

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 3 月 25 日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/032764 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/76 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/066195
- (22) 国際出願日: 2009 年 9 月 16 日(16.09.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-237102 2008 年 9 月 16 日(16.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):
ジェノミディア株式会社(Genomidea Inc.) [JP/JP];
〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番
1 5 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金田 安史
(KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹
田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学
内 Osaka (JP). 川口 善史(KAWAGUCHI, Yoshifu-
mi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番
1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 板井
利満(ITALI, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨
木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号 ジェノミ
ディア株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒
5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番
1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: THERAPEUTIC/PROPHYLACTIC AGENT FOR PROSTATE CANCER

(54) 発明の名称: 前立腺癌の治療・予防剤

(57) Abstract: Disclosed are a novel therapeutic for prostate cancer. Also disclosed is a method for treating prostate cancer. Specifically disclosed is a therapeutic/prophylactic agent for prostate cancer, which comprises a virus envelope vector, particularly a Sendai virus envelope vector, as an active ingredient. The therapeutic/prophylactic agent may be an apoptosis induction promoter. The therapeutic/prophylactic agent may be used for prostate cancer of which the androgen sensitivity is partially or completely eliminated. Also specifically disclosed are: a therapeutic/prophylactic agent for melanoma, which comprises a Sendai virus envelope vector as a sole active ingredient; and others.

(57) 要約: 本発明は、前立腺癌の新規な治療剤、および治療法を提供する。より具体的には、ウイルスエンベロープベクター、特にセンダイウイルスエンベロープベクターを有効成分とする、前立腺癌治療・予防剤、該治療・予防剤がアポトーシス誘導促進剤である治療・予防剤、アンドロゲン感受性が一部または完全に低減されている前立腺癌に用いられる、該治療・予防剤、ならびに有効成分としてセンダイウイルスエンベロープベクターのみを含有するメラノーマ治療・予防剤などを提供する。



WO 2010/032764 A1

明 細 書

発明の名称： 前立腺癌の治療・予防剤

技術分野

[0001] 本発明は、生体内で抗腫瘍作用を示す（癌治療用）医薬品に関する。より詳しくは、ウイルスエンベロープ、特に不活性化センダイウイルス（Hemagglutinating Virus of Japan, 以下HVJと表記することもある）エンベロープ（以下HVJ-Eと表記することもある）を有効成分とする、前立腺癌治療の治療・予防剤に関する。また、本発明は不活性化センダイウイルスエンベロープのみを有効成分とする、メラノーマの治療・予防剤に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子機能解析や遺伝子治療のために、培養細胞や生体組織に遺伝子を導入する目的で、多くのウイルス法、非ウイルス法が開発されてきた（非特許文献1および非特許文献2）。一般に、細胞へ遺伝子を導入するためには、ウイルス法が効果的である。しかし、ウイルスベクターを用いる方法は、親ウイルス由来の遺伝子の導入とその発現の可能性、免疫原性、および宿主ゲノム構造の改変の可能性があり、安全性の面で問題がある。一方、リポソーム等を用いる非ウイルス法の多くは、細胞傷害性および免疫原性はウイルス法より低い、培養細胞や生体組織内への遺伝子導入効率においてはウイルスベクターに比べて劣る傾向にある。

[0003] 「センダイウイルス」は、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス属に属し、細胞融合作用をもつウイルスである。このウイルス粒子は、その表面にヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼを有するエンベロープをもち、直径150～300nmの多形性を示す。またセンダイウイルスは、約15,500塩基長のマイナス鎖RNAをゲノムとして有し、RNAポリメラーゼを持ち、熱に不安定で、ほとんどあらゆる種類の赤血球を凝集し、また溶血性を示す。このウイルスを不活性化することで、複製欠損となる、センダイ

ウイルスエンベロープベクターが得られる。

センダイウイルスはエーリッヒ腫瘍細胞を融合させるとして注目され、細胞膜融合活性（以下、融合活性とする）の解析が進められるとともに遺伝子導入ベクターとしての利用が検討されてきた。しかし、センダイウイルスは免疫原性が高く、特にNPタンパク質が大量に生産されるとCTLを誘導することが知られており（非特許文献3）、さらに宿主のタンパク質合成が阻害される懸念もある。そこで遺伝子やタンパク質を封入したリポソームと予め紫外線照射により不活性化しておいたセンダイウイルスとを融合することで、融合粒子（センダイウイルスーリポソーム）を作製する方法が考案され、これにより細胞や生体への非侵襲の遺伝子導入が可能となった（特許文献1、非特許文献4および非特許文献5）。

[0004] 本発明者らは、これまでに効果的な遺伝子送達能力を持つ（高効率）ウイルスおよび、細胞傷害性および免疫原性がより少ない（低毒性）非ウイルスベクターを組み合わせることにより、新規ハイブリッド遺伝子導入ベクターを開発し、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；センダイウイルス）由来の融合形成性エンベロープを持つ融合形成性ウイルスリポソームを構築した（金田、1998；金田ら、1999）。この送達システムでは、DNA充填リポソームを、UV不活性化センダイウイルスと融合させ、融合形成性ウイルスーリポソームであるセンダイウイルスーリポソーム（直径400～500nm）を形成させる。融合媒介送達の利点は、トランスフェクトされたDNAが、受容体細胞におけるエンドソーム分解およびリソソーム分解から保護されることにある。例えば、センダイウイルスーリポソーム中に取り込まれたDNAは、哺乳動物細胞に安全に送達することができる（特許文献2）。また、RNA、オリゴヌクレオチドおよび薬物も、インビトロおよび生体内で細胞中に効率的に導入されうる。さらに、本発明者らは、ウイルスエンベロープを使用する、安全、安定かつ広範囲の生体内組織に遺伝子導入可能な、高遺伝子導入活性を有する遺伝子導入ベクターとして、センダイウイルスエンベロープを凍結融解処理または界面活性剤と混合することによって、外

来遺伝子を封入した遺伝子導入ベクターを発明した（特許文献３）。また、センダイウイルスエンベロープを用いて脳または中枢神経にも物質を効率よく導入することが可能である（特許文献４）。さらにまた、センダイウイルスエンベロープに抗癌剤などの化学療法剤を封入して、それを細胞内または生体内に移入する方法も見出し、免疫アジュバント効果を発揮することも見出した（特許文献４、特許文献５、特許文献６）。

[0005] ところで、癌の治療方法については、すでに種々のものが開発されている。一般的な癌、特に固形癌の治療としては、有効な薬剤を癌組織に移入して癌細胞を殺傷する方法が挙げられる。また、低分子化合物からなる化学療法剤を投与する化学療法または投薬療法だけでなく、放射線療法、免疫療法、内分泌療法など、種々の療法が開発されている。しかしながら、未だに、完全寛解可能な疾患であるとは断言できない状況にある。固形癌の中でも、特に前立腺癌は、前立腺の細胞が正常の細胞増殖機能を失い、無秩序に自己増殖することにより発生する。近年、本邦における前立腺癌患者の発生、死亡率は増加の一途を辿っている。

前立腺に限局した癌の場合は根治的前立腺摘除術が適応となるが、近年は前立腺特異抗原（PSA）マーカーによるスクリーニングにより、外科的切除可能と判断される早期癌の患者が増加してきている。しかしながら外科的切除後の再発頻度は、一般に２０～５７％とされ、依然高い再発率が問題となっている。

一般に再発症例および前立腺外に進展が認められる前立腺癌に対しては、局所放射線照射や内分泌療法等が救済療法として選択されるが、根治を得る可能性は概して低い。そこで術前に内分泌療法を施行するネオアジュバント療法も完全切除の可能性を高くする目的で行われているが、不満足な結果となっている。特に、内分泌療法ではしばしばホルモン抵抗性を獲得した前立腺癌細胞が出現し、治療成績を低くしてしまう。そのため、術前内分泌療法に代わる、より有効な前立腺癌の治療法や、ホルモン抵抗性の前立腺癌を効率的に治療する方法の開発が期待されている状況である。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：米国特許第5, 631, 237号
特許文献2：国際公開第2001/057204号パンフレット
特許文献3：特開2002-065278号公報
特許文献4：国際公開第2005/095613号パンフレット
特許文献5：国際公開第2004/039406号パンフレット
特許文献6：国際公開第2005/094878号パンフレット

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Mulligan, Science, 260, 926-932, 1993年
非特許文献2：Ledley, Human Gene Therapy, 第6巻、1129-1144、1995年
非特許文献3：Cole G. A. ら Journal of Immunology 158, 4301-4309, 1997年
非特許文献4：Dzau ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11421-11425, 1996年
非特許文献5：金田ら、Molecular Medicine Today, 5, 298-303, 1999年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明の課題は、前立腺癌の新規な治療・予防剤、および治療・予防法を提供することである。より具体的には、前立腺癌、特に内分泌療法によりホルモン抵抗性となった前立腺癌の治療・予防剤および治療・予防法を提供することである。また、本発明の別の課題は、メラノーマの新規な治療・予防剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った結果、ウイルスエンベロープ、特にセンダイウイルスエンベロープそのものが、腫瘍細胞（前立腺癌細胞）のアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を有することを見出し、ウイルスエンベロープ、特にセンダイウイルスエンベロープそのものが前立腺癌治療・予防剤として利用可能であることを明らかにした。また、本発明者らは、センダイウイルスエンベロープ自体が、メラノーマの治療・予防剤として利用可能であることを見出した。すなわち、本発明は、

[1] ウイルスエンベロープを有効成分として含有する、前立腺癌治療・予防剤；

[2] ウイルスが、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、バキュロウイルス科、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、アレナウイルス科、およびフィロウイルス科からなる群から選択されるいずれか1つの科に属するウイルスである、上記[1]記載の治療・予防剤；

[3] ウイルスが、パラミクソウイルス科に属するウイルスである、上記[2]記載の治療・予防剤；

[4] ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスおよびインフルエンザウイルスからなる群より選択される、上記[1]記載の治療・予防剤；

[5] ウイルスが、センダイウイルスである、上記[4]記載の治療・予防剤；

[6] NK細胞もしくはアシアロGM1陽性細胞の活性化または腫瘍細胞からのインターフェロン α もしくは β の産生誘導をもたらすことを特徴とする、上記[1]～[5]のいずれか1つに記載の治療・予防剤；

[7] 前立腺癌のアンドロゲン感受性が一部または完全に低減されている、上記[1]～[6]のいずれか1つに記載の治療・予防剤。

〔 8 〕 前立腺癌がホルモン抵抗性である、上記〔 1 〕 ～〔 6 〕 のいずれか 1 つに記載の治療・予防剤；

〔 9 〕 前立腺癌に直接投与されることを特徴とする、上記〔 1 〕 ～〔 8 〕 のいずれか 1 つに記載の治療・予防剤；

〔 1 0 〕 前立腺癌に直接注射されることを特徴とする、上記〔 9 〕 記載の治療・予防剤；

〔 1 1 〕 他の癌治療方法と併用されることを特徴とする、上記〔 1 〕 ～〔 1 0 〕 のいずれか 1 つに記載の治療・予防剤；

〔 1 2 〕 他の癌治療方法が、投薬、内分泌療法、放射線療法、化学療法および免疫療法からなる群より選択される、上記〔 1 1 〕 記載の治療・予防剤；

〔 1 3 〕 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者に投与されることを特徴とする、上記〔 1 2 〕 記載の治療・予防剤；

〔 1 4 〕 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者が、アンドロゲン感受性が一部または完全に低減された前立腺癌を有する、上記〔 1 3 〕 記載の治療・予防剤；

〔 1 5 〕 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者が、ホルモン抵抗性前立腺癌を有する、上記〔 1 3 〕 記載の治療・予防剤；

〔 1 6 〕 前立腺癌患者または前立腺癌に罹患するリスクを有する者にウイルスエンベロープを有効量投与することを特徴とする、前立腺癌の治療・予防方法；

〔 1 7 〕 前立腺癌の治療・予防において使用するためのウイルスエンベロープ；

〔 1 8 〕 前立腺癌の治療・予防剤を製造するためのウイルスエンベロープの使用；

〔 1 9 〕 ウイルスエンベロープを有効成分として含有する、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導剤；

〔 2 0 〕 ウイルスがセンダイウイルスである、上記〔 1 9 〕 記載のアポトーシス誘導剤；

〔２１〕 前立腺癌患者または前立腺癌に罹患するリスクを有する者にウイルスエンベロープを有効量投与することを特徴とする、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導方法；

〔２２〕 前立腺癌細胞のアポトーシス誘導において使用するためのウイルスエンベロープ；

〔２３〕 前立腺癌細胞のアポトーシス誘導剤を製造するためのウイルスエンベロープの使用；

〔２４〕 有効成分としてセンダイウイルスエンベロープ（ＨＶＪ－Ｅ）のみを含有する、メラノーマ治療・予防剤；

〔２５〕 １回あたりの投与量が１０～１００００ＨＡＵであることを特徴とする、上記〔２４〕のメラノーマ治療・予防剤；

〔２６〕 １回あたりの投与量が４０～４００ＨＡＵであることを特徴とする、上記〔２４〕のメラノーマ治療・予防剤；

〔２７〕 投与回数が１～１０回であることを特徴とする、上記〔２４〕のメラノーマ治療・予防剤；

〔２８〕 投与回数が３～６回であることを特徴とする、上記〔２４〕のメラノーマ治療・予防剤；

〔２９〕 メラノーマ患者またはメラノーマに罹患するリスクを有する者に、メラノーマの治療・予防のための唯一の有効成分としてセンダイウイルスエンベロープ（ＨＶＪ－Ｅ）を有効量投与することを特徴とする、メラノーマの治療・予防方法；

〔３０〕 メラノーマの治療・予防において使用するためのセンダイウイルスエンベロープ（ＨＶＪ－Ｅ）を唯一の有効成分として含む医薬組成物；

〔３１〕 メラノーマの治療・予防剤を製造するためのセンダイウイルスエンベロープ（ＨＶＪ－Ｅ）を唯一の有効成分として含む医薬組成物の使用などを提供する。

発明の効果

[0010] 本発明によって、前立腺癌の新たな治療・予防剤が提供される。本発明に

よって提供される前立腺癌治療・予防剤は、その活性成分としてウイルスエンベロープ、特にセンダイウイルスエンベロープを含有する。本発明の治療・予防剤は、特にホルモン抵抗性の前立腺癌に対して優れた治療効果を発揮する。

前立腺癌の治療においては、現在PSAスクリーニング法、外科的切除法、内分泌療法、放射線治療法などが存在するが、その根治は依然大きな課題である。本発明は、生体内実験を用いてセンダイウイルスエンベロープが前立腺癌への直接投与で癌を著しく退縮させることを示した。

また、本発明によって、メラノーマの新たな治療・予防剤が提供される。該治療・予防剤は、低用量でメラノーマ退縮効果を示す。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]センダイウイルスエンベロープの前立腺癌細胞（ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞LNCaP、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞PC3およびDU145）もしくはヒト正常前立腺上皮細胞（PNT2）に対する殺能力を示すデータである。（A）はセンダイウイルスエンベロープのウイルス数（x軸）に対する前立腺癌細胞もしくはヒト正常前立腺上皮細胞のコントロールに対する生存率（y軸）を示し、（B）はその代表的形態を示す（倍率×40）。矢印はセンダイウイルスエンベロープにより融合した細胞を示す。

[図2]センダイウイルスエンベロープの、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞（PC3、DU145）、ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞（LNCaP細胞）もしくはヒト正常前立腺上皮細胞（PNT2）への接着能力を示すデータである。ホルモン抵抗性前立腺癌細胞、ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞もしくはヒト正常前立腺上皮細胞にPKH26でラベルされたセンダイウイルスエンベロープを投与し、細胞融合が起こるか検討した（共焦点顕微鏡倍率×200）。DAPI染色は細胞核を示す。

