-34cT) 肺癌細胞株 (NCI-

10

20

30

40

50

H1299細胞)において増殖を認め、遺伝子改変CVB3の作製に成功した。なお、図6は、CVB3-WTのゲノムの5'UTR内への挿入位置を示す図であり、例として5'UTR内の位置742-743bpの間に、miR-34cの標的配列を4つ挿入した配列を示している。

【0073】

以降、特に記載した場合を除き、

CVB3-34aT-3とは、miR-34aの標的配列を4つ(配列番号3のポリヌクレオチド)3'UTRに挿入したものを指し、

CVB3-34cT-3とは、miR-34cの標的配列を4つ(配列番号4のポリヌクレオチド)3'UTRに挿入したものを指している。

また、CVB3-34aT-5とは、miR-34aの標的配列を4つ(配列番号3のポリヌクレオチド)5'UTRに挿入したものを指し、

CVB3-34aT-53とは、miR-34aの標的配列を4つずつ(配列番号3のポリヌクレオチド)5'UTR及び3'UTRに挿入したものを指している。

更に、CVB3-34a&217T-53とは、miR-34aの標的配列を2つ及びmiR-217の標的配列を2つからなるポリヌクレオチド(配列番号25のポリヌクレオチド)を、5'UTR及び3'UTRに挿入したものを指している。

また、CVB3-1&217Tとは、miR-1の標的配列を2つ及びmiR-217の標的配列を2つからなるポリヌクレオチド(配列番号29のポリヌクレオチド)を3'UTRに挿入したものを指している。

【0074】

次に、遺伝子改変CVB3のウイルス力価を評価するため、CVB-WTとの間でウイルス力価を比較した。ここでは、H1299細胞を用いてウイルス産生および力価の測定を行った。より詳細には、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスをウイルス未感染のH1299細胞株に導入してウイルスを産生させた。産生したウイルスを回収して、再度、ウイルス未感染のH1299細胞株に感染させてウイルス力価を測定した。H1299細胞でのCVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスの力価は、CVB-WTのウイルス力価にやや劣るものの、TCID₅₀/mlの値が 1.0×10^8 を超えており非臨床試験に供するに十分な力価を有するものであることが明らかとなった(図8参照)。

【0075】

I-2. 癌細胞及び正常細胞に対する遺伝子改変ウイルスの腫瘍溶解性活性の評価

次に、各種癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスの増殖と腫瘍溶解効果の有無について評価した。癌細胞として、肺癌細胞株であるNSCLC(A549細胞、H1299細胞)、肝癌細胞株であるAsPC-1細胞、乳癌細胞株であるZR-75-1細胞を、正常細胞として、正常気道上皮細胞であるBEAS-2B細胞、食道正常扁平上皮細胞であるHet-1A細胞を用いるものとした。

【0076】

その結果、各癌細胞において、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は十分な腫瘍溶解効果を示す結果が得られた(図9参照)。特に、A549細胞、H1299細胞及びAsPC-1細胞において、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、CVB3-WTと同様の挙動を示すものとなった。一方、正常細胞においては、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3と、CVB3-WTとの間で腫瘍溶解効果に差が生じており、BEAS-2B細胞では、CVB3-WTと比較して100倍のウイルス量を感染しても腫瘍溶解効果が見られないということが明らかとなった(図9参照)。また、Het-1A細胞においてもCVB3-WTと比較して10倍のウイルス量を感染しても腫瘍溶解効果が見られないということが明らかとなった(図9参照)。

以上のことから、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、癌細胞においてウイルスの増殖が可能であり、腫瘍溶解性効果を発揮することが明らかとなった。また、CVB3-WTと異なり、正常細胞において腫瘍溶解効果を発揮せず、ウイルス増殖が抑制されていることが明らかとなった。

【0077】

次に、各種癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、CVB3-34aT-3、CVB3-34aT-5、CVB3-34

10

20

30

40

50

aT-53及びCVB3-34a&217T-53の各ウイルスの増殖と腫瘍溶解効果の有無について評価した。癌細胞として、上述したNSCLC (H1299細胞：通常) と、既知の方法でmiR-34aを強制的に高発現させたNSCLC (H1299細胞：高発現) と、上述したBEAS-2B細胞を用いるものとした。なお、miR-34aを強制的に高発現させたH1299細胞の準備については既知の方法を用いた為、その作成方法については説明を省略する。

【0078】

その結果、通常のH1299細胞では、各ウイルスが十分な腫瘍溶解効果を示す結果が得られた(図10の上図参照)。また、miR-34aを高発現させたH1299細胞では、CVB3-WTと、その他のウイルスとの間で腫瘍溶解効果に差が生じており、CVB3-WTと比較して100倍のウイルス量を感染しても腫瘍溶解効果が見られないということが明らかとなった(図10の左下図参照)。また、BEAS-2B細胞でも、CVB3-WTと、その他のウイルスとの間で腫瘍溶解効果に差が生じており、CVB3-WTでは、ウイルス濃度が大きなサンプル(MOI=10⁻¹及びMOI=1)で、腫瘍溶解性効果が確認されたが、その他のウイルスでは、最もウイルス濃度が大きなサンプル(MOI=1)でも腫瘍溶解性効果が確認されなかった(図10の右下図参照)。

10

以上のことから、CVB3-34aT-3、CVB3-34aT-5、CVB3-34aT-53及びCVB3-34a&217T-53は、癌細胞においてウイルスの増殖が可能であり、腫瘍溶解性効果を発揮することが明らかとなった。更に、miR-34aを強制的に高発現させた癌細胞や正常細胞において、CVB3-WTと異なり、腫瘍溶解効果を発揮せず、ウイルス増殖が抑制されていることが明らかとなった。

【0079】

20

次に、各種癌細胞及び正常細胞におけるCVB3-WT、miR-1&217T、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスの増殖と腫瘍溶解効果の有無について評価した。癌細胞として、上述したNSCLC (H1299細胞) と、BEAS-2B細胞を用いるものとした。

【0080】

その結果、H1299細胞では、各ウイルスが十分な腫瘍溶解効果を示す結果が得られた(図11の左図参照)。正常細胞においては、CVB3-WTとmiR-1&217TはMOI=10⁻²のウイルス濃度で、それぞれ腫瘍溶解性効果が確認された。一方、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3では、最もウイルス濃度が大きなサンプル(MOI=1)でも腫瘍溶解性効果が確認されなかった(図11の右図参照)。

以上のことから、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、癌細胞においてウイルスの増殖が可能であり、腫瘍溶解性効果を発揮することが明らかとなった。更に、正常細胞において、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、miR-1&217TやCVB3-WTと異なり、腫瘍溶解効果を発揮せず、ウイルス増殖が抑制されていることが明らかとなった。

30

【0081】

続いて、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを感染させた癌細胞及び正常細胞の細胞生存性試験をMTS法にて評価した。H1299細胞で産生したCVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを、ウイルス未感染のH1299細胞(1.0×10⁴ cells)に感染させ、24時間後、48時間後及び72時間後の細胞生存率を測定した。MOI=0.001の試験では、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3のいずれも、72時間後のH1299細胞はほぼ死滅していた(図12参照)。また、MOI=0.01の試験では、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3のいずれも、72時間後のH1299細胞はほぼ死滅していた(図13参照)。

40

【0082】

また、H1299細胞で産生したCVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを、ウイルス未感染のBEAS-2B細胞(1.0×10⁴ cells)に感染させ、24時間後、48時間後及び72時間後の細胞生存率を測定した。MOI=0.01の試験では、CVB3-WTにおいて72時間後のBEAS-2B細胞の細胞はほぼ死滅しているのに対して、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3では、72時間後のBEAS-2B細胞の生存が確認された(図14参照)。

