

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4291884号
(P4291884)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 35/76	(2006.01) A 61 K 35/76
A 61 P 35/00	(2006.01) A 61 P 35/00
A 61 P 35/02	(2006.01) A 61 P 35/02
A 61 P 35/04	(2006.01) A 61 P 35/04
C 12 N 7/00	(2006.01) C 12 N 7/00

請求項の数 29 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平11-512590
(86) (22) 出願日	平成10年8月12日(1998.8.12)
(65) 公表番号	特表2002-511886(P2002-511886A)
(43) 公表日	平成14年4月16日(2002.4.16)
(86) 国際出願番号	PCT/CA1998/000774
(87) 国際公開番号	W01999/008692
(87) 国際公開日	平成11年2月25日(1999.2.25)
審査請求日	平成16年8月6日(2004.8.6)
(31) 優先権主張番号	08/911,383
(32) 優先日	平成9年8月13日(1997.8.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	オンコリティクス バイオテク, インコーゴレーテッド カナダ・アルバータ・T 2 N · 1 X 7 · カルガリー・ケンジントン・クレセント・ノースウェスト・1 1 6 7 · 2 1 0
(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	弁理士 渡邊 隆
(72) 発明者	リー, パトリック ダブリュ ケー カナダ国 アルバータ T 3 A O A 1 カルガリー ノースウェスト ヴィームアープレイス 2 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新形成の治療用レオウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物におけるR a s -介在新生物の治療用医薬の製造のためのレオウイルスの使用。

【請求項 2】

レオウイルスがヒトレオウイルスである請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

ヒトレオウイルスが、1型レオウイルス、2型レオウイルス及び3型レオウイルスからなる群から選択される請求項 2 記載の使用。

【請求項 4】

レオウイルスが非ヒトレオウイルスである請求項 1 記載の使用。 10

【請求項 5】

非ヒトレオウイルスが哺乳動物レオウイルスである請求項 4 記載の使用。

【請求項 6】

レオウイルスの1以上の型が投与される請求項 1 記載の使用。

【請求項 7】

レオウイルスの1以上の株が投与される請求項 1 記載の使用。

【請求項 8】

レオウイルスが野生分離株である請求項 1 記載の使用。

【請求項 9】

レオウイルスが投与前にプロテアーゼで処理される請求項 1 記載の使用。 20

【請求項 10】

新生物が固体新生物である請求項 1 記載の使用。

【請求項 11】

新生物が造血新生物である請求項 1 記載の使用。

【請求項 12】

哺乳動物が、マウス、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、及び非ヒト靈長類からなる群から選択される請求項 1 記載の使用。

【請求項 13】

哺乳動物がヒトである請求項 1 記載の使用。

【請求項 14】

新生物が、膵臓ガン、乳ガン及び脳ガンからなる群から選択される請求項 1 記載の使用。 10

【請求項 15】

新生物が、肺ガン、前立腺ガン、結腸直腸ガン、甲状腺ガン、腎臓ガン、副腎ガン、肝臓ガン及び白血病からなる群から選択される請求項 1 記載の使用。

【請求項 16】

R a s -介在新生物が転移性である請求項 1 記載の使用。

【請求項 17】

哺乳動物における r a s -介在新生物の治療のために有効な薬学組成物であり、(a)上記 r a s -介在新生物の腫瘍崩壊を引き起こすのに有効な量の少なくとも 1 のレオウイルスと、(b)製薬上許容される賦形剤とを含む薬学組成物。 20

【請求項 18】

非経口的に投与される請求項 17 記載の組成物。

【請求項 19】

上記非経口投与が、静脈内と皮下とからなる群から選択される請求項 18 記載の組成物。

【請求項 20】

新生物に直接注入によって投与される請求項 17 記載の組成物。

【請求項 21】

局所的に投与される請求項 17 記載の組成物。

【請求項 22】

レオウイルスがヒトレオウイルスである請求項 17 記載の組成物。 30

【請求項 23】

ヒトレオウイルスが、1型レオウイルス、2型レオウイルス及び3型レオウイルスからなる群から選択される請求項 22 記載の組成物。

【請求項 24】

レオウイルスが非ヒトレオウイルスである請求項 17 記載の組成物。

【請求項 25】

非ヒトレオウイルスが哺乳動物レオウイルスである請求項 24 記載の組成物。

【請求項 26】

レオウイルスの1以上の型を含む請求項 17 記載の組成物。

【請求項 27】

レオウイルスの1以上の株を含む請求項 17 記載の組成物。 40

【請求項 28】

レオウイルスが野生分離株である請求項 17 記載の組成物。

【請求項 29】

レオウイルスがプロテアーゼで処理されている請求項 17 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**関連出願**

本出願は、1997年8月13日提出の米国特許出願第08/911,383号の一部継続出願であり、それの完全な教示は参考によってここに併合される。

発明の背景

50

通常細胞の増殖は、増殖促進性プロトオンコジーンと増殖抑制サプレッサ遺伝子の間の平衡によって調節される。腫瘍原性は、プロトオンコジーンの相乗作用又は腫瘍サプレッションの抑制のような、細胞のシグナルの解釈を支配するそれら細胞の要素の変異の結果となるゲノムへの遺伝的交番によって生起され得る。それは、それらのシグナルの解釈が、細胞の増殖と分化に最後に影響を及ぼし、且つこれらのシグナルの誤解が新生物の増殖（新形成）の結果となり得ると確信される。