[図3]センダイウイルスエンベロープの、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞（PC3）に対するアポトーシス誘導能を示すデータである。前立腺癌細胞のセンダイウイルスエンベロープ（MOI 10⁴）処置後、もしくは未処置（co

n t r o l) の T U N E L 染色を示す (共焦点倍率 $\times 200$)。D A P I 染色は細胞核を示す。

[図4] センダイウイルスエンベロープのホルモン抵抗性前立腺癌細胞 P C 3 に対するアポトーシス誘導能を示すデータである。(A) はアネキシン V 陽性のホルモン抵抗性前立腺癌細胞を、センダイウイルスエンベロープ処置群、非処置 (コントロール) 群の間で比較したものである。(B) はセンダイウイルスエンベロープ処置し、12、24 時間後の腫瘍細胞における C a s p a s e のタンパク質発現を示したものである。

[図5] センダイウイルスエンベロープのホルモン抵抗性前立腺癌細胞 P C 3 に対する I 型インターフェロン誘導能を示すデータである。図 5 (A) は、センダイウイルスエンベロープのウイルス数 (x 軸) に対する、P C 3 が培地中に産生する I 型インターフェロン (I F N - α 、 β) の発現量 (y 軸) の推移を示すグラフである。グラフは 3 回の試行の結果を統計処理したデータを表示している。図 5 (B) は、R I G - I の発現に対する、センダイウイルスエンベロープおよび抗 I N F 受容体抗体の作用を示すウェスタンブロット解析像である。内部コントロールとして β アクチンを用いた。

[図6] センダイウイルスエンベロープのホルモン抵抗性前立腺癌細胞 P C 3 に対するアポトーシス誘導のメカニズムを示すデータである。(A) はセンダイウイルスエンベロープ処置されたホルモン抵抗性前立腺癌細胞 P C 3 の p S T A T 1、カスパーゼタンパク質発現を、J A K 阻害剤前処置群、非処置群の間で比較したものである。内部コントロールとして β アクチンを用いた。(B) はセンダイウイルスエンベロープ処置されたホルモン抵抗性前立腺癌細胞 P C 3 の p S T A T 1、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 タンパク質発現を、J A K 阻害剤前処置および抗 I F N 受容体抗体前処置の有無で比較したウェスタンブロット解析像である。内部コントロールとして β アクチンを用いた。(C) はセンダイウイルスエンベロープ処置されたアネキシン V 陽性のホルモン抵抗性前立腺癌細胞を、J A K 阻害剤前処置群、非処置群の間で比較したものである。

[図7] センダイウイルスエンベロープの *in vivo* におけるホルモン抵抗性前立腺癌細胞退縮作用を示すデータである。(A) は SCID マウスに移植したホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対し、センダイウイルスエンベロープの直接投与がホルモン抵抗性前立腺癌細胞の退縮を促進することを示す。■：センダイウイルスエンベロープ (5, 000 HAU) 投与群 (n=3)；●：PBS 投与群 (n=3)。(B) はホルモン抵抗性前立腺癌細胞移植後 41 日目の PBS 投与群もしくはセンダイウイルスエンベロープ投与群 SCID マウスの代表的写真である。これらにより、SCID マウスに移植したホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対し、センダイウイルスエンベロープが腫瘍抑制効果を持つことを明らかになった。(C) は、抗アシアロ GM-1 抗体により NK 細胞を欠損させた SCID マウスに移植したホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対し、センダイウイルスエンベロープの直接投与がホルモン抵抗性前立腺癌細胞の退縮を促進することを示す。■：センダイウイルスエンベロープ (5, 000 HAU) 投与群 (n=3)；●：PBS 投与群 (n=3)；▲：センダイウイルスエンベロープ (5, 000 HAU) + 抗アシアロ GM-1 抗体投与群 (n=4)。統計データは $mean \pm s.e.m$ で表される。グループ間の比較は *student's t-test* によって行われた。危険率 $P < 0.01$ を有効とした。

[図8] ホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対する、センダイウイルスエンベロープのインターフェロンを介したアポトーシスのメカニズムを示した図である。

[図9] (A) は、ヒト PC3 細胞株マウス移植モデルにおける GEN0101 を 4 日に 1 回、計 3 回投与した場合における腫瘍増殖抑制効果を示したものである。(B) は、ヒト PC3 細胞株マウス移植モデルにおける GEN0101 投与開始後の体重変化率の推移を示したものである。

[図10] (A) は、ヒト PC3 細胞株マウス移植モデルにおける GEN0101 を 7 日に 1 回、計 2 回投与した場合における腫瘍増殖抑制効果を示したものである。(B) は、ヒト PC3 細胞株マウス移植モデルにおける GEN0101 投与開始後の体重変化率の推移を示したものである。

[図11] H V J - E 腫瘍内投与後の各群における腫瘍体積の変化を示したものである。◆^A : A 群 (3 回投与対照群)、◆^B : B 群 (3 回投与 4 0 H A U 群)、◆^C : C 群 (3 回投与 4 0 0 H A U 群)、■^D : D 群 (6 回投与対照群)、■^E : E 群 (6 回投与 4 0 H A U 群)、■^F : F 群 (6 回投与 4 0 0 H A U 群)、6 ~ 9 匹の平均値±標準偏差、* * : $p < 0.01$ 、腫瘍細胞移植後 20 日における D u n n e t t の多重比較検定。

[図12] H V J - E 腫瘍内投与後の各群における生存曲線を示したものである。A : 3 回投与した群間での生存曲線。B : 6 回投与した群間での生存曲線。◆^A : A 群 (3 回投与対照群)、◆^B : B 群 (3 回投与 4 0 H A U 群)、◆^C : C 群 (3 回投与 4 0 0 H A U 群)、■^D : D 群 (6 回投与対照群)、■^E : E 群 (6 回投与 4 0 H A U 群)、■^F : F 群 (6 回投与 4 0 0 H A U 群)

[図13] d a y 15 から d a y 36 までの各群の体重変化率を示したものである。◆^A : A 群 (3 回投与対照群)、◆^B : B 群 (3 回投与 4 0 H A U 群)、◆^C : C 群 (3 回投与 4 0 0 H A U 群)、■^D : D 群 (6 回投与対照群)、■^E : E 群 (6 回投与 4 0 H A U 群)、■^F : F 群 (6 回投与 4 0 0 H A U 群)、d a y 4 の体重を基準とした変化率 (%) の平均値±標準偏差で示した。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明は、ウイルスエンベロープを有効成分として含有する前立腺癌治療・予防剤を提供する。

[0013] 本明細書で使用される場合、「ウイルスエンベロープ」とは、ウイルスの最も外側に位置する膜状の構造物を意味する。ウイルスにおいては、エンベロープは、通常、ウイルスゲノム及びカプシドタンパク質を覆っている。ウイルスエンベロープは、通常、その内腔に種々の物質を担持することが可能であり、且つ細胞膜へ融合し、その内腔に含まれる物質を細胞内へ移入する活性を有する。そのため、ウイルスエンベロープの内腔に、所望の物質〔遺伝子（例えば、DNA、RNA など）、タンパク質（またはペプチド）、化合物（抗癌剤、抗菌剤、免疫促進剤など）〕を封入し、これを個体へ投与す

ることにより、種々の組織や細胞の内部へ、所望の物質を送達することが可能である。すなわち、ウイルスエンベロープは種々の物質のベクターとして使用可能である。本発明において使用されるウイルスエンベロープは、その内腔に、生体内や細胞内への導入が意図される物資を封入していても、封入していなくてもよい。後述の実施例に示すように、ウイルスエンベロープ自体に前立腺癌細胞を殺傷する効果があるので、好ましい実施態様において、ウイルスエンベロープ内には生体内や細胞内への導入が意図される物質が実質的に封入されていない。

[0014] 本発明のウイルスエンベロープの調製に用いられるウイルスとしては、エンベロープを有しているウイルスであれば、DNAウイルスであってもRNAウイルスであってもよい。また本発明のウイルスは野生型ウイルスであっても、組換え型ウイルスであってもよい。

[0015] そのようなウイルスとしては、DNAウイルスに属するポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、およびバキュロウイルス科、並びにRNAウイルスに属するレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、アレナウイルス科、およびフィロウイルス科等に属するウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。本発明においては上記のウイルスのなかでも、パラミクソウイルス科に属するウイルスが好ましく用いられる。

[0016] 好ましいウイルスの具体例としては、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルス等が挙げられ、最も好ましくは、センダイウイルスが用いられる。

[0017] 本発明で用いられるセンダイウイルスは、例えばVR-105、VR-907等をAmerican Type Culture Collection (ATCC, 住所: P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL [1] -703-365-2700) より

購入することができる。

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=VR-105&Template=animalVirology>

[0018] ウイルスエンベロープについてより詳しくは、例えば、特開2001-286282号公報（WO01/57204号公報）、特開2002-065278号公報、WO03/014338号公報等に記載されており、具体的には例えば特開2001-286282号公報の実施例8などに従って調製することができる。または、本明細書中の下記実施例に記載された方法に従って、センダイウイルスを増殖させ、回収したウイルスからエンベロープを単離及び精製することによってもセンダイウイルスエンベロープを調製することもできる。

[0019] 本発明に用いられるウイルスエンベロープとして、不活化ウイルスを用いてもよい。不活化ウイルスは、ウイルスゲノムを不活化処理することにより得ることができる。不活化処理としては、例えばUV処理やアルキル化処理を挙げることができる。このウイルスゲノムの不活化処理により、ゲノムDNAまたはRNAが、ウイルスエンベロープ内で変性または断片化する。具体的には、下記実施例中に記載された方法に従って、センダイウイルスエンベロープを不活化させることもできる。

[0020] また、本発明に用いられるウイルスエンベロープは、単離且つ精製されたものであってもよい。「単離且つ精製」とは、目的物以外の成分（ウイルスゲノム、カプシドタンパク質等）を除去する操作がなされていることを意味する。

[0021] 本明細書中において「前立腺癌」とは、前立腺に発生し前立腺に局限する癌、前立腺に発生し前立腺外にも浸潤した癌、及び前立腺に発生した癌に由来する転移・再発性の癌を包含する。

前立腺癌は、発生当初はアンドロゲン依存的に増殖するため、アンドロゲ

ン分泌組織（睪丸、副腎等）の摘出や、アンドロゲンの拮抗阻害薬の投与等により、体内におけるアンドロゲンの分泌量や、アンドロゲンの作用を抑制する内分泌療法（ホルモン療法）が有効である場合が多い。「アンドロゲン」の例としては、テストステロン、ジヒドロテストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステロン、アンドロステンジオンなどが挙げられる。また、本明細書中において、「内分泌療法（ホルモン療法）」とは、アンドロゲンの分泌や働きを抑えることによって、前立腺癌細胞の増殖を抑制する治療法をいう。内分泌療法（ホルモン療法）の具体的手段としては、精巣摘除術（去勢術）および薬物療法が挙げられ、薬物療法としては、LH-RHアゴニスト、抗男性ホルモン剤（抗アンドロゲン剤）、または女性ホルモン剤（エストロゲン剤）等の投与が挙げられる。しかし、この療法を継続すると前立腺癌細胞のアンドロゲンに対する感受性が低下し、やがてアンドロゲン非依存的に増殖し得るようになることが知られている。その結果、前立腺癌に対する内分泌療法（ホルモン療法）の有効性が減弱する。本発明の治療・予防剤は、このようなアンドロゲンへの感受性が一部または完全に低減された前立腺癌に特に有効である。「アンドロゲンへの感受性」とは、アンドロゲンの刺激により前立腺癌細胞の増殖が促進される程度を意味する。「アンドロゲンへの感受性の完全な低減」とは、アンドロゲンの刺激により前立腺癌の増殖が全く促進されないことを意味する。「アンドロゲンへの感受性の一部低減」とは、アンドロゲンの刺激により前立腺癌の増殖は促進されるものの、その程度が、前立腺癌の発生当初よりも小さいことを意味する。また、本発明の治療・予防剤は、特にホルモン抵抗性の前立腺癌に有効である。「ホルモン抵抗性」とは、アンドロゲンへの感受性が低減したため、内分泌療法（又はホルモン療法）が一部又は完全に無効となった前立腺癌の状態をいい、アンドロゲン抵抗性の前立腺癌をも包含する。「内分泌療法が一部無効」とは、内分泌療法により前立腺癌増殖が部分的に抑制されるが、完全にはその増殖が停止しないことをいう。「内分泌療法が完全に無効」とは、内分泌療法により前立腺癌増殖が全く抑制されないことをいう。

[0022] ウイルスエンベロープが、アンドロゲンへの感受性が一部または完全に低減された前立腺癌や、ホルモン抵抗性の前立腺癌に特に有効である理由は不明であるが、このような特性を有する前立腺癌細胞にウイルスエンベロープが特異的に融合し得ることが、一つの理由であると考えられる。

[0023] 本明細書中、「治療」とは、対象とする癌に対して、その癌の進行を遅らせるか、またはその癌組織を縮小もしくは消失させることをいう。すなわち、癌細胞を完全にまたは一部を殺傷することのほか、癌細胞の増殖を完全にまたは部分的に抑制または遅らせることも包含する。また、「予防」とは、前立腺癌に罹患するリスクを有する患者に投与することにより前立腺癌の発生を予め抑制すること、および前立腺癌治療後の患者に投与することにより癌の再発・転移を防止することをも包含しうる。

[0024] 本発明に用いられるウイルスエンベロープが前立腺癌を予防又は治療するメカニズムの全容は不明であるが、ウイルスエンベロープの以下のような作用が相まって、前立腺癌に対する優れた治療・予防効果を発揮すると考えられる。

[0025] (アポトーシス誘導)

ウイルスエンベロープは、前立腺癌細胞に直接作用し、アポトーシスを誘導することができる。従って本発明の治療・予防剤は、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導剤として有用である。アポトーシスとは、細胞の形態学的変化およびDNAのヌクレオソーム単位での断片化という生化学的変化の2つによって定義された、遺伝的に制御された細胞死を指す。

[0026] (インターフェロン α 又は β 産生の誘導)

ウイルスエンベロープは、前立腺癌細胞にサイトカインであるインターフェロン α 及び/又は β の産生を誘導する。インターフェロン α や β は、強力な抗腫瘍効果を有しており、NK細胞を活性化し、また腫瘍細胞に対して直接作用し、増殖を抑制することが知られている。

[0027] (NK細胞の活性化)

後述の実施例に示すように、抗アシアロGM1抗体処理によりNK細胞を

欠損したマウスにおいては、前立腺癌に対するウイルスエンベロープの治療効果が減少している。従って、ウイルスエンベロープの抗腫瘍効果の少なくとも一部は、ウイルスエンベロープがNK細胞（アシアロGM1陽性細胞）を直接的又は間接的に活性化することにより達成されたものと考えられる。

[0028] （細胞傷害性T細胞の活性化）

ウイルスエンベロープは、細胞傷害性T細胞（CTL）を活性化させる。従って、ウイルスエンベロープは直接的な細胞傷害効果のみならず、抗腫瘍免疫を介して抗腫瘍効果を発揮し得る。

[0029] 本発明の治療・予防剤は、任意の経路で投与することができる。しかし、上記のように、ウイルスエンベロープは前立腺癌細胞に対して直接作用し、そのアポトーシスを誘導し得るので、ウイルスエンベロープができるだけ効率的に前立腺癌細胞に接触し得るように投与することにより、より高い治療効果を引き出すことができる。このような観点から、本発明の治療・予防剤は、前立腺癌組織および／またはその周辺へ皮下投与または直接投与が望ましい。ここで、「直接投与」とは、投与した薬剤が癌組織に送達されればよく、注射、塗布、噴霧、または薬剤送達システムと併用してターゲットすることなどにより、可能である。すなわち、直接投与により、治療対象とする癌組織に局所的に薬剤が作用しうる。ウイルスエンベロープの治療・予防効果を最大限に引き出すため、本発明の治療・予防剤は、好ましくは前立腺癌組織内へ直接注射される。