【0083】

以上のことから、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、癌細胞においてウイルスの増殖が可能であり、腫瘍溶解性効果を発揮することが明らかとなった。また、CVB3-WTと異なり、

50

正常細胞においてはウイルス増殖が抑制され、細胞傷害性が強く抑制されていることが明らかとなった。

【0084】

更に、72時間後のBEAS-2B細胞 (1.0×10^4 cells) と、Het-1A細胞 (1.0×10^4 cells) の細胞生存率を図15で示す。

図15で示すように、MOI=0.001及びMOI=0.01で、Het-1A細胞の細胞生存率が、CVB3-WTよりもCVB3-34aT-3が高く、CVB3-34aT-3よりもCVB3-34cT-3が更に高い値を示した。

【0085】

続いて、以下、図16では、CVB3-WT、CVB3-34aT-3、CVB3-34aT-5、CVB3-34aT-53及びCVB3-34a&217T-53の各ウイルス（癌細胞ではMOI=0.001、正常細胞ではMOI=0.1）を感染させた癌細胞及び正常細胞の細胞生存性試験を、上記と同様にMTS法にて評価した結果を示す。図16に示す試験では、癌細胞として、肺癌細胞株であるNSCLC（A549細胞 (1.0×10^4 cells)）、H1299細胞 (1.0×10^4 cells)）、膀胱癌細胞株であるAsPC-1細胞 (1.0×10^4 cells) と、正常細胞としてBEAS-2B細胞 (1.0×10^4 cells) をそれぞれ用いた、72時間後の細胞生存率を示している。

【0086】

図16に示すように、BEAS-2B細胞の細胞生存率が、CVB3-WTよりもその他の各ウイルスにおいて高くなる結果を示した。また、CVB3-34aT-3及びCVB3-34aT-5と比べて、CVB3-34aT-53及びCVB3-34a&217T-53の細胞生存率が高くなる結果を示した。

【0087】

続いて、以下、図17では、CVB3-WT、miR-1&217T、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルス（癌細胞ではMOI=0.001、正常細胞ではMOI=0.1）を感染させた癌細胞及び正常細胞の細胞生存性試験を、上記と同様にMTS法にて評価した結果を示す。図17に示す試験では、癌細胞として、H1299細胞 (1.0×10^4 cells) を、正常細胞として、BEAS-2B細胞 (1.0×10^4 cells) をそれぞれ用いた、72時間後の細胞生存率を示している。

【0088】

図17に示すように、BEAS-2B細胞の細胞生存率が、CVB3-WTよりもその他の各ウイルスにおいて高くなる結果を示した。また、miR-1&217Tと比べて、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の細胞生存率が高くなる結果を示した。

【0089】

I-3. マウスを用いた腫瘍形成実験 (in vivo)

次に、マウスに癌細胞株 (H1299) を投与して腫瘍を形成し、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを腫瘍内に投与して、腫瘍の変化を観察した。詳細な試験内容は後述するが、一定期間観察を行い、腫瘍の体積 (図18 (a) 参照)、マウスの生存率 (図18 (b) 参照) 及びマウスの体重 (図19参照) について評価を行った。マウスの腫瘍の長径が0.4cmに達したところで、治療群のマウスには、各ウイルスを隔日で最大5回 (Day 2, 4, 6, 8, 10) まで投与した。また、未治療群のマウスには、Opti-MEMを隔日で最大5回 (Day 2, 4, 6, 8, 10) まで投与した。各ウイルスまたはコントロールあたりn=4の数で検討した。

【0090】

その結果、図18 (a) に示すように未治療群 (untreated) のマウスでは、癌細胞株 (H1299) を投与した日から経時的に腫瘍体積が大きくなる結果が観察された。一方、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを投与した治療群のマウスにおいては、腫瘍は大きくなり、最終的には腫瘍が確認されない結果となった。また、図18 (b) に示すように、未治療群 (untreated) のマウスでは、癌細胞株 (H1299) を投与した日から約30日でマウスの生存率が0%となった。一方、CVB3-WT、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを投与した治療群のマウスにおいては、癌細胞株 (H1299) を投与した日から約60日経過後も生存率が100%となった。なお、生存率は、n=3または4のマウスの試験数から算出している。

【0091】

更に、図 19 に示すように、マウスの体重変化においては、CVB3-WTを投与した治療群のマウスにおいて、癌細胞株（H1299）を投与した日から 10 日～20 日で一時的な体重の減少が観察された。一方、未治療群（untreated）のマウスと、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを投与した治療群のマウスでは、体重の減少は観察されなかった。なお、CVB3-WTを投与したマウスで見られた体重の減少は、CVB3-WTを投与することで生じる副作用の影響により生じたものと推定される。

【0092】

以上の結果から、マウスを用いたin vivoの試験においても、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスが、ヒト肺癌細胞株（H1299）に対して、CVB3-WTと同様の腫瘍溶解性効果を発揮することが明らかとなった。また、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3の各ウイルスを投与したマウスでは、CVB3-WTを投与したマウスで生じた一時的な体重の減少が生じないことから、副作用の発生が抑制されている可能性が示唆された結果となった。

【0093】

I-4. マウスを用いた血液生化学検査（in vivo）

次に、マウスに癌細胞株（H1299）を投与して腫瘍を形成し、CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53及びmiR-1&217Tの各ウイルスを腫瘍内に投与して、各ウイルスの一回投与群のマウス及び二回投与群のマウスから血液を採取して、血液生化学検査を行った。詳細は後述するが、血液生化学検査では、CVB3-WTの投与により生じる副作用のマーカーであるGOP/AST（肝臓、心筋）、LDH（肝臓、心筋及び腎臓）、GPT/ALT（肝臓、心筋）及びAmy（膵臓）について、乾式臨床化学分析装置にて血液中の各成分量を測定して、副作用の有無を評価した。なお、一回投与群のマウスは、癌細胞株（H1299）を投与した日から2日目にウイルスを腫瘍内に投与して、その2日後にマウスの血液を採取した。また、二回投与群のマウスは、癌細胞株（H1299）を投与した日から2日目及び4日目にウイルスを腫瘍内に投与して、更に2日後にマウスの血液を採取した。各ウイルスまたはコントロールあたりn=3または4の数で検討した。

【0094】

その結果、図 20 に示すように一回目投与群では、CVB3-WTを投与したマウスにおいて各マーカーの成分量が多く検出され、副作用が生じていた。一方、CVB3-34a&217T-53及びmiR-1&217Tの各ウイルスを投与したマウスはコントロールと同程度の成分量が検出された。また、図 21 に示すように、二回目投与群では、miR-1&217Tを投与したマウスにおいて、各マーカーの成分量が最も多く検出された。一方、CVB3-34a&217T-53を投与したマウスでは、コントロールと同程度かそれ以下の成分量を示す結果となった。なお、二回目投与群でCVB3-WTを投与したマウスの成分量がそれほど多く検出されなかったのは、一回目投与のタイミングで、既に各マーカーの成分量が上がり、その後減少したことが推定される。

【0095】

また、図 22 には、CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53、CVB3-34aT-53及びmiR-1&217Tの各ウイルスを腫瘍内に投与した、二回目投与群のマウスの結果を示している。この結果、CVB3-WT及びmiR-1&217Tを投与したマウスにおいて各マーカーの成分量が多く検出され、副作用が生じていた。一方、CVB3-34aT-53を投与したマウスは、コントロールよりも各マーカーの成分量が多く検出されたものの、CVB3-WT及びmiR-1&217Tよりも各マーカーの成分量が少ない結果となり、これらのウイルスよりも副作用が抑えられていることが確認された。更に、CVB3-34a&217T-53を投与したマウスでは、コントロールと同等かそれ以下の各マーカーの成分量を示すものとなった。

【0096】

以上の結果から、マウスを用いた血液生化学検査において、CVB3-34a&217T-53及びCVB3-34aT-53を投与したマウスでは、CVB3-WTを投与したマウスで生じた副作用の発生が抑制されていた。また、CVB3-34a&217T-53とmiR-1&217Tを比較すると、CVB3-34a&217T-53の方がより副作用の発生を抑制しうることが明らかとなった。更に、CVB3-34a&217T-53とCVB3-34aT-53を比較すると、CVB3-34a&217T-53の方がより一層副作用の発生を抑制しうること

が明らかとなった。

【0097】

I-5 標的配列の挿入位置としての5'UTRと3'UTRの比較

次に、CVB3ゲノムの5'UTR（位置742-743bpの間）と3'UTR（位置7304-7305bpの間）に各標的配列を挿入して、標的配列挿入後のウイルスを3回または6回継代培養して、標的配列のゲノムからの脱落の有無を確認し、標的配列の保持安定性を評価した。CVB3ゲノムの塩基長は約400bpであり、各標的配列をCVB3ゲノムに挿入した塩基長は約500bpである。各試料から抽出したCVB3ゲノムを、既知の電気泳動法で泳動して、塩基長を確認した。即ち、CVB3ゲノムから標的配列の脱落が生じていると、塩基長が約400bpとして確認される。

【0098】

図23（a）には、標的配列を挿入していないCVB3-WTから抽出したゲノムと、3回継代培養したCVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3から抽出したゲノムを用いて、標的配列挿入部位付近をPCR反応で増幅し、その産物を電気泳動した泳動結果を模式的に示している。また、図23（b）には、標的配列を挿入していないCVB3-WTから抽出したゲノム、6回継代培養したCVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3から抽出したゲノム、10回継代培養したCVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3から抽出したゲノムを用いて、標的配列挿入部位付近をPCR反応で増幅し、その産物を電気泳動した泳動結果を模式的に示している。即ち、図23（a）及び図23（b）には、3'UTRに標的配列を挿入して、各ウイルスを継代培養した結果となる。

【0099】

また、図24（a）乃至図24（f）には、標的配列を挿入していないCVB3-WTから抽出したゲノムと、各標的配列を挿入したウイルスを3回、6回及び10回継代培養したものから抽出したゲノムを用いて、標的配列挿入部位付近をPCR反応で増幅し、その産物を電気泳動した泳動結果を模式的に示している。図24（a）は、CVB3-34aT-53ウイルスゲノムにおける5'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。図24（b）は、CVB3-34a&217T-53ウイルスゲノムにおける5'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。図24（c）は、CVB3-34aT-5ウイルスゲノムにおける5'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。図24（d）は、CVB3-34cT-5ウイルスゲノムにおける5'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。図24（e）は、CVB3-34aT-53ウイルスゲノムにおける3'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。図24（f）は、CVB3-34a&217T-53ウイルスゲノムにおける3'UTRに挿入した標的配列付近のPCR反応の結果である。即ち、図24（a）乃至図24（d）は、5'UTRに標的配列を挿入した各ウイルスを継代培養した結果となる。また、図24（e）及び図24（f）は、3'UTRに標的配列を挿入した各ウイルスを継代培養した結果となる。

【0100】

その結果、図23（a）及び図23（b）から、CVB3-34aT-3及びCVB3-34cT-3は、3回継代培養した時点ではゲノム上に保持されているが、6回または10回継代培養した時点で、標的配列がゲノム上から脱落していることが明らかとなった。

【0101】

また、図24（a）乃至図24（d）から、5'UTRに各標的配列を挿入したウイルスでは、3回、6回及び10回継代培養した時点でもゲノム上から脱落せずに標的配列が保持されていることが明らかとなった。更に、図24（e）及び図24（f）から、3'UTRに各標的配列を挿入したウイルスでは、3回、6回または10回継代培養した時点で、標的配列がゲノム上から脱落していることが明らかとなった。以上の結果から、miRNAの表的配列を挿入する位置として、CVB3のゲノム上では、5'UTR（位置742-743bpの間）の方が、3'UTR（位置7304-7305bpの間）よりも標的配列を安定的に保持できるものであることが明らかとなった。

【0102】

I-6. METHODS SUMMARY

以下のプロトコールにしたがって、本研究は行われた。

【 0 1 0 3 】

[各遺伝子改変ウイルスの作製]

<作成したウイルスの名称>

- ・ CVB3-34aT-3
- ・ CVB3-34cT-3
- ・ CVB3-34aT-5
- ・ CVB3-34cT-5
- ・ CVB3-34aT-53
- ・ CVB3-34a&217T-53
- ・ miR-1&217T

10

<ベクター構築>

(Materials & reagents)

- ・ CVB3 Plasmid
- ・ KOD -Plus-neo
- ・ UltraPure
- ・ Primer(CVB3-miR-34aT)

miR-34aT-Inverse Forward

AACCAGCTAAGACACTGCCAGAGACAATTTGAAATAATTTAGATTGG (10pmol/ μ l) (配列番号 9)

miR-34aT-Inverse Reverse

GCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTAATCTAAAAGGAGTCCAACC (10pmol/ μ l)

20

(配列番号 1 0)

miR-34aT $\times$ 4+

ACAACCAGCTAAGACACTGCCAacgatACAACCAGCTAAGACACTGCCAaccggtACAACCAGCTAAGACACTGCCAtcac

ACAACCAGCTAAGACACTGCCA (1umol/ μ l)

(配列番号 3)

miR-34aT $\times$ 4-

TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTgtgaTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTaccggtTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTatcg

TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT (1umol/ μ l)

(配列番号 1 1)

- ・ Primer(CVB3-miR34cT)

30

miR-34cT-Inverse Forward

ATCAGCTAACTACACTGCCTGAGACAATTTGAAATAATTTAGATTGG (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 2)

miR-34cT-Inverse Reverse

CAGTGTAGTTAGCTGATTGCTAATCTAAAAGGAGTCCAACC (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 3)

miR-34cT $\times$ 4+

GCAATCAGCTAACTACACTGCCTcgatGCAATCAGCTAACTACACTGCCTaccggtGCAATCAGCTAACTACACTGCCTt

cacGCAATCAGCTAACTACACTGCCT (10umol/ μ l)

(配列番号 4)

40

miR-34cT $\times$ 4-

AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCgtgaAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCaccggtAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC

tcgAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC (10umol/ μ l)

(配列番号 1 4)

CVB3-34a-5-Reverse

GCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTTTGCTGTATTCAACTTAACAATG (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 5)

CVB3-34a-5-Forward

AACCAGCTAAGACACTGCCAATGGGAGCTCAAGTATCAAC (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 6)

50

CVB3-34c-5-Reverse

GCTTTGCTGTATTCAACTTAACAATGAATTG (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 7)

CVB3-34c-5-Forward

ATGGGAGCTCAAGTATCAAC (10pmol/ μ l)

(配列番号 1 8)

CVB3-in-34c-5+

GTTGAATACAGCAAAGCAATCAGCTAACTACACTGCCTCGATGCAATCAG

CTAACTACACTGCCTACCGGTGCAATCAGCTAACTACACTGCCTTCACGC

AATCAGCTAACTACACTGCCTATGGGAGCTCAAGTA (1 μ mol/ μ l)

(配列番号 1 9)

10

CVB3-in-34c-5-

TACTTGAGCTCCCATAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCGTGAAGGCAGTG

TAGTTAGCTGATTGCACCGGTAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCATCGAG

GCAGTGTAGTTAGCTGATTGCTTTGCTGTATTCAAC (1 μ mol/ μ l)

(配列番号 2 0)