[0030] 本発明の前立腺癌治療・予防剤の一態様は、実質的に何も人為的に封入されていないウイルスエンベロープを、有効成分として含有する。場合によっては、他の1種以上の癌治療・予防に有効な成分とともに、1つの製剤として製剤化することも可能であるが、かかる有効成分はエンベロープ中には人為的に封入されてはいない。

[0031] 本発明中の癌治療・予防剤は、その剤形は問わないが、注射剤、軟膏、スプレー剤などの医薬組成物が挙げられる。好ましくは注射剤である。さらにまた、現在、種々の癌組織に優先的または特異的に物質（薬剤など）を送達

するターゲティング手法が開発されており、また将来開発されると予想される。本発明の治療・予防剤はこれらのターゲティング手法とともに用いて、癌組織にターゲティングされるように処方することもできる。

当業者であれば、それぞれの投与方法に応じた医薬組成物に製剤化できる。

製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤などを配合して製剤化される。

賦形剤としては、乳糖、ブドウ糖、D-マンニトールなどの糖類、デンプン類、結晶セルロースなどのセルロース類などの有機系賦形剤、炭酸カルシウム、カオリンなどの無機系賦形剤などが、結合剤としては、 α 化デンプン、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、D-マンニトール、トレハロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどが、滑沢剤としては、ステアリン酸、ステアリン酸塩などの脂肪酸塩、タルク、珪酸塩類などが、溶剤としては、精製水、生理的食塩水などが、崩壊剤としては、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、化学修飾されたセルロースやデンプン類などが、溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが、懸濁化剤あるいは乳化剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、アラビアゴム、ゼラチン、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが、等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン、尿素などが、安定化剤としては、ポリエチレングリコール、デキス

トラン硫酸ナトリウム、その他のアミノ酸類などが、無痛化剤としては、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどが、防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが、抗酸化剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが、矯味矯臭剤としては、医薬分野において通常に使用される甘味料、香料などが、着色剤としては、医薬分野において通常に使用される着色料が挙げられる。

[0032] また、本発明の癌治療・予防剤の投与量は、治療・予防上有効な量で投与できる。具体的な投与量は、一般的な医者や治療現場の担当者が、その患者の状態に応じて決定することができる。対象患者の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、成人当たりセンダイウイルスエンベロープとして通常は、100～40,000HAU、好ましくは500～20,000HAU、さらに好ましくは1,000～10,000HAU、特に好ましくは5,000HAU以下の量を投与する。

[0033] 投与回数もまた、一般的な医者や治療現場の担当者が、その患者の状態に応じて決定することができる。一般的には、複数回投与が好ましいが、これに限定はされない。

たとえば、注射剤を癌組織に直接注射により3日おきに3回直接投与する、などの投与方法が考えられる。

[0034] 本発明の癌治療・予防剤は、治療・予防上有効な量で単独で使うことが可能である。あるいはまた、本発明の前立腺癌治療剤で治療を行った後、または連続的投与の間において、外科的治療により癌を一部または完全に切り除くことができる。さらにまた、本発明の前立腺癌治療剤は、他の薬剤、たとえば化学療法剤、と併用して投与することもできる。この場合、本発明の前立腺癌治療薬と他の薬剤とを、同時、または任意の順序で投与してもよい。

[0035] さらにまた、本発明の前立腺癌治療・予防剤は、他のあらゆる癌治療方法と併用することも可能である。他の癌治療方法としては、限定はされないが

、たとえば、外科的摘出手術、内分泌療法、放射線療法、化学療法、免疫療法などが挙げられる。これら他の治療方法の前後、または時期を同じくして、本発明の治療・予防剤を投与することができる。すなわち、本発明の治療・予防剤は、i) 他の治療方法を適用された前立腺癌患者、ii) 他の治療方法により治療継続中の前立腺癌患者、又はiii) 他の治療方法の適用が予定されている前立腺癌患者に投与することができる。ここで、「内分泌療法」とは、上記の記載の通りである。また、「放射線療法」とは、放射線が持つ電離作用を腫瘍を制御する目的で照射することをいう。本明細書で使用される場合、「化学療法」とは、抗癌剤を用いて癌治療を行うことをいう。本明細書で使用される場合、「免疫療法」とは、患者体内での免疫機能を向上させることで癌を治療するまたはその進行を遅らせる治療方法を指す。一般的にはワクチン療法や養子免疫療法、サイトカイン療法、BRM療法などが挙げられる。上述のように、本発明のウイルスエンベロープは、アンドロゲンへの感受性が一部または完全に低減された前立腺癌や、ホルモン抵抗性の前立腺癌に特に有効である。従って、本発明の治療・予防剤を内分泌療法と併用することで、ホルモン非抵抗性の前立腺癌細胞とホルモン抵抗性の前立腺癌細胞の双方を除去することができる。好ましい一態様において、内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者に、本発明の治療・予防剤が投与される。内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者は、内分泌療法の結果としてアンドロゲン感受性が一部又は完全に低減された前立腺癌や、ホルモン抵抗性の前立腺癌を有している場合があり、このような場合に本発明の治療・予防剤は特に有利である。

[0036] 本発明の前立腺癌治療剤は、癌組織の体積の増大を抑制する。すなわち、本発明の前立腺癌治療剤は、何の治療も施さない前立腺癌組織に比べて、その体積の増大を30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上低減させうる。後述の実施例に示すように、3日ごとに3回直接癌組織に注射により投与することで、最終投与から30日以上にわたって、投与後の癌組織の体積増加を90%以上、もしくは9

5%以上抑制することができる。センダイウイルスエンベロープによるこのような劇的な効果は本発明によりはじめて見出されたものである。本発明の前立腺癌治療剤は、実質的にセンダイウイルスエンベロープからなる有効成分を有することを特徴とするものである。したがって、従来の化学療法剤による副作用（吐き気、脱毛など）は有さない。

本発明の不活性化ウイルスエンベロープの抗腫瘍効果のメカニズムとしては、限定はしないが以下のとおり推測される。センダイウイルスエンベロープの細胞膜上のレセプターは *ganglioside* の一種であり、中でも *GD1a* が主要な受容体である。この *ganglioside* は正常の前立腺上皮にはほとんどなく、ホルモン抵抗性の前立腺癌で強発現している。したがってセンダイウイルスエンベロープをホルモン抵抗性の前立腺癌細胞と接触させると効率よく細胞融合を起こして細胞増殖を阻害する。一方、ウイルス由来2本鎖RNAが細胞内のウイルスゲノムレセプターである *RIG-I* に結合し、そのシグナル伝達によりインターフェロン α 、 β を分泌させ、癌細胞は自分の分泌したインターフェロンにより *caspase 3*、*8*を活性化してアポトーシスを起こす。しかし正常前立腺細胞はセンダイウイルスエンベロープによるインターフェロン分泌もなく影響を受けない。さらにセンダイウイルスエンベロープは *RIG-I* の発現の増強も促し、この癌細胞特異的なアポトーシス誘導効果を増強する。マウスでの腫瘍モデルでは、この効果に加えて、本発明者が腎癌のマウスモデルで見たように腫瘍を攻撃できるNK細胞も活性化されることが分かり、抗腫瘍効果がさらに高まる。またヒト前立腺癌のマウスモデルでは検証はできないが、すでに我々が大腸癌の治療実験で報告しているように腫瘍に対する細胞傷害性T細胞も活性化されることが予想され、直接的な腫瘍殺傷効果に加えて腫瘍に対する宿主免疫の活性化により、局所の癌病巣へのセンダイウイルスエンベロープの投与により治療抵抗性である癌でも原発巣ばかりでなく遠隔転移も抑制し、さらには再発をも防止できることが期待される。

[0037] さらに、本発明のセンダイウイルスエンベロープは単独でメラノーマに対

しても腫瘍退縮効果を示す。従って、本発明は有効成分としてセンダイウイルスエンベロープのみを含有する、メラノーマ治療・予防剤を提供する。なお、メラノーマにおける「治療」または「予防」とは、前記の前立腺癌における「治療」または「予防」と同義である。

[0038] 有効成分としてセンダイウイルスエンベロープのみを含有するとは、他の1種以上の抗腫瘍効果を持つ成分がエンベロープ中に封入されていない、あるいは治療・予防剤中に含有されないことをいう。また、本明細書中において「メラノーマ」とは、皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生し該発生箇所に限局する癌、皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生し該発生箇所以外にも浸潤した癌、及び皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生した癌に由来する転移・再発性の癌をも包含する。

[0039] 本発明のメラノーマ治療・予防剤は、その剤形は問わないが、注射剤、軟膏、スプレー剤などの医薬組成物が挙げられる。好ましくは注射剤である。さらにまた、現在、種々の癌組織に優先的または特異的に物質（薬剤など）を送達するターゲティング手法が開発されており、また将来開発されると予想される。本発明のメラノーマ治療剤はこれらのターゲティング手法とともに用いて、メラノーマ組織にターゲティングされるように処方することもできる。当業者であれば、それぞれの投与方法に応じた医薬組成物に製剤化でき、製剤上の必要に応じて、薬学的に許容される担体などは、前記の前立腺癌治療・予防剤に用いられるものを適宜使用することができる。

[0040] また、本発明のメラノーマ治療・予防剤の投与量は、治療・予防上有効な量で投与できる。具体的な投与量は、一般的な医者や治療現場の担当者が、その患者の状態に応じて決定することができる。対象患者の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、成人当たりセンダイウイルスエンベロープとして通常は、一回あたりの投与量が10～1,0000HAU、好ましくは40～400HAUの量を投与する。

[0041] 投与回数もまた、一般的な医者や治療現場の担当者が、その患者の状態に応じて決定することができる。一般的には、複数回投与が好ましいが、これ

に限定はされない。

たとえば、注射剤を癌組織に直接注射により通常1～10、好ましくは3～6回直接投与する、などの投与方法が考えられる。また、投与の間隔についても、患者の状態に応じて決定することができるが、例えば、2または3日おきに投与することができる。

以下の実施例において、本発明を詳細に述べるが、本発明はそれらになんら限定されるものではない。

実施例

[0042] 実施例 1 界面活性剤を用いる不活性化センダイウイルスエンベロープの調製

(1: センダイウイルスの増殖)

センダイウイルスは鶏の受精卵への種ウイルスの接種により増殖されたものが一般に使用され得るが、サル、ヒトなどの培養細胞、培養組織へのウイルスの持続感染系（トリプシンなどの加水分解酵素を培養液中に添加）を利用して増殖させたもの、クローニングされたウイルスゲノムを培養細胞に感染させ持続感染をおこさせて増殖させたもの、全てが利用可能である。

本実施例において、センダイウイルスの増殖を以下のようにおこなった。センダイウイルスの種ウイルスを、SPF (Specific pathogen free) の受精卵を使って増殖させ分離・精製したセンダイウイルス (Z種) を細胞保存用チューブに分注し、10% DMSOを加えて液体窒素中に保存し、調製した。

受精直後のニワトリ卵を入荷し、インキュベーター (SHOWA-FURANKI P-03型; 約300鶏卵収容) にいれ、36.5°C、湿度40%以上の条件で10～14日飼育した。暗室中で、検卵器 (電球の光が口径約1.5cmの窓を通して出るようになっているもの) を用いて、胚の生存及び気室と漿尿膜を確認し、漿尿膜の約5mm上方に鉛筆でウイルス注入箇所の記しをつけた (太い血管を除いた場所を選定する)。ポリペプトン溶液 (1%ポリペプトン、0.2% NaClを混合し、1M NaOHでpH

7. 2に調整してオートクレーブ滅菌し、4℃保存したもの）で種ウイルス（液体窒素からとりだしたもの）を500倍に希釈し、4℃においた。卵をイソジン及びアルコールで消毒し、ウイルス注入箇所近千枚通しで小孔をあけ、希釈した種ウイルス0.1mlを26ゲージの針付き1mlシリンジを用いて、漿尿腔内に入るように注入した。溶かしたパラフィン（融点50～52℃）をパスツールピペットを用いて孔の上に置き、これをふさいだ。卵をインキュベーターにいれ、36.5℃、湿度40%以上の条件で3日飼育した。次に、接種卵を一晩4℃においた。翌日、卵の気室部分をピンセットで割り、18ゲージの針を付けた10mlシリンジを漿尿膜の中に入れて、漿尿液を吸引し、滅菌ボトルに集め、4℃に保存した。

[0043] （2：センダイウイルスの精製）

センダイウイルスは、遠心分離による精製方法、カラムによる精製方法、または当該分野において公知のその他の精製方法によって、精製され得る。

[0044] （2.1：遠心分離による精製方法）

手短には、増殖させたウイルス液を回収し低速遠心で培養液や漿尿液中の組織・細胞片を除去した。その上清を高速遠心（27,500×g,30分間）とショ糖密度勾配（30～60%w/v）を利用した超遠心（62,800×g,90分間）により精製した。精製の際にウイルスをできるだけ穏和に扱い、4℃で保存することに注意すべきである。

本実施例において、具体的には、以下の方法によってセンダイウイルスを精製した。

センダイウイルス含有漿尿液（センダイウイルス含有のニワトリ卵の漿尿液を集め4℃にて保存）の約100mlを広口の駒込ピペットで50mlの遠心チューブ2本に入れ（Saeki, Y., およびKaneda, Y: Protein modified liposomes (HVJ-liposomes) for the delivery of genes, oligonucleotides and proteins. Cell Biology; A laboratory handbook (第2版) J

. E. Cells 編 (Academic Press Inc., San Diego) 第4巻、127~135, 1998を参照のこと)、低速遠心機で3,000 rpm, 10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、卵の組織片を除去した。

遠心後、上清を35 ml 遠心チューブ4本(高速遠心用)に分注し、アングルローターで27,000 × g, 30分遠心した(アクセル、ブレーキはオン)。上清を除き、沈殿にBSS (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、137 mM NaCl、5.4 mM KCl; オートクレーブし、4℃保存) (BSSのかわりにPBSでも可能) をチューブ当たり約5 ml 加え、そのまま4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし1本のチューブに集め、同様にアングルローターで27,000 × g、30分遠心した。上清をのぞき、沈殿にBSS 約10 ml を加え、同様に4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし、低速遠心機で3,000 rpm、10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、除ききれなかった組織片やウイルスの凝集塊をのぞいた。上清を新しい滅菌済みチューブに入れ精製ウイルスとして4℃で保存した。

このウイルス液0.1 ml にBSSを0.9 ml 加え、分光光度計で540 nmの吸収を測定し、ウイルス力価を赤血球凝集活性(HAU)に換算した。540 nmの吸収値1がほぼ15,000 HAUに相当した。本明細書においてHAU (Hemagglutinating unit) とは赤血球を凝集させる活性の単位であり、HVJ-Eの1 HAUとはニワトリの赤血球と混合した場合に凝集を起こす最小単位のことをいう。HAUは融合活性とほぼ比例すると考えられる。また実際にニワトリ赤血球液(0.5%)を用いて、赤血球凝集活性を測定してもよい(動物細胞利用実用化マニュアル、REALIZE INC. (内田、大石、古沢編集) P259~268、1984を参照のこと)。

さらにショ糖密度勾配を用いたセンダイウイルスの精製も必要に応じて行

い得る。具体的には、ウイルス懸濁液を60%、30%のショ糖溶液（オートクレーブ滅菌）を重層した遠心チューブにのせ、62,800×gで120分間密度勾配遠心を行う。遠心後、60%ショ糖溶液層上にみられるバンドを回収する。回収したウイルス懸濁液をBSSもしくはPBSを外液として4℃で透析を一晩行い、ショ糖を除去する。すぐに使用しない場合は、ウイルス懸濁液にグリセロール（オートクレーブ滅菌）と0.5M EDTA液（オートクレーブ滅菌）をそれぞれ最終濃度が10%と2～10mMになるように加えて－80℃で穏やかに凍結し、最終的に液体窒素中で保存する（凍結保存はグリセロールと0.5M EDTA液の代わりに10mM DMSOでも可能）。

[0045] （2. 2：カラムおよび限外濾過による精製方法）

遠心分離による精製方法に代えて、カラムによるセンダイウイルスの精製も本発明に適用可能である。

手短には、分子量カットオフが50,000のフィルターによる限外濾過による濃縮（約10倍）とイオン交換クロマトグラフィー（0.3M～1M NaCl）による溶出を用いて精製した。

具体的には、本実施例において、以下の方法を使用して、センダイウイルスをカラムによって精製した。

漿尿液を採集した後、80μm～10μmのメンブランフィルターにてろ過した。0.006～0.008% BPL（最終濃度）を漿尿液に加え（4℃、1時間）、センダイウイルスを不活性化した。漿尿液を37℃、2時間インキュベートすることによって、BPLを不活性化した。

500KMWCO（A/G Technology、Needham、Massachusetts）を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法により約10倍濃縮した。緩衝液として、50mM NaCl、1mM MgCl₂、2%マンニトール、20mM Tris（pH7.5）を用いた。HAUアッセイにより、ほぼ100%のセンダイウイルス回収率であり優れた結果がえられた。

Q Sepharose FF (アマシャムファルマシアバイオテクKK、Tokyo) によるカラムクロマトグラフィー法 (緩衝液: 20mM Tris HCl (pH 7.5)、0.2~1M NaCl) でセンダイウイルスを精製した。40~50%の回収率であり、純度は99%以上であった。

500KMWCO (A/G Technology) を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法によりセンダイウイルスの画分を濃縮した。

[0046] (3: センダイウイルスの不活性化)

センダイウイルスの不活性化を、以下に記載するように、紫外線照射によって行った。

[0047] (3.1: 紫外線照射法)

センダイウイルス懸濁液 1ml を 30mm 径のシャーレにとり、99 または 198 ミリジュール/cm² を照射した。不活性化されたウイルスは、複製能力は持たないが、ウイルスへの融合能力は保持されている。

[0048] 実施例 2 in vitro でのセンダイウイルスエンベロープの抗腫瘍効果

PC3 細胞、DU145 細胞および LNCap 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。DU145 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、100U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 存在下で RPMI 1640 メディウム (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) 中で培養した。PC3 細胞は 10% FBS、100U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 存在下で Dulbecco's modified Eagle F12 メディウム中で培養した。細胞培養は全て 37℃、5% CO₂ の加湿条件下で行った。

ホルモン抵抗性前立腺癌細胞である PC3 細胞および DU145 細胞、ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞株である LNCap 細胞、もしくはヒト正常前立腺上皮細胞 (PNT2) をそれぞれ 96 穴プレートに 1×10^4 cells

／wellの密度で播種し、24時間後にセンダイウイルスエンベロープと反応させた[multiplicity of infection (MOI) : 10~10⁴]。更に24時間培養し、細胞の生存率をCelltiter 96^(R) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)を用いて、MTSアッセイにより調べた。生存率は、各々のセンダイウイルスエンベロープ未処置群(control)に対する割合で表され、グラフを図1(A)に示す。ホルモン抵抗性前立腺癌細胞においてはいずれの細胞でも、センダイウイルスエンベロープの濃度依存的に生細胞が減少し、MOI 10⁴のセンダイウイルスエンベロープで処理した細胞では、コントロールに比べてPC3細胞では46%、DU145細胞では35%にまで減少した。一方、センダイウイルスエンベロープは同濃度の幅ではホルモン非抵抗性前立腺癌細胞および正常前立腺上皮細胞の生存率に影響を与えなかった。それぞれの細胞株のコントロールおよびMOI 10⁴のセンダイウイルスエンベロープ処理の顕微鏡画像を図1(B)に示す(倍率×40)。

ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞および正常前立腺上皮細胞ではセンダイウイルスエンベロープによる細胞死は認められず、センダイウイルスエンベロープはホルモン抵抗性(前立腺)癌細胞選択的に細胞死を誘導した。これにより、センダイウイルスエンベロープのホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対する選択的抗腫瘍効果が明らかにされた。

[0049] 実施例3 in vitroでのセンダイウイルスエンベロープの細胞接着、細胞膜融合効果

ホルモン抵抗性前立腺癌細胞PC3細胞およびDU145細胞、ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞LNCaPならびにヒト正常前立腺上皮細胞(PNT2)を、それぞれ6穴プレートに入れたポリエチレンイミン・コートされたカバーガラス上に2×10⁵ cells/wellの密度で播種した。翌日、PKH26でラベルされたセンダイウイルスエンベロープ(MOI 10⁴)と37℃で60分間反応させた後、細胞をPBSで2度洗浄し、4% pa

paraformaldehyde処置で固定した（15分、4℃）。DAPIで細胞核を対比染色した後、細胞を共焦点顕微鏡で観察した（倍率×200）。

これらにより、センダイウイルスエンベロープはホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対して接着能力、そして膜融合能力を持つことが明らかになった（図2）。

[0050] 実施例4 in vitroでのTUNELアッセイ

PC3細胞を、6穴プレートに入れたポリエチレンジオキサン・コートされたカバーガラス上に 1×10^5 cells/wellの密度で播種した。翌日、センダイウイルスエンベロープと反応させ（MOI 10^4 ）、更に24時間培養した後、細胞をPBSで2度洗浄し、4% paraformaldehyde処置で固定した（15分、4℃）。Apoptosis Detection Kit（TAKARA bio.）を用いて、説明書の手順に従い、アポトーシス細胞をthe terminal deoxynucleotide transferase（TdT）-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL）染色により検出した。共焦点顕微鏡観察（倍率×200）の結果を図3に示す。これらにより、センダイウイルスエンベロープ投与群におけるTUNEL陽性細胞の増加が明らかになった。

[0051] 実施例5 in vitroでのセンダイウイルスエンベロープの細胞死誘導効果

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit（BD Bioscience, CA, USA）を用いて、センダイウイルスエンベロープ処置後のアポトーシス細胞の割合の違いを調べた。PC3細胞を 1×10^5 cells/wellの密度で6穴プレートに播種し、24時間後、細胞をセンダイウイルスエンベロープと反応させた（MOI 10^4 ）。更に24時間培養し、PBSで2回洗浄してアネキシンV（5 μ l）とプロピディウムイオダイド（PI）（2 μ l）を含む染色溶液に再

懸濁し、暗所で15分間、室温で処置した。アネキシンVとプロピディウムイオダイドは、BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入した。細胞はFACSscanフローサイトメーター (Becton Dickinson) を使って、Cell Quest softwareを用いて解析した。その結果を図4 (A) に示す。MOI 10^4 のセンダイウイルスエンベロープで処置した細胞群では、センダイウイルスエンベロープ未処置のコントロール群に比べて2倍以上のアネキシンV陽性細胞の増加が認められた。次に、PC3細胞を 1×10^5 cells/well の密度で6穴プレートに播種し、24時間後、センダイウイルスエンベロープと反応させた (MOI 10^4)。更に12もしくは24時間培養し、PBSで2回洗浄した後、細胞を回収し、lysis bufferで融解した。これに等量のサンプルバッファを加えた後、細胞融解液を10分間煮沸した。各サンプルについて10 μ g分のタンパク質を4-20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel にかき、電気泳動により解析した。泳動後サンプルをフッ化ポリビニリデン膜に移し、膜を5%スキムミルクでブロッキングし、1次抗体0.1%、5%スキムミルクの反応液と共に4°C、オーバーナイトで処置した。その後膜を洗い、HRP-ラベルされた抗caspase 3抗体 (PC-020: TREVIGEN, MD, USA)、抗caspase 8抗体 (H-134: Santa Cruz, CA, USA)、抗caspase 9抗体 (H-83: Santa Cruz, CA, USA) と、室温で約1時間反応させた。化学発光による検出はECL user's guide (Amersham) に記載のプロトコールをもとに行った。その結果を図4 (B) に示す。MOI 10^4 のセンダイウイルスエンベロープで処置した細胞では、コントロールに比べてcaspase 3と8の発現上昇が認められた。なお陽性対照群として、放射線照射 (RT 50 Gy) のサンプルを用いた。これらにより、センダイウイルスエンベロープはホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対してアポトーシス誘導能を持つことが明らかになっ

た。

[0052] 実施例6 *in vitro*でのセンダイウイルスエンベロープのIFN α 、 β 発現誘導効果

PC3細胞を 5×10^4 cells/wellの密度で96穴プレートに播種し、24時間後に細胞をセンダイウイルスエンベロープと反応させ(MOI $10^2 \sim 10^4$)、更に24時間培養した。培養上清を回収し、type I インターフェロン(IFN- α とIFN- β)の発現を、市販で入手できる試薬を用い(PBL Biomedical Laboratories、Piscataway、NJ、USA)、ELISAによって測定した。その結果を図5(A)に示す。センダイウイルスエンベロープのdose dependentlyにIFN α 、 β の発現の上昇が認められた。次に、RNAヘリカーゼであるRetinoic Acid Inducible Gene-1(RIG-1)の発現に対する、センダイウイルスエンベロープおよび抗IFN受容体抗体の影響を調べた。PC3細胞を 5×10^5 cells/wellの密度で96穴プレートに播種し、24時間後に細胞を抗IFN受容体抗体($20 \mu\text{g/ml}$)による前処置の有無に分け、3時間の前処置を行った後、更にセンダイウイルスエンベロープと24時間反応させた(MOI 10^4)。その結果を図5(B)に示す。これより、センダイウイルスエンベロープ処置はRIG-1発現を増加させる一方、この作用は抗IFN受容体抗体処置により低減されることが明らかになった。

[0053] 実施例7 *in vitro*でのセンダイウイルスエンベロープによる細胞死誘導におけるJAKの重要性

PC3細胞を約 1×10^5 cells/wellの密度で6穴プレートに播種し、24時間後、細胞をJAK阻害剤($1 \mu\text{M}$) (Calbiochem、USA)による前処置1時間の有無に分け、センダイウイルスエンベロープと反応させた(MOI 10^4)。更に24時間培養し、PBSで2回洗浄した後、細胞を回収し、lysis bufferで融解した。これに等量のサンプルバッファーを加えた後、細胞融解液を10分間煮沸した。このサ

ンプルを実施例と同様のSDS-PAGEとウェスタンブロット法を用いてpSTAT1 (Ser727: Santa Cruz, CA, USA)、caspase 3、8、 β アクチン (IMG-5142A: IMAGENEX, CA, USA) についてタンパク質の発現を解析した。その結果を図6 (A) に示す。MOI 10^4 のセンダイウイルスエンベロープで処置した細胞群では、センダイウイルスエンベロープ未処置のコントロール群に比べてSTAT1のリン酸化とcaspase 3、8の活性化が認められた。

また、IFN受容体からのシグナルの影響を調べるため、以下の実験を行った。PC3細胞を約 1×10^5 cells/wellの密度で6穴プレートに播種し、24時間後、細胞をセンダイウイルスエンベロープ単独 (MOI 10^4)、センダイウイルスエンベロープとJAK阻害剤 ($1 \mu\text{M}$)、センダイウイルスエンベロープと抗IFN受容体抗体 ($20 \mu\text{g/ml}$) の3グループに分け、まずJAK阻害剤および抗IFN受容体抗体による前処置を3時間行った後、更にセンダイウイルスエンベロープと24時間反応させた (MOI 10^4)。この後PBSで2回洗浄し、細胞を回収し、lysis bufferで融解した。これに等量のサンプルバッファーを加えた後、細胞融解液を10分間煮沸した。このサンプルを実施例と同様のSDS-PAGEとウェスタンブロット法を用いてpSTAT1 (Ser727: Santa Cruz, CA, USA)、caspase 3、8、 β アクチン (IMG-5142A: IMAGENEX, CA, USA) について蛋白発現を解析した。その結果を図6 (B) に示す。センダイウイルスエンベロープ投与前にJAK阻害剤を処置するとSTAT1のリン酸化が消失し、caspase 3、8の発現も減少した。センダイウイルスエンベロープ投与前に抗IFN受容体抗体を処置するとSTAT1のリン酸化が減少し、caspase 3、8の発現も減少した。

次に、PC3細胞を約 1×10^5 cells/wellの密度で6穴プレートに播種し、24時間後、細胞をJAK阻害剤 ($1 \mu\text{M}$) による前処置1時間の有無に分け、センダイウイルスエンベロープと反応させた (MOI 1

10^4)。更に24時間培養し、PBSで2回洗浄してアネキシンV ($5 \mu\text{l}$)とプロピディウムイオダイド (PI) ($2 \mu\text{l}$)を含む染色溶液に再懸濁し、暗所で15分間、室温で処置し、フローサイトメーターを使って解析した。その結果を図6 (C)に示す。センダイウイルスエンベロープ投与で上昇が認められたアネキシンV陽性細胞は、JAK阻害剤による前処置によって減少した。これらにより、センダイウイルスエンベロープはJAK-STAT経路を活性化してカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

[0054] 実施例8 マイクロアレーによるセンダイウイルスエンベロープの遺伝子発現誘導の解析 PC3細胞を10 cm dishにつき 1×10^6 個の密度で播種し、24時間後にセンダイウイルスエンベロープと反応させた ($\text{MOI } 10^4$)。更に12時間培養を続け、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて、キット付属のプロトコールに従いRNA抽出を行った。マイクロアレー解析はBIO MATRIX RESEARCH INC. (Chiba, Japan)を用いて行った。その結果、発現上昇が認められた上位20遺伝子を表1に示す。表中、下線表示された遺伝子は、IFN誘導性遺伝子であることを示す。

[0055]

[表1]

遺伝子名	アクセッション番号	遺伝子記号	倍率
<u>2'-5'-oligoadenylate synthetase-like</u>	NM_003733	OASL	46.146305
<u>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</u>	NM_001548	IFIT1	29.140244
<u>2'-5'-oligoadenylate synthetase 1</u>	NM_002534	OAS1	28.13778
<u>myxovirus (influenza virus) resistance 1</u>	NM_002462	MX1	24.609573
<u>zinc finger CCHC-type</u>	NM_020119	ZC3HAV1	21.645533
<u>2'-5'-oligoadenylate synthetase 1</u>	NM_016816	OAS1	20.149218
<u>hypothetical protein FLJ20035</u>	NM_017631	FLJ20035	19.94105
<u>interferon induced with helicase C domain 1</u>	NM_022168	IFIH1	17.397228
<u>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58</u>	NM_014314	DDX58	13.773271
<u>dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2</u>	NM_005794	DHRS2	12.704678
<u>interferon-induced protein 44</u>	NM_006417	IFI44	11.367937
<u>sterile alpha motif domain containing 9</u>	NM_017654	SAMD9	11.180847
<u>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</u>	NM_001549	IFIT3	10.32524
<u>hect domain and RLD 5</u>	NM_016323	HERC5	9.883629
<u>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2</u>	NM_016817	OAS2	9.332132
<u>interferon-stimulated transcription factor 3</u>	NM_006084	ISGF3G	8.624724
<u>interferon induced transmembrane protein 1</u>	NM_003641	IFITM1	8.122226
<u>interferon, alpha-inducible protein 6</u>	NM_022873	IFI6	6.6947846
<u>hect domain and RLD 6</u>	NM_017912	HERC6	6.359301
<u>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3</u>	NM_006187	OAS3	5.908166

[0056] 実施例 9 in vivoでの癌細胞増殖

使用した動物については、5～6週齢雄C. B-17/IcrCrj-SCIDマウスは、Charles River Inc. (Yokohama, Japan) から購入した。PC3 cells (5×10^6 cells) をPBS 100 μ l に再懸濁し、5～6週齢雄C. B-17/IcrCrj-SCIDマウスの背中に、皮内注射により投与した。癌が直径約4～6 mmに成長したら、手術後10、13、16日目にセンダイウイルスエンベロープ (5,000 HAU in a total volume of 100 ml) もしくはPBS 100 μ l を腫瘍内注射した。癌体積はノギスを用いて盲目検査により測り、以下の公式により計算した: tumor vo