CVB3-34a&217-5-Reverse

GCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTTTGCTGTATTCAACTTAACAATG (10pmol/ μ l)

(配列番号 2 1)

CVB3-34a&217-5-Forward

AATCAGTTCCTGATGCAGTAATGGGAGCTCAAGTATCAACGC (10pmol/ μ l)

(配列番号 2 2)

20

CVB3-34a&217-3-Reverse

GCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTAATCTAAAAGGAGTCCAACCACTTC (10pmol/ μ l)

(配列番号 2 3)

CVB3-34a&217-3-Forward

AATCAGTTCCTGATGCAGTAGAGACAATTTGAAATAATTTAGATTG (10pmol/ μ l)

(配列番号 2 4)

miR-34a $\times$ 2 & miR-217 $\times$ 2+

ACAACCAGCTAAGACACTGCCACGATACAACCAGCTAAGACACTGCCAAC

CGGTTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTATCACTCCAATCAGTTCCTGATGC

AGTA (1 μ mol/ μ l)

(配列番号 2 5)

30

miR-34a $\times$ 2 & miR-217 $\times$ 2-

TACTGCATCAGGAACTGATTGGAGTGATACTGCATCAGGAACTGATTGGA

ACCGTTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTATCGTGGCAGTGTCTTAGCTGG

TTGT (1 μ mol/ μ l)

(配列番号 2 6)

CVB3-miR-Forward

CAGGTCTTTGAGGGGAACAA (20 pmol/ μ l)

(配列番号 2 7)

CVB3-miR-Reverse

ATTAATGCAGCTGGCACGAC (20 pmol/ μ l)

(配列番号 2 8)

miR-1&217T Forward

ttaATACATACTTCTTTACATTCCAcgatATACATACTTCTTTACATTCCAaccggtTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTA

tcacTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAgagacaatttgaaataatttag (20 pmol/ μ l)

(配列番号 2 9)

miR-1&217T Reverse

ctcTACTGCATCAGGAACTGATTGGAgTgaTACTGCATCAGGAACTGATTGGAaccggtTGAATGTAAAGAAGTATGTA

50

TatcgTGAATGTAAAGAAGTATGTATtaatctaaaaggagtccaacca (20 pmol/μl)

(配列番号 30)

【0104】

(Methods)

1. On iceで以下の順に0.2 ml PCR tubeに混合する。

【0105】

【表2】

Reagent	miR-34aT	miR-34cT
UltraPure	33 μl	33 μl
10× Buffer for KOD-Plus-	5 μl	5 μl
2 mM dNTPs	5 μl	5 μl
25 mM MgSO ₄	3 μl	3 μl
Plasmid	1 μl	1 μl
Primer Forward	配列番号9 (1 μl)	配列番号12 (1 μl)
Primer Reverse	配列番号10 (1 μl)	配列番号13 (1 μl)
KOD-Plus- Neo	1 μl	1 μl

10

【0106】

2. タッピングもしくは緩やかなピペティングで攪拌し、軽くスピンドウンして溶液を集める。Eppendorf社のサーマルサイクラーで次のプログラムを実行する。

20

3. (1) miR-34aT: 94°C 2:00、98°C 0:10、60°C 0:30、68°C 6:30 (28 cycle)、72°C 7:00

(2) miR-34cT: 94°C 2:00、98°C 0:10、57°C 0:30、68°C 6:30 (28 cycle)、72°C 7:00

【0107】

4. PCR産物を精製し、Dpn Iで1時間制限酵素処理する。

5. 制限酵素処理産物を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドを切り出す。

6. 二本鎖のインサートを作製する。配列番号3と11、また配列番号4と14をそれぞれ1 μlずつチューブに入れ、annealing bufferで94°C 10:00、-1°C/1minで25°Cまで冷やし、25°C 5:00 反応する。

30

7. ゲル精製後、制限酵素処理後CVB3 plasmid (150 ng)と二本鎖のインサート (60 ng)をin-fusionを用いて、50°C、15min反応させる。

8. In-fusion産物をコンピテントセルに導入し、37°Cで培養する。

9. 翌日、コロニーを拾い、LB培地にて培養する。

10. 培養物からプラスミドを回収し、miRNA標的配列の挿入の有無を確認する。

【0108】

<ウイルスRNA作製>

(Materials & reagents)

40

・MEGAscript(登録商標)Kit Ambion Cat# AM1333 *Store at -20°C

・CVB3 plasmid (CVB3-WT、CVB3-miR-1&217T、CVB3-miR-217T)

・Phenol:Chloroform 5:1, Acid-equilibrated : pH 4.7 Sigma Cat# P1944-100ML Lot#010M1574

・Chloroform nacalai tesque Cat# 08402-55 Lot# V6K0595

・75% Ethanol (Nuclease-free water使用)

・10 mol/l-Ammonium Acetate Solution nacalai tesque Cat# 02432-74 Lot# L2B2291

・UltraPure

【0109】

50

(Methods)

1. 室温で以下の順に0.2 ml PCRチューブに混合する。(Total 20 μ l)

【0 1 1 0】

【表 3】

Reagent	Volume
Linear template DNA (0.1-1 μ g)	x μ l
Nuclease-free Water	(8-x) μ l
ATP solution	2 μ l
CTP solution	2 μ l
GTP solution	2 μ l
UTP solution	2 μ l
10 $\times$ Reaction Buffer	2 μ l
Enzyme Mix	2 μ l
Total	20 μ l

10

【0 1 1 1】

2. サーマルサイクラーで37°C、3h反応させる。(Bio-Rad社サーマルサイクラー使用)
3. 3h後、反応中のチューブにTURBO DNaseを1 μ l加え、よく攪拌し、追加で37°C、15min
4. 事前に1.5mlチューブにUltraPure 114 μ lと付属のAmmonium Acetate Stop Solutionを15 μ l混合した溶液を本数分 $\times$ 1.1倍作製しておく。
5. 反応後、チューブに上記の混合液を129 μ l加え、ピペッティング。
6. 全量を0.7mlチューブに移す。
7. そこに、150 μ lのPhenol : Chloroformを加え、ピペッティング&転倒混和。
8. 室温、10,000 $\times$ g、2 min遠心。
9. 上澄み(約150 μ l)を別の新しい0.7mlチューブに移す。
10. その水層にChloroformを150 μ l加え、転倒混和。
21. 室温、10,000 $\times$ g、2 min遠心。
22. 上澄み(約100 μ l)を別の新しい0.7mlチューブに移す。
23. 冷5 M Ammonium acetateを、その水層に150 μ l加え、ピペッティング。
24. On ice、10 min静置。
25. 4°C、10,000 $\times$ g、15 min遠心。
26. ピペットマンでゆっくり上清を除去する。
27. 75% Ethanolを200 μ l緩やかに加える。
28. 4°C、10,000 $\times$ g、10 min遠心。
29. ピペットマンでゆっくり上清をギリギリまで除去する。
30. ペレットにUltraPureを70 μ l加え溶解。

20

30

【0 1 1 2】

<ウイルス作製>

40

(Materials & reagents)

- ・NCI-H1299 細胞 (1 $\times$ 10⁷ cells/30 ml/dish)
- ・RPMI 1640 w/10% FBS (Growth medium)
- ・Opti-MEM (登録商標) I
- ・LipofectamineTM 2000 Reagent Invitrogen Cat# 11668-019
- ・In vitro transcription産物

【0 1 1 3】

(Methods)

1. 分注したOpti-MEMにRNAを80 μ gになるように液中加入し、もう別チューブに分注したOpti-MEMにLipofectamine 2000を120 μ l液中加入する。