$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \text{length} \times (\text{width})^2 / 2$ 。その結果を図7 (A) に示す。センダイウイルスエンベロープ群では、著しく腫瘍増殖が阻害されたが、コントロールのPBS群ではその効果は認められなかった。腫瘍移植後41日目のセンダイウイルスエンベロープ治療群とPBS治療群の写真を図7 (B) に示す。これらにより、SCIDマウスに移植したホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対し、センダイウイルスエンベロープが腫瘍抑制効果を持つことを明らかになった。

また、抗アシアロGM-1抗体を投与することにより作成するNK細胞欠損モデルにおいて、センダイウイルスエンベロープの効果を調べた。PC3細胞を同系のSCIDマウスの背部皮内に注射し、センダイウイルスエンベロープまたはセンダイウイルスエンベロープおよびアシアロGM1抗体40 μl を3日おきに3回腫瘍内注射した (day 10、13、16)。この結果を図7 (C) に示す。センダイウイルスエンベロープと抗アシアロGM1抗体治療群では腫瘍抑制効果の減少が観察された。

以上より推測される、ホルモン非抵抗性前立腺癌細胞に対する、センダイウイルスエンベロープのアポトーシス誘導メカニズムの概略を図8に示す。なお、センダイウイルスエンベロープの受容体となるガングリオシドGD1a (Rocheleau J. V. ら *Biosci Rep.* 20, 139-55, 2000年、Wybenga L. E ら *Biochemistry* 35, 9513-8, 1996年) は、PC3細胞、DU145細胞には高く発現される一方、LNCap細胞には発現されていないことが既に知られている (Ravindranath M. H ら *Int J Cancer*. 116, 368-77, 2005年)。

[0057] 実施例10 ヒトPC-3細胞株マウス移植モデルにおけるGENO101の腫瘍増殖抑制効果

また、ヒト細胞 (HEK293) を宿主として調製したセンダイウイルスエンベロープ凍結乾燥製剤 (GENO101) を用いた実験を行った。方法は、基本的には鶏卵を用いた方法と同じであり、宿主として、鶏卵の変わり

にヒト細胞（H E K 2 9 3）を用いた。精製後、常法に従って凍結乾燥製剤化したものを用いた。これに対しては、センダイウイルスエンベロープの単位としてノイラミニダーゼ活性（m N A U）を用いた（H A U、m N A Uの変換についてはおおよそH A U / m N A U = 5 ~ 3）。

ホルモン抵抗性のヒト前立腺癌細胞株（P C 3）をS C I Dマウスに皮内移植した担癌動物モデルに対し、G E N O 1 0 1（1, 0 0 0 m N A U）を4日に1回の間隔で計3回腫瘍内投与した場合（試験ア）と、7日に1回の間隔で計2回腫瘍内投与した場合（試験イ）の両条件における腫瘍増殖抑制効果を検討した。実験開始日（D a y 0）に、対数増殖期のヒトP C 3細胞をトリプシン処理し、R P M I 1 6 4 0（インビトロジェン株式会社）で洗浄したのち、R P M I 1 6 4 0とマトリゲル（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）の2 : 1混合液に分散し、移植用の細胞懸濁液を調製した。ネンブタール（大日本住友製薬株式会社）麻酔下の6週齢のC. B - 1 7 / l c r - s c i d / s c i d J c l雄マウス（日本クレア株式会社）26匹に対し、右側背部の体毛をバリカンで刈り、個体あたり 2.0×10^6 個の細胞を皮内に移植した。腫瘍細胞移植後4日目（d a y 4）に動物20匹を選別し、各群の腫瘍体積平均値がほぼ均一になるよう層化無作為抽出法により4群に分け、さらに試験ア、イにおける投薬群（G E N O 1 0 1）および対照群（溶媒投与群）に無作為に割り付けた（n = 5）。1, 0 0 0 m N A UのG E N O 1 0 1または溶媒（5%トレハロース溶液）の投与は、試験Aではd a y 4、d a y 8およびd a y 12の計3回、試験Bでは細胞移植後d a y 4およびd a y 11の計2回それぞれ行った。各投与日において、麻酔気化器を用い気化したフォーレン（アボットジャパン株式会社）を満たした麻酔箱に、一定時間動物を入れた。麻酔箱から取り出した直後の動物の腫瘍内に、1 - m Lシリンジ（テルモ株式会社）と30 G注射針（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて、G E N O 1 0 1または溶媒のみを0.1 m L投与した。投薬開始日から実験最終日（D a y 48）までの間、腫瘍体積および体重変化率をモニターした。

なお、腫瘍体積および体重変化率は以下の式により算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = [\text{短径 (mm)}]^2 \times \text{長径 (mm)} / 2$$

$$\text{体重変化率 (\%)} = 100 \times [(\text{各測定日の体重} / \text{群分け時の体重}) - 1]$$

薬効の評価項目はday 48における腫瘍体積とし、対照群と投薬群の差を統計学的に検定した。試験ア、イともに先ずF検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散の場合はWelchのt検定をそれぞれ実施した。検定は全て両側検定で行い、有意水準は $\alpha = 0.05$ または $\alpha = 0.01$ とした。

投薬開始日 (day 4) からday 48までの各試験群の腫瘍体積、体重変化率の平均値およびそれらの標準誤差の推移を試験アについては図9、試験イについては図10に示す。試験アおよび試験イ共に、Day 19以降、対照群では平均腫瘍体積が著明に増大したのに対し、投薬群では明瞭な増加の傾向を示さず観察期間を通じて低値で推移した (図9A、図10A)。観察終了日 (day 48) の時点で、投薬群に目視による腫瘍の識別が容易でない個体もみられた (データ示さず)。Day 48における投薬群の平均腫瘍体積は、試験アでは対照群の8.0%、試験イでは対照群の9.5%であり、いずれの試験においても、対照群と投与群との間の差は統計学的に有意であった ($p < 0.05$ [試験ア], $p < 0.01$ [試験イ])。いずれの試験においても、観察期間を通じて体重増加に対する投薬の影響はほとんど認められなかった (図9B、図10B)。

以上より、1,000mNAUのGEN0101を腫瘍移植後4日目 (day 4) より4日に1回の間隔で計3回腫瘍内投与した場合、およびday 4より7日に1回の間隔で計2回腫瘍内投与した場合の両用法において有意な薬効が示された。また、体重増加に対する投薬の影響はほとんど認められないことが明らかになった。

[0058] 実施例 11 マウスメラノーマB16/BL6細胞株マウス移植モデルにおけるHVJ-Eの腫瘍増殖抑制効果

[0059] (1) 被験物質および対照物質

被験物質として、HVJ-Eの凍結乾燥製剤（ジェノメディア（株）、ロット番号：CC7-13）を用いた。投与に際しては、注射用水（大塚製薬工場（株）、ロット番号：K7C75）により凍結乾燥製剤を溶解し40000HAU/mLとした後、終濃度400HAU/mL、または4000HAU/mLになるように5%トレハロース溶液（ジェノメディア（株）、ロット番号：GP29）で希釈し、それぞれDFD-40、DFD-400とした。被験物質は投与当日に調製し、氷上で保存ののち注射筒に充填し、投与まで常温で1分間静置した。対照物質として、5%トレハロース溶液（ジェノメディア（株）、ロット番号：GP29）を用いた。以下、5%トレハロース溶液をTSと記載する。

[0060] （２）動物

B16/BL6細胞株移植用動物として6週齢のC57BL/6J雌性マウス、70匹を日本チャールスリバー（株）から購入し、耳パンチ法により個体識別した。また、群分け前は動物入荷日、系統、性別、個体識別番号を、群分け後は試験番号、動物入荷日、系統、性別、試験群、動物番号、個体識別番号を飼育ケージのラベルに記載した。馴化期間は動物入荷日から8日間とし、馴化期間中、全個体の一般状態（外観的異常の有無、摂餌・摂水の状態など）を観察した。ポリカーボネート製のマウス用ケージ（日本クレア（株）、縦13.6×横20.8×高さ11.5cm）にオートクレーブ滅菌済み床敷き（（株）イワクラ）を入れ、馴化期間および実験期間中のいずれの期間も1ケージにつき1匹のマウスを収容した。飼育室の温度は23±2℃、湿度は55±10%、換気回数は10～15回/時間（オールフレッシュ・エアー方式）、照明時間は7:00～19:00とした。ケージを収納するラックについては、土日祝日を除き毎日、消毒液（ピューラックス（6%次亜塩素酸ナトリウム、（株）オーヤラックス）を300倍希釈した液）を用いて拭き、床も掃除後に消毒液で拭いた。飼料は固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業（株））とし、飲水は栗東市営水道水とした。余剰動物は試験から除外し、ジエチルエーテルにより安楽死させた。

[0061] (3) 腫瘍細胞株の培養および細胞懸濁液の調製

B16/BL6 (マウスメラノーマ株、ID: TKG 0598、ロット番号: 12-6-02) を東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターから購入し、再起培養開始後1週間以降1ヶ月以内に使用した。継代用培地は10%ウシ胎子血清 (JRHBiosciences社) を含むRPMI1640 (インビトロジェン社) とし、5%のCO₂存在下、37℃で培養した。2日毎に継代する場合、 1.5×10^6 個の細胞を10cmの培養皿に播種した。3日毎に継代する場合は 1.0×10^6 個の細胞を10cmの培養皿に播種した。実験開始日 (Day 0) の午後に対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、リン酸緩衝化生理食塩液 (PBS (一)、日水製薬 (株)) に 5.0×10^6 個/mL (5.0×10^5 個/0.1mL/マウス) になるように懸濁した。得られた液を移植用の細胞懸濁液とし、30Gの注射針 (ベクトン・ディッキンソン社) を装着した1mLの注射筒 (テルモ (株)) に採取して移植した。調製後の細胞懸濁液は氷上に置き、適時、ピペット操作により攪拌しながら、60分以内に移植を完了させた。

[0062] (4) 腫瘍細胞の移植

ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール注射液、大日本住友製薬 (株)) を生理食塩液 (大塚製薬工場 (株)) で希釈し、6mg/mLの溶液とした。マウスの腹腔内に本溶液をペントバルビタールナトリウム60mg/kgの用量で投与し、麻酔した。移植部位の体毛をバリカンで刈ったのち、0.1mLの細胞懸濁液を右側背部皮内に移植した。

[0063] (5) 群分け

腫瘍細胞移植後4日 (Day 4) に腫瘍径を測定した。腫瘍体積が70mm³以上の個体、腫瘍細胞移植時に細胞懸濁液が漏れた個体、腫瘍細胞移植部位の近傍の皮下に黒斑が確認された個体、および腫瘍細胞移植部位に紅斑のある個体を除外し、残り全個体の腫瘍体積の平均値と標準偏差 (SD) を算出した。次に、腫瘍体積が平均値 $\pm 2SD$ 以内の条件を満たした54例を決定した。これらの個体を、各群の平均腫瘍体積が均一になるように、腫瘍体

積に基づいて層化無作為抽出法により6群に分けた。さらに、カードを用いてそれぞれ無作為に各試験群へ9匹ずつ振り分けた。

腫瘍細胞移植後11日（Day 11）において、群間に無視できない腫瘍体積の偏りが認められたため、Day 11の投与前に、Day 11の腫瘍体積に基づき、再度群分けを行った。同じ物質を投与した個体各18例（試験群1および4、試験群2および5、試験群3および6）を平均体積がほぼ均一になるように腫瘍体積別に層化無作為抽出法により各2群に分け、さらにその2群ごとにカードを用いて無作為に3回投与あるいは6回投与群に振り分け6群とした。群分けを表2に示す。

[0064] [表2]

群	群名	投与物質	用量 (HAU/マウス)	投与回数 (回)	投与経路	例数 (匹)
A	3回投与 対照群	TS	—	3	腫瘍内	9
B	3回投与 40HAU 群	DFD-40	40	3	腫瘍内	9
C	3回投与 400HAU 群	DFD-400	400	3	腫瘍内	9
D	6回投与 対照群	TS	—	6	腫瘍内	9
E	6回投与 40HAU 群	DFD-40	40	6	腫瘍内	9
F	6回投与 400HAU 群	DFD-400	400	6	腫瘍内	9

[0065] (6) 被験物質および対照物質の投与

腫瘍細胞移植後4日（Day 4）、6日（Day 6）、8日（Day 8）、11日（Day 11）、13日（Day 13）および15日（Day 15）に被験物質または対照物質を投与した。11日（Day 11）、13日（Day 13）および15日（Day 15）には、D群、E群、F群にのみ投与した。気化器（TK-5、ニューロサイエンス（株））により2～3%のイソフルラン（フォーレン、アボットジャパン（株））が維持されている麻

酔箱の中に動物を入れ、6分間吸入麻酔した。麻酔箱から取り出した直後に、動物の腫瘍内に0.1 mLの被験物質または対照物質を投与した。投与際には、腫瘍塊近位の皮下に注射針を刺入し、皮下を通して腫瘍に針先が到達したことを確認したのち、さらに腫瘍の中心部まで針を刺入した。最後まで抵抗を感じながらゆっくりと投与した。ただし、Day 11（4回目）の投与以降において、腫瘍径が160 mm³を超える個体では、腫瘍組織が生存している可能性の高い腫瘍辺縁部に投与した。

[0066] （7）腫瘍体積測定

Day 4、8、11、13、15、18、20、24、28、32および36に、デジタルノギス（（株）ミットヨ、CD-15）を用いて、腫瘍の短径と長径を測定した。なお、腫瘍径の測定の際、以下の3項目の基準に従った。（1）腫瘍細胞移植部位の黒斑あるいは黒色の結節を測定する。（2）痂皮等が観察された場合、当該部位が黒色でかつ原発巣と接触していれば測定範囲に含む。（3）原発巣が黒色でなくなった場合、腫瘍消失と判断する。各群とも個々の腫瘍体積を次の計算式により算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = [\text{短径 (mm)}]^2 \times \text{長径 (mm)} / 2$$

統計学的解析はDay 20の腫瘍体積に対して実施した。腫瘍が体重に影響を与えない最長の期間としてDay 20を設定した。統計学的解析は、GraphPad PRISM 4（GraphPad Software社）を用いた。Day 20の結果について、投与回数別にDunnettの多重比較検定を用いて解析した。すなわち、A群（3回投与対照群）の結果に対するB群（3回投与40 HAU群）とC群（3回投与400 HAU群）の結果、並びにD群（6回投与対照群）の結果に対するE群（6回投与40 HAU群）とF群（6回投与400 HAU群）の結果をそれぞれ検定した。検定結果が有意であった場合、投与回数による差異を、A群とD群、B群とE群、C群とF群の組み合わせについて、Holmの多重比較検定により解析した。また、用量による差異を、B群とC群、E群とF群の組み合わせについて、Holmの多重比較検定により解析した。HVJ-E腫瘍内投与後の

腫瘍体積を図 1 1 に示す。B 群、C 群、E 群、F 群のいずれも、対応する投与回数の対照群に比べて低い値で推移し、腫瘍細胞移植後 2 0 日においては、対応する投与回数の対照群に比べて有意に低い腫瘍体積であった。一方、3 回投与と 6 回投与のいずれにおいても、4 0 H A U 群と 4 0 0 H A U 群の間に差は認められなかった。また、4 0 H A U と 4 0 0 H A U のいずれの用量においても、3 回投与群と 6 回投与群の間に差は認められなかった。検定結果を表 3 にまとめて示す。

[0067] [表3]

3 回投与と 6 回投与の比較		40HAU と 400HAU の比較	
A 群と D 群	NS	B 群と C 群	NS
B 群と E 群	NS		
C 群と F 群	NS	E 群と F 群	NS

NS：有意ではない、腫瘍細胞移植後 20 日における腫瘍体積に関する Holm の多重比較検定

[0068] (8) 生存率の算定

各群とも実験終了日までの生存率を次の計算式により算出した。死亡日については、正午以前に死亡した場合は当日の死亡とみなし、それ以降に死亡した場合は翌日の死亡とみなした。統計学的解析は、Kaplan-Meier 法により生存率グラフを作成した後、投与回数別に、Logrank 検定を用いて行った。多重補正は Holm 法に従った。生存率は、下記の式にしたがって求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = 100 \times (\text{各群の生存例数}) / (\text{Day 11 の各群の例数})$$

D 群においてのみ、5 回目投与後 1 日以内に 2 個体が死亡した。死亡原因は特定できなかったが、大きくなった腫瘍内に薬液を投与することによるストレスが、ショックのような何らかの致死性反応を引き起こした可能性がある。死亡した 2 個体のデータは、解析対象から除外した。HVJ-E 腫瘍内投与後の生存曲線を図 1 2 に示す。3 回投与では、C 群 (4 0 0 H A U 群) において、対照群に比べて生存期間の延長は認められなかったが、B 群 (4 0 H A U 群) では有意な生存期間の延長が認められた。一方、6 回投与では

、E群（40HAU群）、F群（400HAU群）のいずれも対照群に比べて有意な生存期間の延長が認められた。Logrank検定結果を表4に示す。

[0069] [表4]

3回投与	
B群（40HAU）	*
C群（400HAU）	NS
6回投与	
E群（40HAU）	*
F群（400HAU）	**

NS：有意ではない、*： $p<0.05$ 、**： $p<0.01$ 、

対照群が全例死亡した時点における対照群とのLogrank検定

[0070] 以上より、生存期間はいずれの群でも長くなっていた。本実施例においては400HAU3回投与群（C群）では、有意差は認められなかったものの、その他の群では有意差が認められた。

[0071] （9）体重

入荷翌日（Day -7）、腫瘍細胞移植当日（Day 0）、および腫瘍体積測定日（Day 4、8、11、15、18、20、24、28、32および36）に、電子天秤（研精工業（株）、GX-2000）を用いて測定した。測定結果はプリンター（（株）エー・アンド・デイ、AD-8121）で印字した。各群とも個々のDay 4以降の体重変化率を次の計算式により算出した。

$$\text{体重変化率（\%）} = 100 \times (\text{各測定日の体重} - \text{Day 4の体重}) / (\text{Day 4の体重})$$

Day 4（初回群分け）以降Day 11までの体重変化率は、各群とも、体重が一過的に減少する個体が認められたものの、体重変化率の平均値からは、全体傾向として顕著な体重の増減は認められず、群間での明らかな差も認められなかった。Day 12以降の体重変化率については、Day 20までは全体傾向として顕著な体重の増減は認められず、群間での明らかな差も認められなかった。Day 20以降では、各群とも、実験期間を通じて体重

変化率の平均値が増加し、体重増加の傾向がみられた。図 13 に Day 15 から Day 36 までの各群の体重変化率を示す。

産業上の利用可能性

[0072] 前立腺癌の治療においては、現在 P S A スクリーニング法、外科的切除法、内分泌療法、放射線治療法などが存在するが、その根治は依然大きな課題である。本発明によって提供される活性成分としてウイルスエンベロープ、特にセンダイウイルスエンベロープを含有する癌治療・予防剤は、ホルモン抵抗性の前立腺癌に対して優れた治療・予防効果を発揮し、特に内分泌療法後の前立腺癌の再燃癌に対して治療上有効である。また、本発明のセンダイウイルスエンベロープのみを含有する癌治療・予防剤はメラノーマに対して低用量での退縮効果を示し、患者への負担の軽減に寄与する新たな治療薬として期待できる。

本出願は、日本で出願された特願 2 0 0 8 - 2 3 7 1 0 2 (出願日：平成 2 0 年 9 月 1 6 日) を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] ウイルスエンベロープを有効成分として含有する、前立腺癌治療・予防剤。
- [請求項2] ウイルスが、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、バキュロウイルス科、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、アレナウイルス科、およびフィロウイルス科からなる群から選択されるいずれか1つの科に属するウイルスである、請求項1記載の治療・予防剤。
- [請求項3] ウイルスが、パラミクソウイルス科に属するウイルスである、請求項2記載の治療・予防剤。
- [請求項4] ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスおよびインフルエンザウイルスからなる群より選択される、請求項1記載の治療・予防剤。
- [請求項5] ウイルスが、センダイウイルスである、請求項4記載の治療・予防剤。
- [請求項6] NK細胞もしくはアシアロGM1陽性細胞の活性化または腫瘍細胞からのインターフェロン α もしくは β の産生誘導をもたらすことを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の治療・予防剤。
- [請求項7] 前立腺癌のアンドロゲン感受性が一部または完全に低減されている、請求項1～6のいずれか1項に記載の治療・予防剤。
- [請求項8] 前立腺癌がホルモン抵抗性である、請求項1～6のいずれか1項に記載の治療・予防剤。
- [請求項9] 前立腺癌に直接投与されることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の治療・予防剤。
- [請求項10] 前立腺癌に直接注射されることを特徴とする、請求項9記載の治療

・ 予防剤。

[請求項11] 他の癌治療方法と併用されることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の治療・予防剤。

[請求項12] 他の癌治療方法が、投薬、内分泌療法、放射線療法、化学療法および免疫療法からなる群より選択される、請求項 11 記載の治療・予防剤。

[請求項13] 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者に投与されることを特徴とする、請求項 12 記載の治療・予防剤。

[請求項14] 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者が、アンドロゲン感受性が一部または完全に低減された前立腺癌を有する、請求項 13 記載の治療・予防剤。

[請求項15] 内分泌療法の適用履歴を有する前立腺癌患者が、ホルモン抵抗性前立腺癌を有する、請求項 13 記載の治療・予防剤。

[請求項16] 前立腺癌患者または前立腺癌に罹患するリスクを有する者にウイルスエンベロープを有効量投与することを特徴とする、前立腺癌の治療・予防方法。

[請求項17] 前立腺癌の治療・予防において使用するためのウイルスエンベロープ。

[請求項18] 前立腺癌の治療・予防剤を製造するためのウイルスエンベロープの使用。

[請求項19] ウイルスエンベロープを有効成分として含有する、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導剤。

[請求項20] ウイルスがセンダイウイルスである、請求項 19 記載のアポトーシス誘導剤。

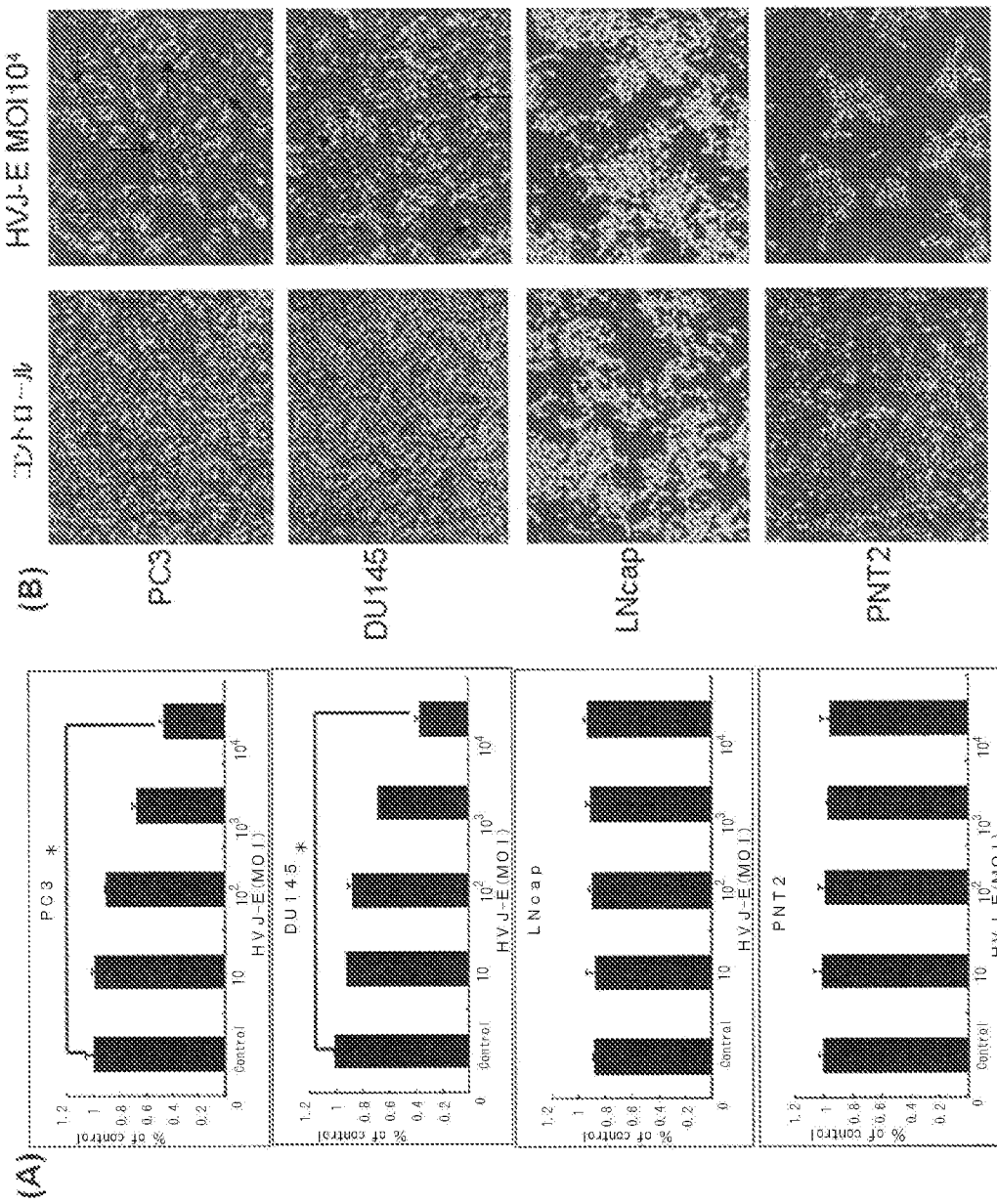
[請求項21] 前立腺癌患者または前立腺癌に罹患するリスクを有する者にウイルスエンベロープを有効量投与することを特徴とする、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導方法。

[請求項22] 前立腺癌細胞のアポトーシス誘導において使用するためのウイルス

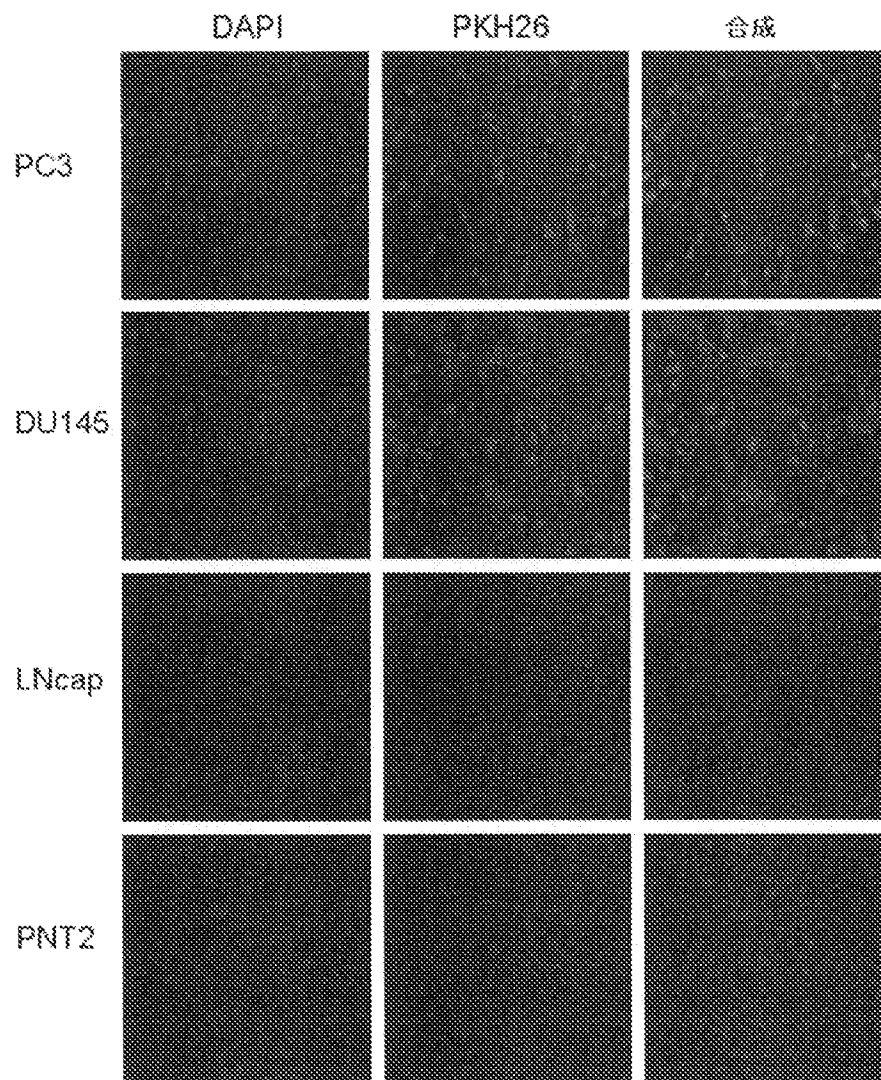
エンベロープ。

- [請求項23] 前立腺癌細胞のアポトーシス誘導剤を製造するためのウイルスエンベロープの使用。
- [請求項24] 有効成分としてセンダイウイルスエンベロープ（H V J - E）のみを含有する、メラノーマ治療・予防剤。
- [請求項25] 1回あたりの投与量が10～10000HAUであることを特徴とする、請求項24記載のメラノーマ治療・予防剤。
- [請求項26] 1回あたりの投与量が40～400HAUであることを特徴とする、請求項24記載のメラノーマ治療・予防剤。
- [請求項27] 投与回数が1～10回であることを特徴とする、請求項24記載のメラノーマ治療・予防剤。
- [請求項28] 投与回数が3～6回であることを特徴とする、請求項24記載のメラノーマ治療・予防剤。
- [請求項29] メラノーマ患者またはメラノーマに罹患するリスクを有する者に、メラノーマの治療・予防のための唯一の有効成分としてセンダイウイルスエンベロープ（H V J - E）を有効量投与することを特徴とする、メラノーマの治療・予防方法。
- [請求項30] メラノーマの治療・予防において使用するためのセンダイウイルスエンベロープ（H V J - E）を唯一の有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項31] メラノーマの治療・予防剤を製造するためのセンダイウイルスエンベロープ（H V J - E）を唯一の有効成分として含む医薬組成物の使用。

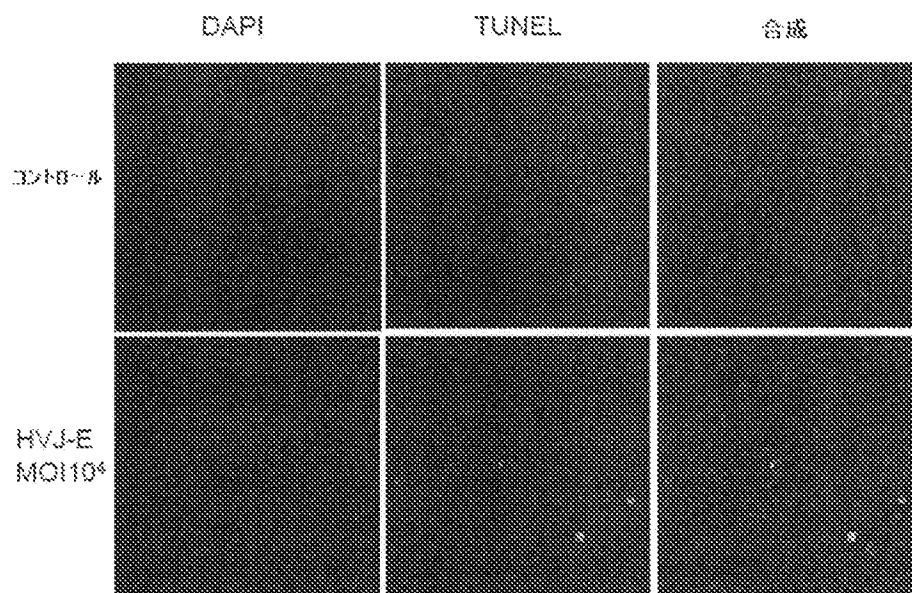
[図1]