50

2. 両者、室温、5min静置。
3. 両チューブを混合し、室温、20min静置。
4. 20 min後、混合液全量をNCI-H1299細胞に添加する。
5. 4 h後、Growth mediumに置換する。
6. 37°C、5%CO₂、24hインキュベート。
7. Transfectionから25h後、培地を捨てないまま各NCI-H1299細胞をセルスクレーパーで剥離する。
8. 細胞ごと上清を50mlチューブに回収する。
9. 50mlチューブをLiquid N₂に浸けて凍結させる。
10. 37°Cウォーターバスで解凍。 10
11. 5～6の凍結融解を2回繰り返す。(計3回Freeze-Thaw)
12. 4°C、3,000rpm、15min遠心。
13. 上清を移すNCI-H1299細胞の培地を新鮮な培地に置換する。(15ml)
14. 遠心後の上清全量をNCI-H1299細胞に加える。
15. 37°C、5%CO₂、6～8hインキュベート
16. CPEが60～70%以上確認された時点で、培養上清を除去。
17. Opti-MEM（登録商標）Iを2ml加える。
18. セルスクレーパーで細胞を剥離。
19. 細胞ごとOpti-MEM（登録商標）Iを全量、15mlチューブに回収する。
20. この15 mlチューブをLiquid nitrogenに浸けて凍結させる。(約2min) 20
21. 37°Cウォーターバスで解凍。(約10min)
22. 20～21の凍結融解を2回繰り返す (計3回Freeze-Thaw)
23. 4°C、3,000rpm、15min遠心。
24. 上清を-80°Cで保存。

【0114】

<ウイルス力価測定>

(Materials & reagents)

- ・ 96 well plate (flat bottom)
- ・ NCI-H1299 細胞 (5×10³ cells/100 μl/well)
- ・ RPMI1640 w/10%FBS (Growth medium)
- ・ 96 well plate (round bottom)
- ・ Opti-MEM（登録商標）I

30

【0115】

(Methods)

1. NCI-H1299細胞を96 well Flat plateに5×10³ cells/100 μl/wellで全wellに播種。
2. 37°C、5%CO₂、7hインキュベート。
3. Opti-MEMを96 well Round plateに180 μlずつ、2列目から12最終列まで加える。
4. 1列目のウイルス最濃列(通常10⁻²)の為、1.5ml tubeにOpti-MEMを990 μl加え、そこにウイルス原液を10 μl添加、ピペティングをしっかりとし10⁻²液を調整する。
5. ウイルス10⁻²の列の液を96 well Round plateの1列目に120 μlずつ添加する。 40
6. 1列目のウイルス液を、電動8連ピペッターを使用して20 μlずつ2列目に移す。
7. そこで一度ピペティングを行い、チップを変える。
8. 直前に希釈した列から20 μlずつ取り、隣の列に移す。
9. 一度ピペティングを行い、チップを変える。
10. 8.～9.を11列まで繰り返す。
11. NCI-H1299細胞を播種したFlat plateをインキュベーターから取り出す。
12. 8連ピペッターを用いて、Round plateの薄い12列目から順に、Flat PlateのNCI-H1299細胞に50 μlずつ加える。
13. 37°C、5%CO₂、120h (5日間) インキュベート。
14. 50%CPEが見られたwellをカウントする。以下の式を用いてTiterを算出する 50

$$\text{Log}_{10} (\text{TCID}_{50}) = L + d (S - 0.5) + \log_{10} (1/v)$$

【0116】

<細胞生存率測定>

(Materials & reagents)

- ・96 well plate (flat bottom)
- ・NCI-H1299、BEAS-2B、Het-1A細胞(1×10^4 cells/80 μ l/well)
- ・RPMI1640 w/10%FBS (Growth medium)
- ・Opti-MEM (登録商標) I
- ・CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

【0117】

10

(Methods)

1. 1. NCI-H1299、BEAS-2B、Het-1A細胞を96 well Flat plateに 1×10^4 cells/80 μ l/wellで播種。
2. 37°C、5%CO₂、7 hインキュベート。
3. Opti-MEMでウイルスをMOI=0.1もしくはMOI=1になるように希釈する。
4. ウイルス希釈液を20 μ lずつ各wellに入れる。
5. 24、48、72時間後CellTiter 96 Reagentを20 μ lずつ入れ、1時間インキュベート、En spireで490nmの吸光度を測定する。

【0118】

<腫瘍形成実験 (in vivo) >

20

(Materials & reagents)

- ・マウス：BALB/c nu-nu, 5週齢、メス、N=4/グループ
- ・ウイルス：CVB3-WT、CVB3-34aT-3、CVB3-34cT-3
- ・腫瘍：NCI-H1299 (5×10^6 個/100 μ ? PBS)
- ・コントロール：Opti-MEM (登録商標)

【0119】

(Methods)

1. Day0：三種混合麻酔（塩酸メデトミジン0.3g+ミダゾラム4mg+酒石酸ブトルファノール5mg/kg 混合麻酔）0.1 ml/10g（体重）をマウス腹腔内に26G針で投与する。マウスの右側腹部あるいは左側腹部に癌細胞株（H1299） 5×10^6 個/100 μ ? PBS /匹の癌細胞を27G針で皮下投与する。
2. Day2：1日間置きに観察し、腫瘍の長径が0.4cmに達した際に、未治療群のマウスには50 μ ? Opti-MEM /匹を29G針で、投与部位をエタノール消毒した上で腫瘍内に投与する（隔日投与、最大5回：Day 2, 4, 6, 8, 10）。
3. Day2：腫瘍の長径が0.4 cmに達した際に、治療群のマウスには安全キャビネット内で、CVB3-WTまたは遺伝子改変CVB3（CVB3-34aT-3またはCVB3-34cT-3）を 5×10^6 TCID₅₀/50 μ ? Opti-MEM /匹を29G針で、投与部位をエタノール消毒した上で腫瘍内に投与する（隔日投与、最大5回：Day 2, 4, 6, 8, 10）。
4. 隔日に体重及び腫瘍径を測定し、腫瘍長径が10mmを超えた時、もしくは腫瘍が潰瘍になった時、速やかに安楽死させる（腫瘍体積＝長径×短径×短径/2）。
5. 腫瘍が3週間経過しても形成されなかった場合、もしくは腫瘍を完全に拒絶したマウスでも最大150日までの観察期間とし、速やかに安楽死させる。

30

40

【0120】

<血液生化学検査 (in vivo) >

(Materials & reagents)

- ・マウス：BALB/c nu-nu, 5週齢、メス、N=4/グループ
- ・ウイルス：CVB3-WT、CVB3-34a&217T-53、miR-1&217T
- ・腫瘍：NCI-H1299 (5×10^6 個/100 μ ? PBS)
- ・コントロール：Opti-MEM (登録商標)

【0121】

50

(Methods)

1. Day0：三種混合麻酔（塩酸メデトミジン0.3g+ミダゾラム4mg+酒石酸ブトルファノール5mg/kg 混合麻酔）0.1 ml/10g（体重）をマウス腹腔内に26G針で投与する。マウスの右側腹部あるいは左側腹部に癌細胞株（H1299） 5×10^6 個/100 μ l PBS /匹の癌細胞を27G針で皮下投与する。

2. Day2：1日間置きに観察し、腫瘍の長径が0.4cmに達した際に、未治療群のマウスには50 μ l Opti-MEM /匹を29G針で、投与部位をエタノール消毒した上で腫瘍内に投与する。

3. Day 2：腫瘍の長径が0.4cmに達した際に、治療群のマウスには安全キャビネット内で、CVB3-WTまたは遺伝子改変CVB3（CVB3-34a&217T-53またはmiR-1&217T）を 5×10^6 TCID₅₀/50 μ l Opti-MEM /匹を29G針で、投与部位をエタノール消毒した上で腫瘍内に投与する。