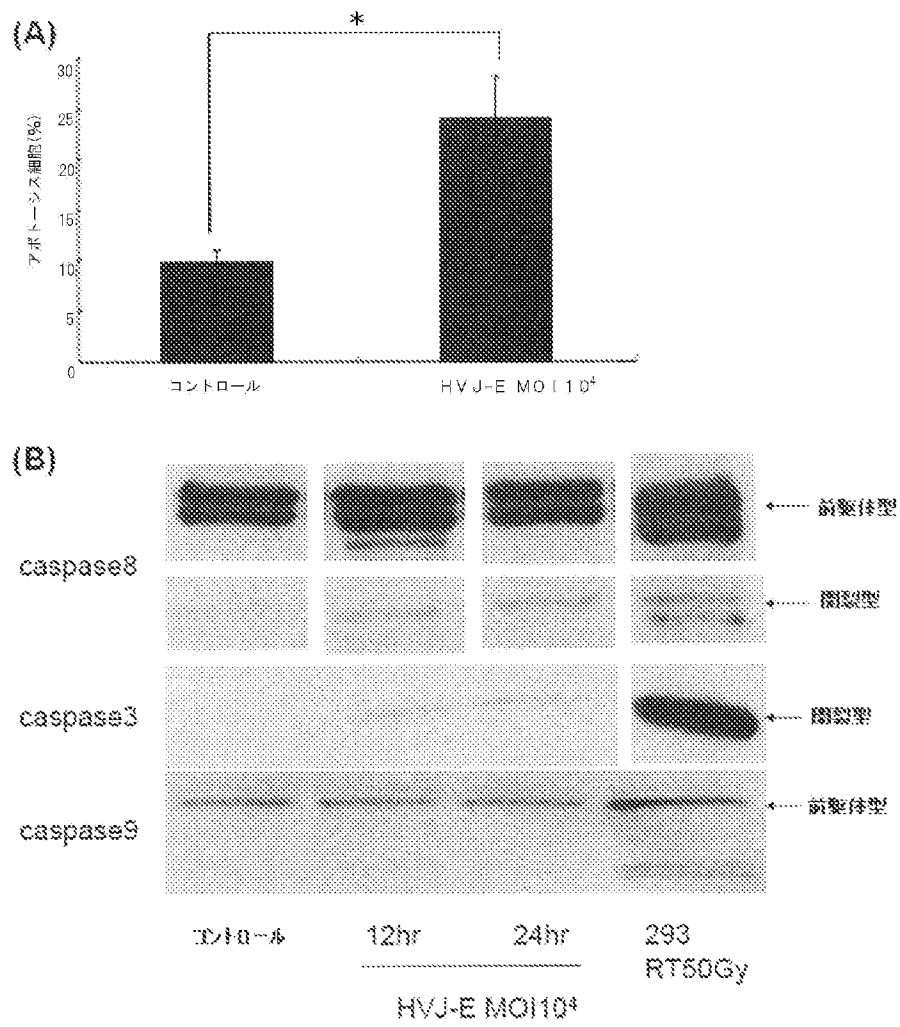
[図2]



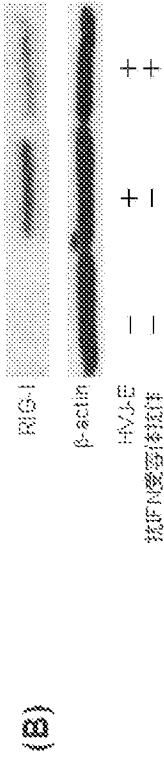
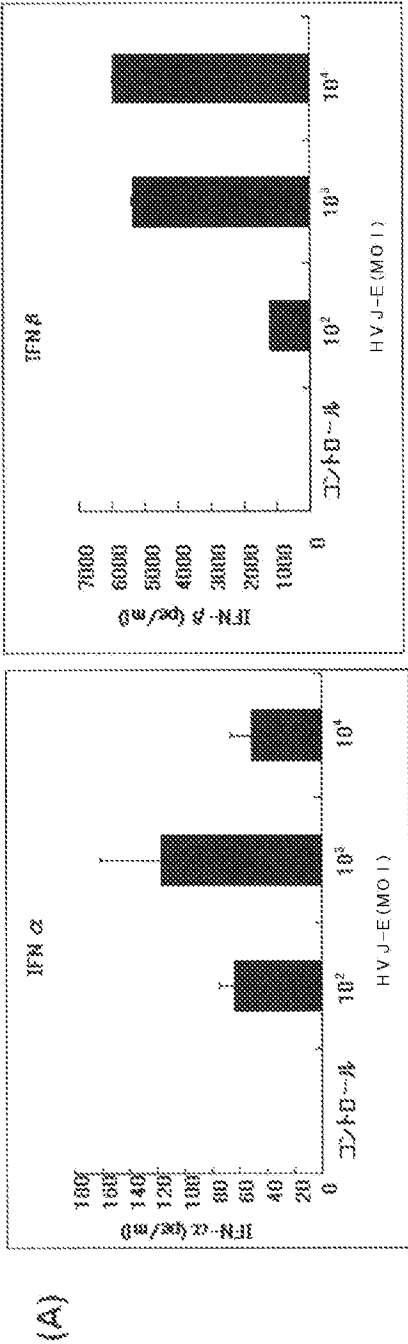
[図3]



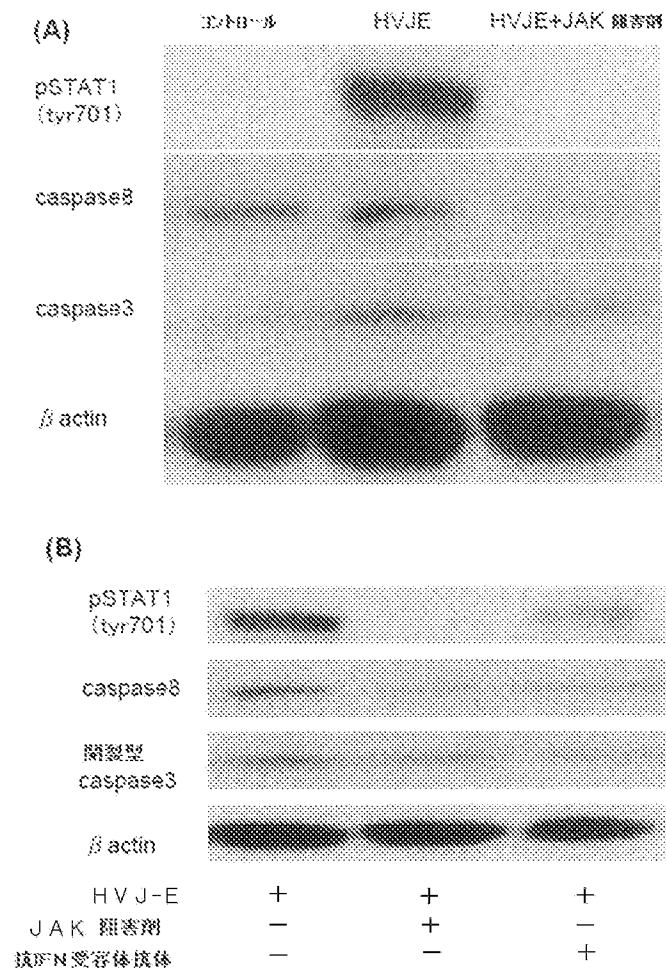
[図4]



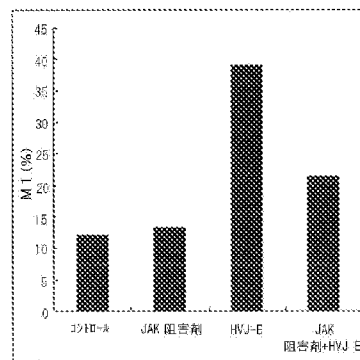
[図5]



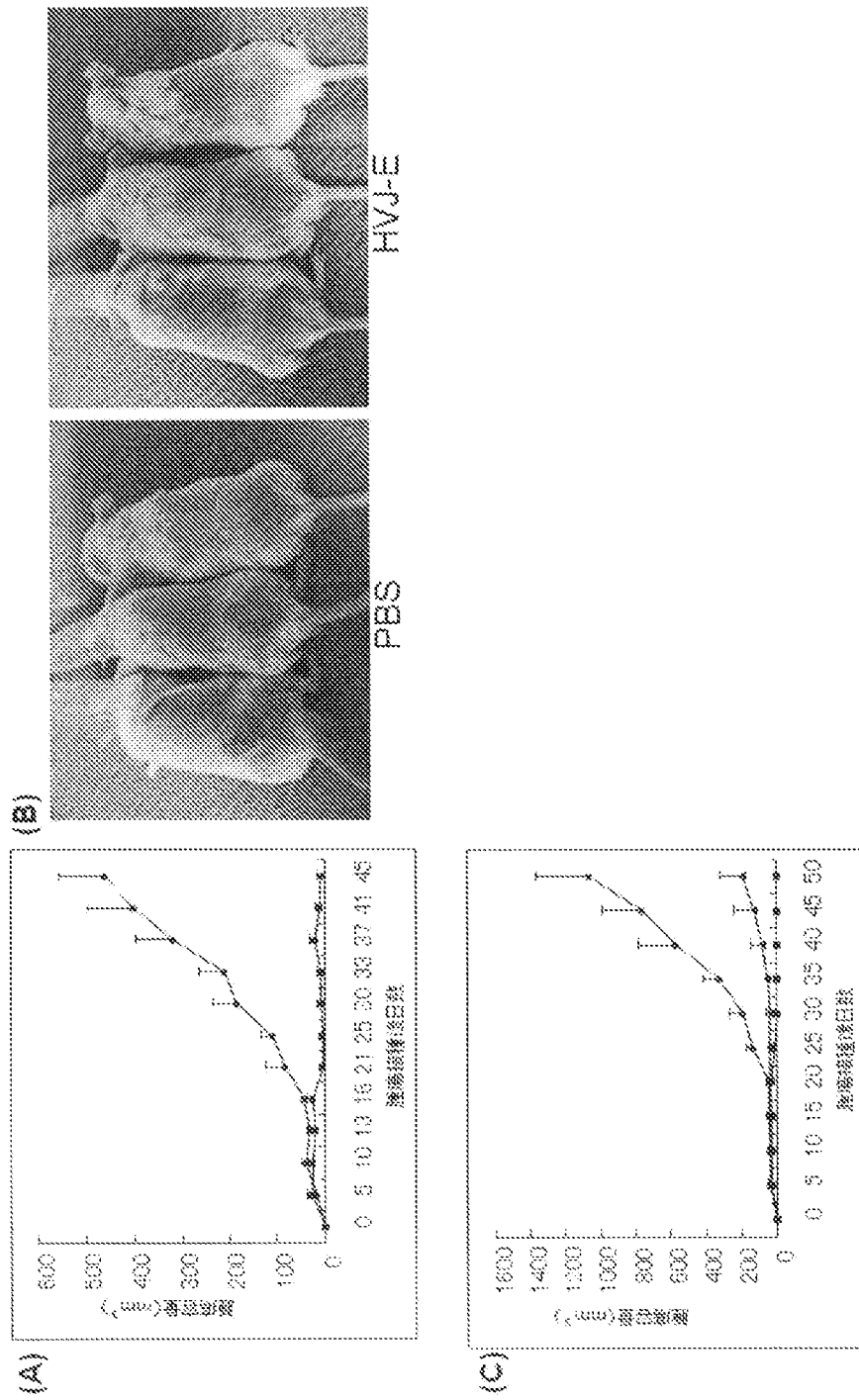
[図6]



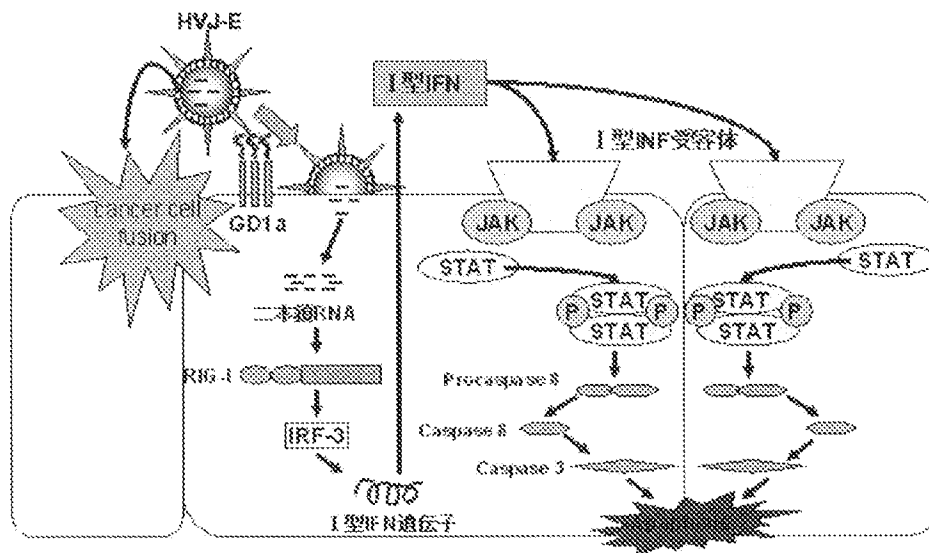
(C)



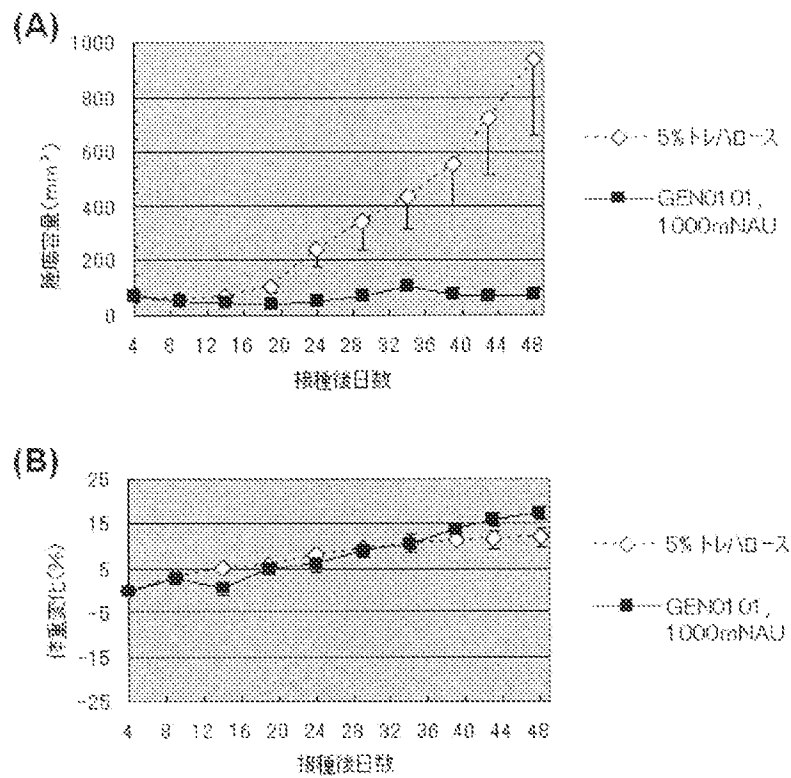
[図7]