4. （一回投与群においては）Day4：三種混合麻酔0.1ml/10g（体重）をマウス腹腔内に26G針で投与する。マウスを解剖して、下大静脈から24G針で採血する（約600mL）。

5. （二回投与群においては）、Day4にもう一回マウスにOpti-MEMもしくはウイルスを29G針で腫瘍内に投与する。Day6に採血する。

6. 血液は室温で一時間放置して（凝固させるため）、1,500 xgで、室温で15分遠心する。

7. 上清（血清）を新しい1.5mLチューブに移す。

8. スポットケム（登録商標）で血液生化学検査を行う。

【配列表フリーテキスト】

【0 1 2 2】

配列番号1: miR-34a

配列番号2: miR-34c

配列番号3: miR-34aT×4+

配列番号4: miR-34cT×4+

配列番号5: miR-34aT×2 & miR-217T×2+

配列番号6: miR-34cT×2 & miR-217T×2+

配列番号7: miR-34aT×2 & miR-1T×2+

配列番号8: miR-34cT×2 & miR-1T×2+

配列番号9: miR-34a-Inverse Forward

配列番号10: miR-34a-Inverse Reverse

配列番号11: miR-34aT×4-

配列番号12: miR-34c-Inverse Forward

配列番号13: miR-34c-Inverse Reverse

配列番号14: miR-34cT×4-

配列番号15: CVB3-34a-5-Reverse

配列番号16: CVB3-34a-5-Forward

配列番号17: CVB3-34c-5-Reverse

配列番号18: CVB3-34c-5-Forward

配列番号19: CVB3-in-34c-5+

配列番号20: CVB3-in-34c-5-

配列番号21: CVB3-34a&217-5-Reverse

配列番号22: CVB3-34a&217-5-Forward

配列番号23: CVB3-34a&217-3-Reverse

配列番号24: CVB3-34a&217-3-Forward

配列番号25: miR-34a×2 & miR-217×2+

配列番号26: miR-34a×2 & miR-217×2-

配列番号27: CVB3-miR-Forward

配列番号28: CVB3-miR-Reverse

配列番号29: miR-1&217T Forward

配列番号30: miR-1&217T Reverse

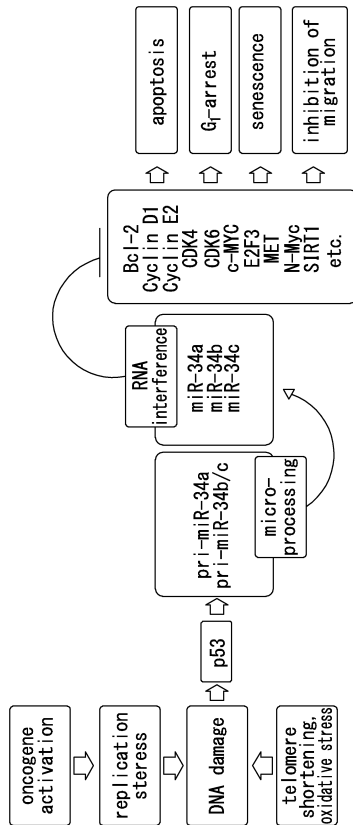
10

20

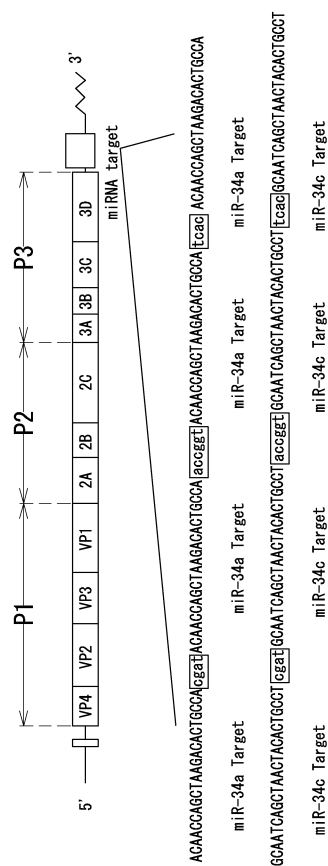
30

40

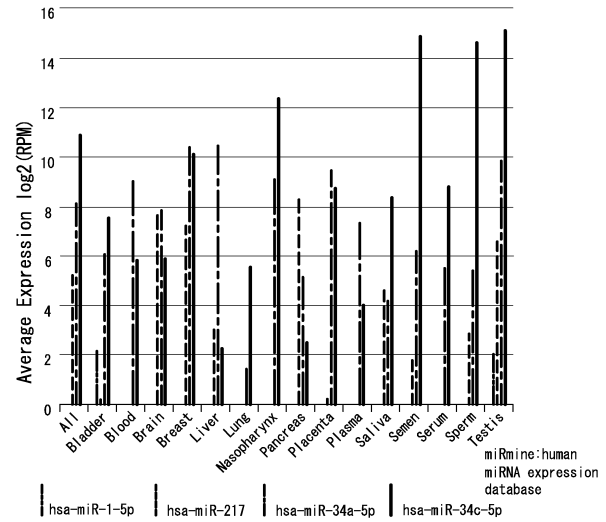
【図 1】



【図 4】



【図 2】



【図 3】

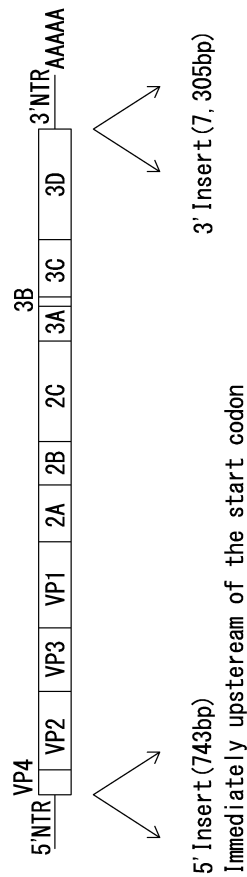
miR-34a:UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U

(miRBass ID:MIMAT0000255)

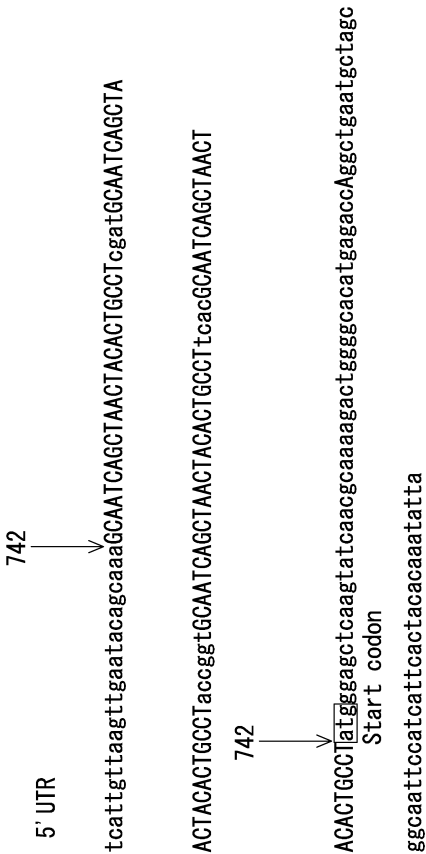
miR-34c:AGG CAG UGU AGU UAG CUG AUU GC

(miRBass ID:MIMAT0000686)