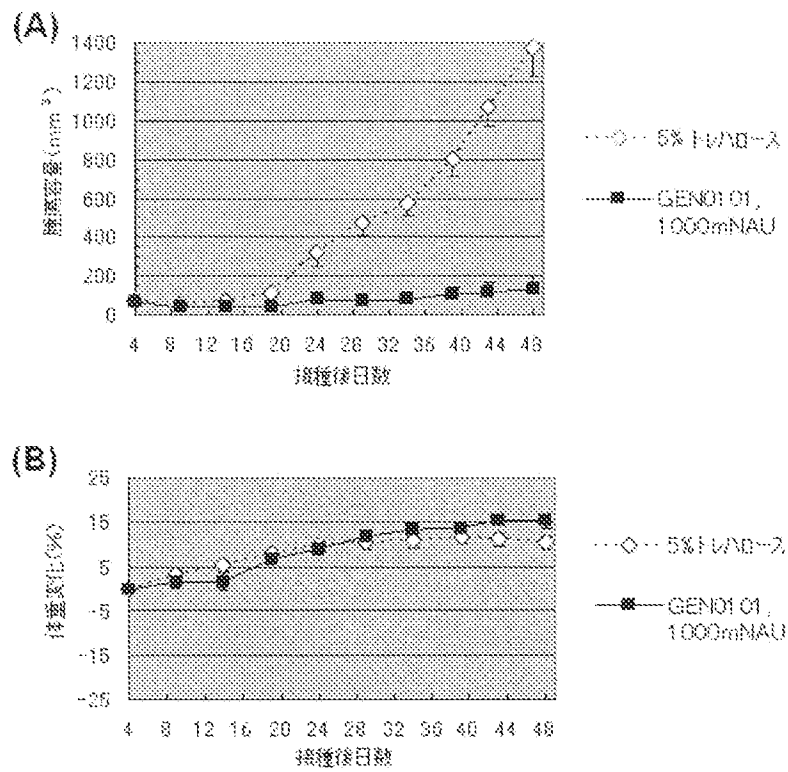
[図8]



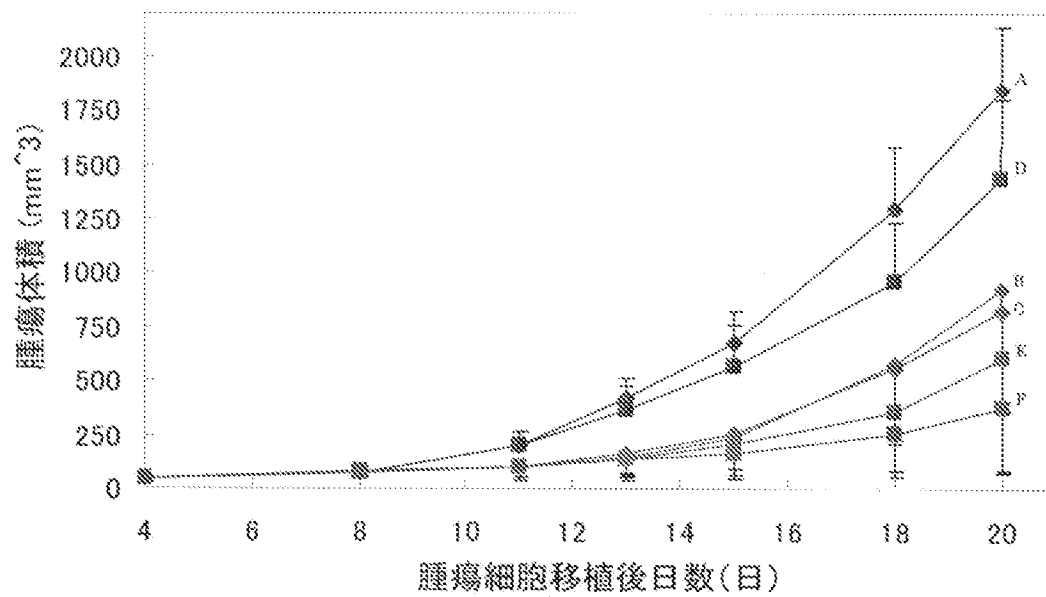
[図9]



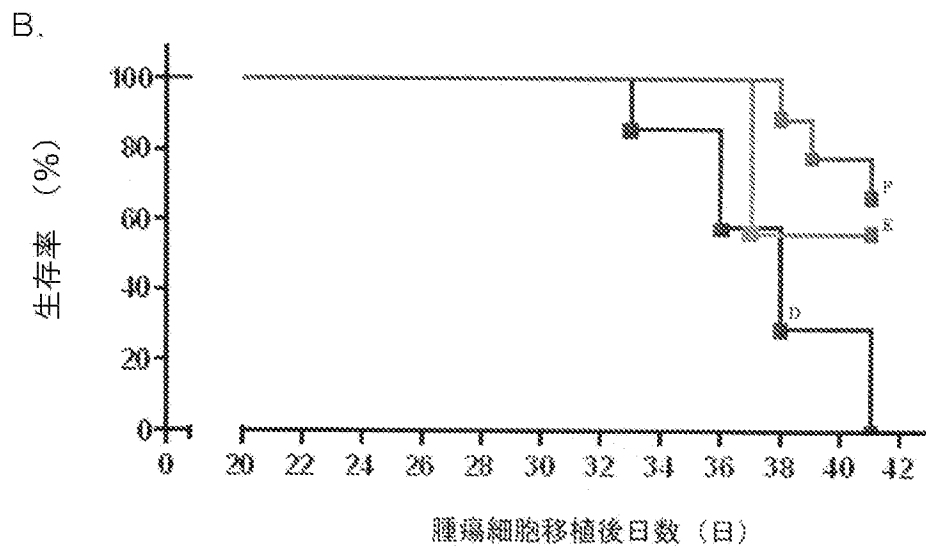
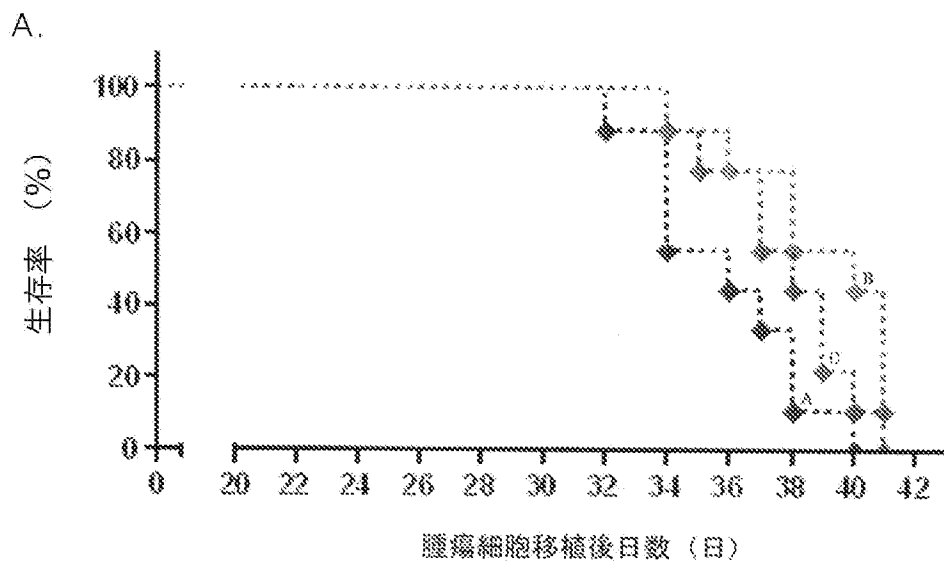
[図10]



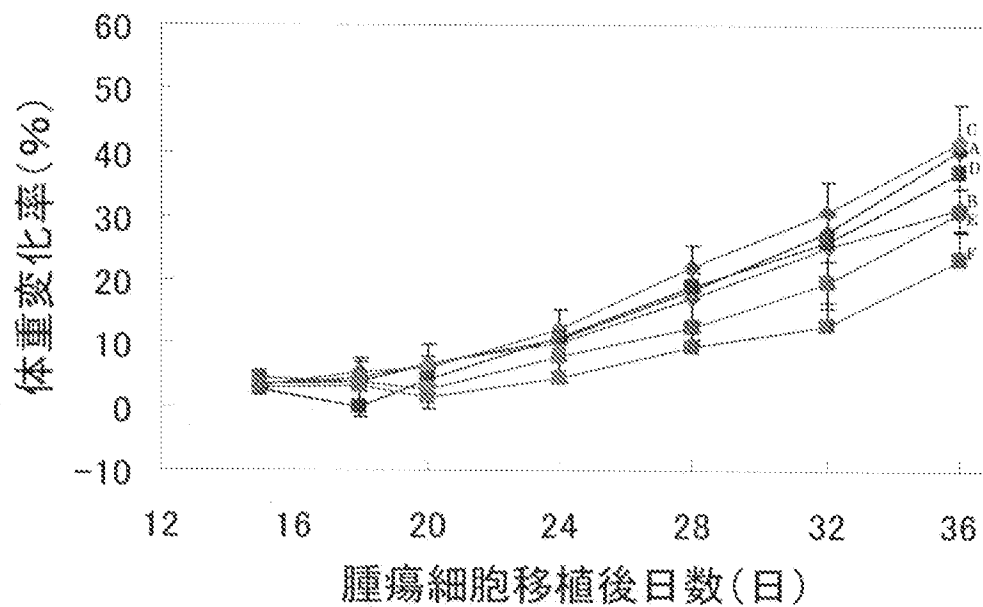
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/76(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/76, A61K45/00, A61P13/08, A61P35/00, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), J-Dream II

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-503995 A (Lorence, Robert M.), 22 April 1997 (22.04.1997),	1-3, 6-15, 17-19, 22, 23
Y	entire text & US 2006/0216310 A1 & EP 1314431 A2 & EP 1486211 A1 & EP 2009119 A1 & WO 1994/025627 A1	4, 5, 20
X	JP 2008-519590 A (Bayer Schering Pharma AG.), 12 June 2008 (12.06.2008),	1-3, 6-15, 17-19, 22, 23
Y	entire text & US 2008/0206201 A1 & EP 1812026 A & WO 2006/050984 A2	4, 5, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2009 (14.10.09)

Date of mailing of the international search report
27 October, 2009 (27.10.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066195

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Atsushi KOMARU et al., "Urokinase Hatsugen Gan Saibo o Hyoteki to shita Sentakuteki Shuyo Hakaisei o Motsu M-idenshi Kesshitsu Sugata Sendai Virus Vector no Zenritsusen Gan ni Taisuru Kento", Dai 72 Kai Nippon Hinyokika Gakkai Tobu Sokai Kirokushu, 15 March 2008 (15.03.08), page 426	1-15, 17-20, 22, 23
X	Hiroaki KINO et al., "Zenritsusen Gan Iden Chiryo o Mezashita Atarashii Oncolytic Sendai Virus Vector no Kaihatsu", 64th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 15 August 2005 (15.08.2005), page 434	1-15, 17-20, 22, 23
X	Naoki TSUBONIWA et al., "HVJ-riposome-ho o Oyo shita Zenritsusen Gan Saibo ni Taisuru Jisatsu Idenshi Ryoho no Kento", The 89th Annual Meeting of the Japanese Urological Association, 20 February 2001 (20.02.2001), page 322	1-15, 17-20, 22, 23
X	WO 2005/095613 A1 (Genomldea Inc.), 13 October 2005 (13.10.2005), entire text & US 2007/0287677 A1 & EP 1731609 A1	1-15, 17-20, 22, 23
X	Masakazu KITA et al., "Zenritsusen Hidai Kanja to Zenritsusen Gan Kanja no Interferon Sanseino", Bulletin de L'institut Pasteur de Kyoto, 1988, no.2, pages 9 to 14	1-6, 9-13, 17-20, 22, 23
Y		7, 8, 14, 15
Y	Yasufumi KANEDA, "Fukasseika Sendai Virus ni yoru Gan Men'eki Ryoho no Kanosei", Hematology & Oncology, 2007, vol.55, no.3, pages 346 to 353	1-15, 17-20, 22, 23
Y	Masayuki KUROOKA et al., "Fukasseika Sendai Virus Ryushi o Mochiita Koshuyo Men'eki Ryoho no Tenkai", Virus, 2007, vol.57, no.1, pages 19 to 28	1-15, 17-20, 22, 23
X	WO 2006/001120 A1 (DNAVEC Research Inc.), 05 January 2006 (05.01.2006), entire text & US 2007/0269414 A1 & EP 1690937 A1	24-28, 30, 31
Y		1-15, 17-20, 22, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066195

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16, 21, 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of these claims include a method for treating a human body,
and therefore do not pertain to an industrially applicable invention.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an
extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-3, 6-15, 17-19, 22 and 23 are not novel, as disclosed in, for example, example 5 in JP 9-503995 A. Therefore, the inventions have no special technical feature.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/76(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/76, A61K45/00, A61P13/08, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), J-Dream II

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 9-503995 A (ローレンス, ロバート, エム) 1997.04.22, 全文 & US 2006/0216310 A1 & EP 1314431 A2 & EP 1486211 A1	1-3, 6-15, 17-19, 22, 23
Y	& EP 2009119 A1 & WO 1994/025627 A1	4, 5, 20
X	JP 2008-519590 A (バイエル・シエーリング・ファーマ アクチエ ンゲゼルシャフト) 2008.06.12, 全文	1-3, 6-15, 17-19, 22, 23
Y	& US 2008/0206201 A1 & EP 1812026 A & WO 2006/050984 A2	4, 5, 20

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保 元浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

4 0 4 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	小丸 淳 他, ウロキナーゼ発現癌細胞を標的とした選択的腫瘍崩壊性を持つM遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの前立腺癌に対する検討, 第72回日本泌尿器科学会東部総会記録集, 2008.03.15, p.426	1-15, 17-20, 22, 23
X	喜納 宏昭 他, 前立腺癌遺伝治療をめざした新しいOncolyticセンダイウイルスベクターの開発, 第64回日本癌学会学術総会, 2005.08.15, p.434	1-15, 17-20, 22, 23
X	坪庭 直樹 他, HVJ-リポソーム法を応用した前立腺癌細胞に対する自殺遺伝子療法への検討, 第89回日本泌尿器科学会総会, 2001.02.20, p.322	1-15, 17-20, 22, 23
X	WO 2005/095613 A1 (ジェノメディア株式会社) 2005.10.13, 全文 & US 2007/0287677 A1 & EP 1731609 A1	1-15, 17-20, 22, 23
X Y	喜多 正和 他, 前立腺肥大患者と前立腺癌患者のインターフェロン産生能, 京都パストゥール研究所研究報告, 1988, No.2, pp.9-14	1-6, 9-13, 17-20, 22, 23 7, 8, 14, 15
Y	金田 安史, 不活性化Sendai virusによるがん免疫療法の可能性, 血液・腫瘍科, 2007, Vol.55, No.3, pp.346-353	1-15, 17-20, 22, 23
Y	黒岡 正之 他, 不活性化センダイウイルス粒子を用いた抗腫瘍免疫療法の展開, ウイルス, 2007, Vol.57, No.1, pp.19-28	1-15, 17-20, 22, 23
X Y	WO 2006/001120 A1 (株式会社ディナベック研究所) 2006.01.05, 全文 & US 2007/0269414 A1 & EP 1690937 A1	24-28, 30, 31 1-15, 17-20, 22, 23

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 16, 21, 29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
上記請求項に係る発明は、人を治療する方法を包含するものであるから産業上利用することができる発明に該当しない。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項 1 - 3, 6 - 1 5, 1 7 - 1 9, 2 2, 2 3に係る発明は、例えばJP9-503995 Aの例5に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。