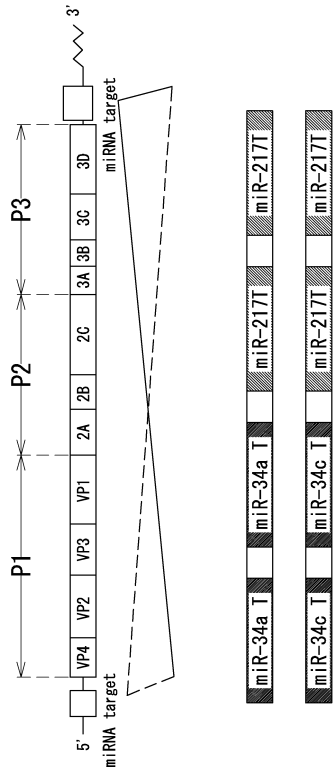
【図 5】



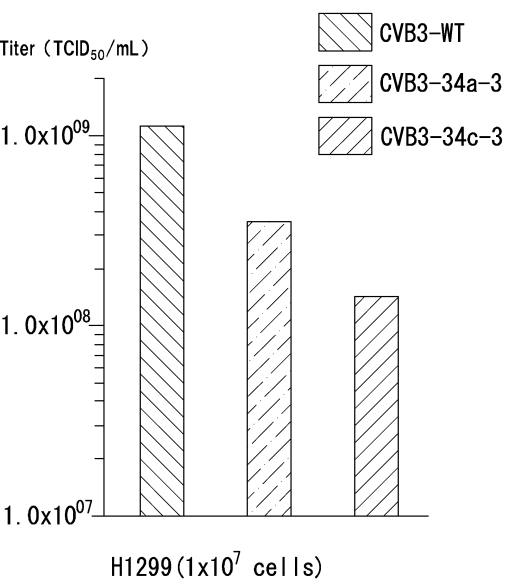
【図 6】



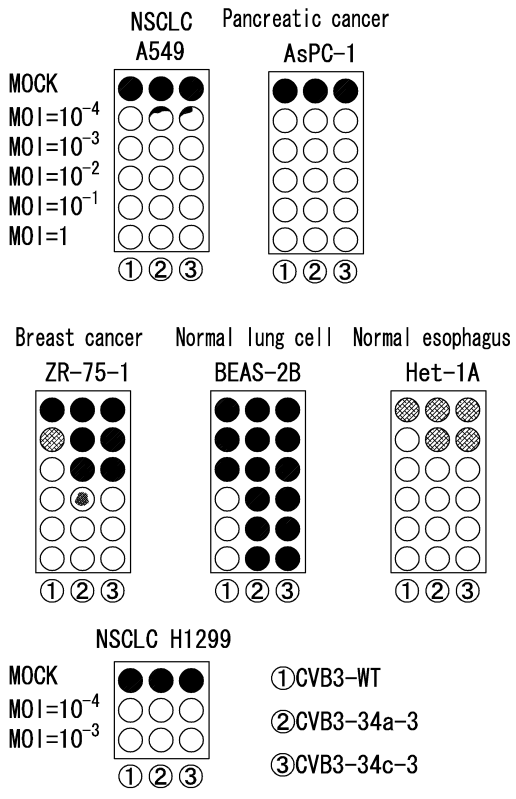
【図 7】



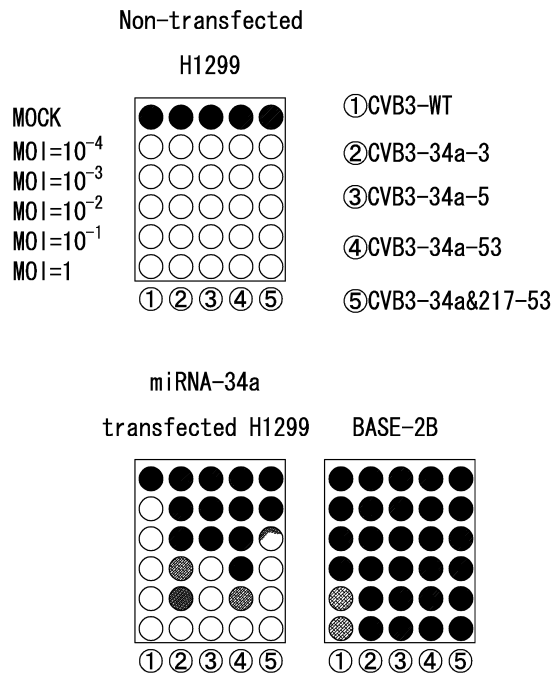
【図 8】



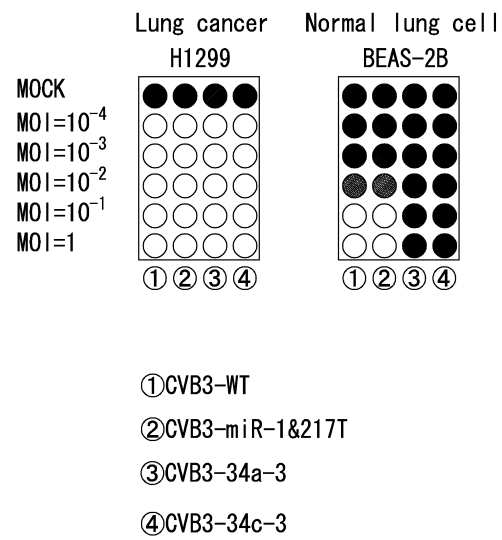
【図 9】



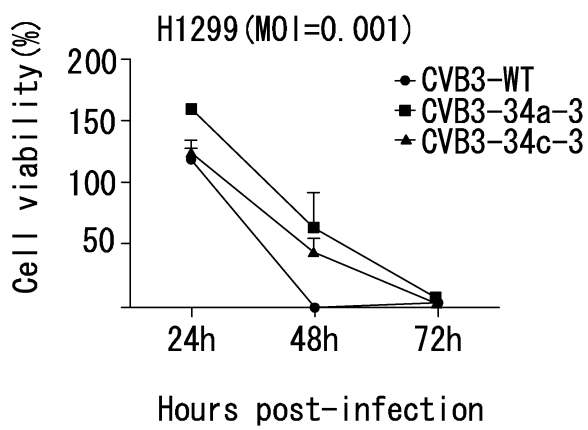
【図 1 0】



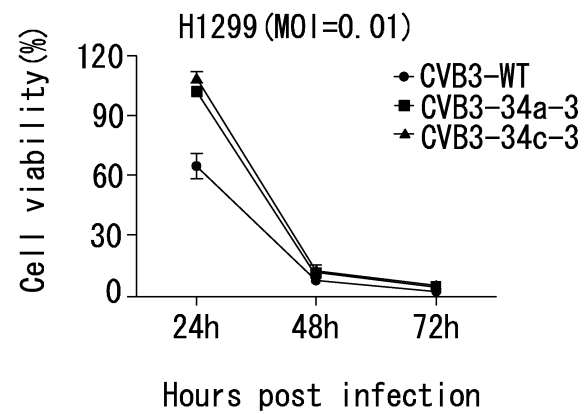
【図 1 1】



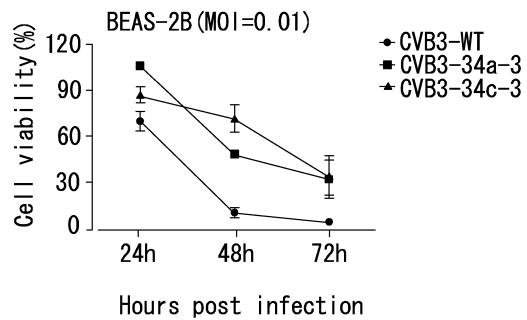
【図 1 2】



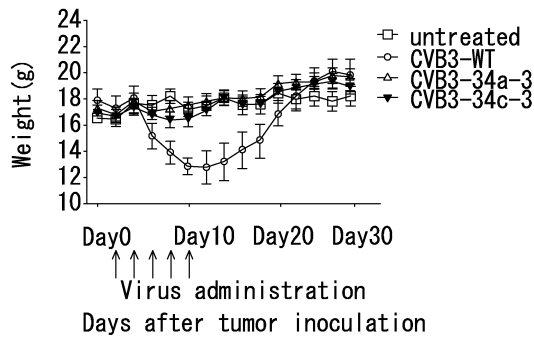
【図 1 3】



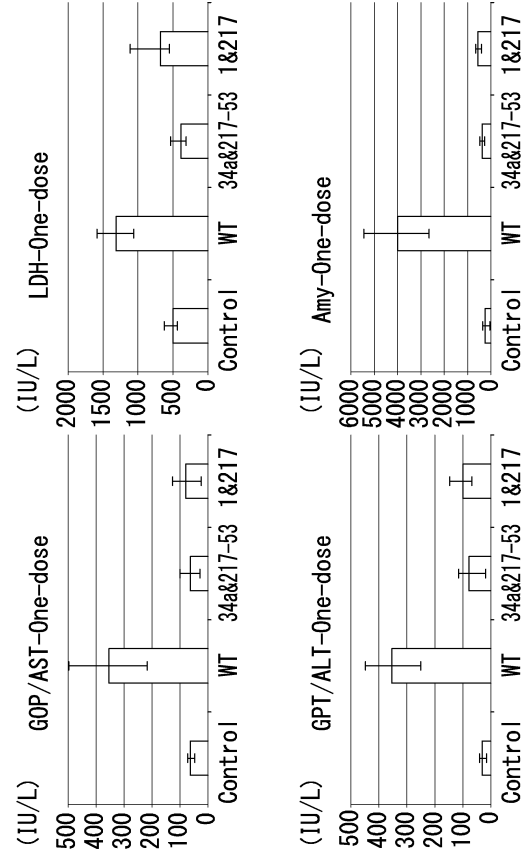
【図 1 4】



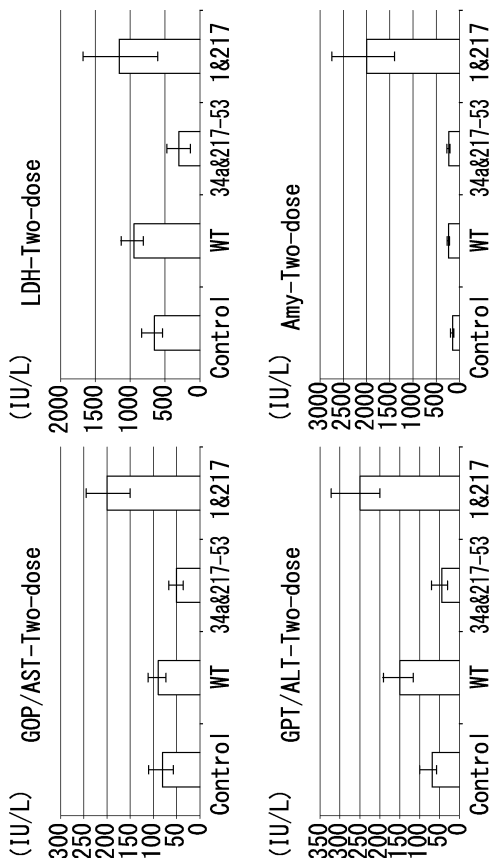
【図 19】



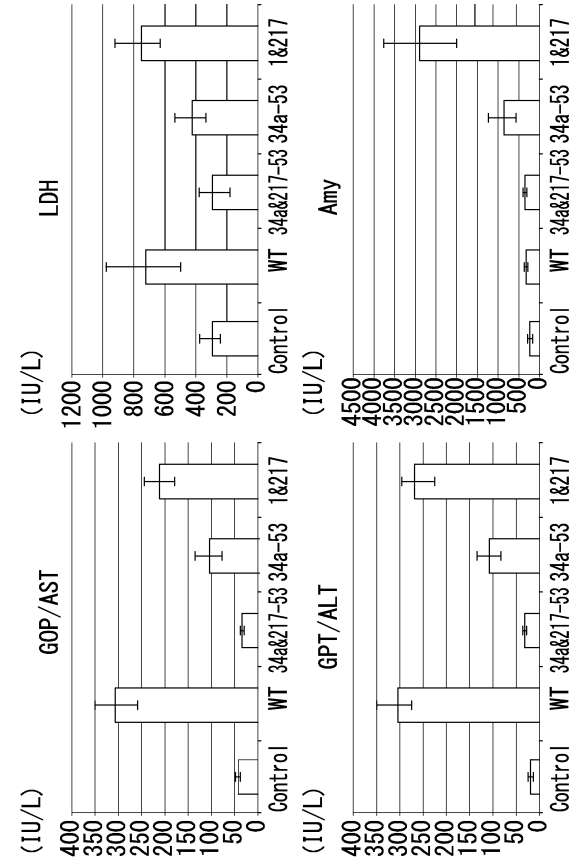
【図 20】



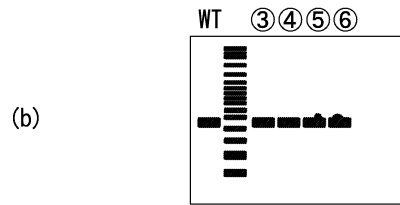
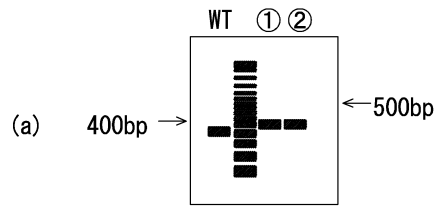
【図 21】



【図 22】

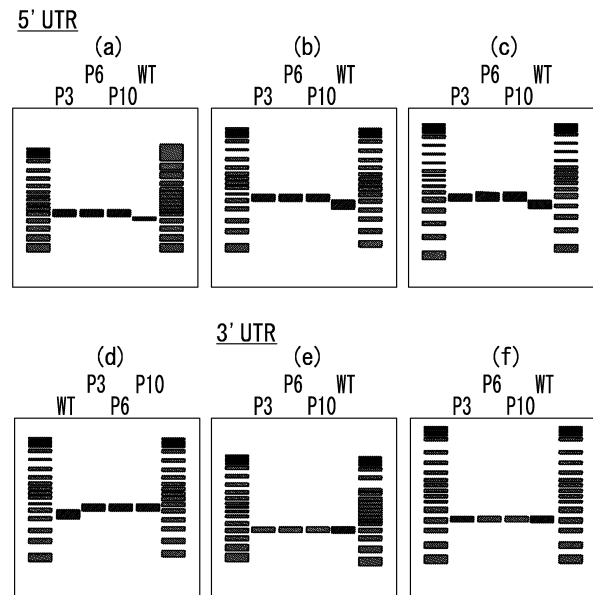


【図 2 3】



- ① CVB3-34a-3 (P3)
- ② CVB3-34c-3 (P3)
- ③ CVB3-34a-3 (P6)
- ④ CVB3-34c-3 (P6)
- ⑤ CVB3-34a-3 (P10)
- ⑥ CVB3-34c-3 (P10)

【図 2 4】



【配列表】

0006832422000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 賈 楊
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 宮本 将平
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 原 健一郎
福岡県福岡市中央区大手門1丁目4-7 新日本製薬株式会社内
- (72)発明者 岩永 篤文
福岡県福岡市中央区大手門1丁目4-7 新日本製薬株式会社内
- (72)発明者 谷 憲三朗
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 国際公開第2014/171526 (WO, A1)
特表2001-514509 (JP, A)
国際公開第2011/125469 (WO, A1)
米国特許出願公開第2016/0136181 (US, A1)
Cell Death and Differentiation, 2010, Vol.17, pp.193-199

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/01
A61K 35/76
A61P 35/00
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)