プロトオンコジーンの遺伝的交番は、全てのヒト腫瘍のほぼ30%の原因となると確信される（Wiessmuller, L.とWittinghofer, F(1994), Cellular Signaling 6(3):247-67; Barbacid, M(1987) A Rev. Biochem., 56, 779-827）。Rasがヒト腫瘍の病因において演じる役割は、腫瘍の型に特異的である。Ras自身における活性化変異はヒト悪性疾患の大部分の型において見られ、且つ膵臓ガン（80%）、散在性結腸直腸肉腫（40-50%）、ヒト肺腺ガン（15-24%）、甲状腺腫瘍（50%）及び骨髄性白血病（30%）において高度に表される（Millis, NEら（1995）、Cancer Res. 55:1444; Chaubert, P.ら（1994）、Am, J. Path. 144:767; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682）。Ras活性化は、上流マイトイエンシグナリングエレメントによって、とりわけチロシンレセプターキナーゼ（RTKs）によっても実証される。これらの上流エレメントは、もし増殖または過剰発現したならば、最後にはRasのシグナル導入活性によってRas活性を上昇させる結果となる。この実例は、グリア芽細胞の一定の形態におけるPDGFRの、同様に乳癌におけるc-erbB-2/neuにおける過剰発現を含む（Levitzki, A. (1994) Eur. J. Biochem. 226:1; James, P.W.ら（1994）、Oncogene 9:3601; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682）。

新形成のための治療の現行の方法は、外科、化学療法および放射線照射を含む。外科手術は、ガンの早期の段階の最初の治療として典型的に使用される；しかしながら、多くの腫瘍は、外科的手段によって完全に除去することはできない。加えて、新生物の転移性増殖は、外科手術によってガンの完全な治癒を妨げるであろう。化学療法は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、および抗腫瘍抗体のような抗腫瘍活性を有する化合物の投与を含む。化学療法の有効性は、恶心と嘔吐、骨髄低下、腎臓疾患、および中枢神経系低下を含む重篤な副作用によってしばしば制限される。放射線照射治療は、放射線による治療後にそれ自身が回復するために、新生物細胞と異なる通常細胞の大きな能力に依存する。放射線治療は、しかしながら腫瘍の周囲組織の感受性のため、多くの新生物を治療するために使用することができない。加えて、ある種の腫瘍は、放射線治療に耐性を示しており且つそれは細胞のオンコジーンまたは抗オンコジーン状態に依存され得る（Lee, J.Mら（1993）、PNAS 90:5742-5746; Lowe, S.W.ら（1994）、Science, 266:807-810; Raybaud-Diogene, H.ら（1997）、J. Clin. Oncology, 15(3):1030-1038）。新生物増殖のための現行の手段に関連した欠点に鑑みて、ガンの多くのタイプの治療のための改善された方法を提供する更なる必要がある。

発明の概要

本発明は、レオウイルスを用い、哺乳動物中の新形成を治療するための方法、および新形成の治療のための医薬の製造のためのレオウイルスの使用に関する。レオウイルスは新生物に投与され、Rasシグナリング通路（上流または下流のいずれか）のエレメントが新生物の細胞のレオウイルス-介在腫瘍崩壊の結果となる範囲にまで活性化される。レオウイルスは単一投与量でまたは複数投与量で投与され得る；さらに、個々の哺乳動物中の1以上の新生物は同時的に治療できる。固体新生物と造血の新生物の両方が治療できる。レオウイルスは、それが哺乳動物の細胞と接触するように（例えば、固体新生物の中に直接注入により、または造血の新生物のために哺乳動物の中に静脈内に）投与される。該方法は、ネズミ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、および非-ヒト靈長類を含む各種の哺乳動物中の新形成の治療のために使用され得る。好ましくは、該方法はヒトにおける新形成の治療のために使用される。

本発明の方法と使用は、ガン治療の他の形態に関連した副作用無しに、新形成を治療するための有効な手段を提供する。更に、レオウイルスが疾患に関連することが知られないことから、ウイルスの意図的な投与に関連したいずれかの安全性の心配は最小とされる

10

20

30

40

50

。

【図面の簡単な説明】

図1は、レオウイルス腫瘍崩壊の分子ベースの描写であり、レオウイルスは宿主細胞Rasシグナリング通路を侵害する。

図2は、重症複合免疫不全症(SCID)マウスにおけるネズミTHC-11腫瘍増殖のサイズについての活性(中空円)または不活性化(中実円)レオウイルス血清型3(Dearing株)の経時的作用のグラフ的表示である。そのプロットした値は、示された平均の標準誤差と共に、測定の平均を表す。

図3は、SCIDマウスにおけるヒトグリオ芽細胞U-87異種移植片増殖のサイズについての活性(中空円)または不活性化(中実円)レオウイルス血清型3(Dearing株)の経時的作用のグラフ的表示である。そのプロットした値は、示された平均の標準誤差と共に、測定の平均を表す。10

図4は、SCIDマウスにおける処理した(円)または処理しない(四角)両側性のヒトグリオ芽細胞U-87異種移植片増殖のサイズについての活性(中空円、中空四角)または不活性化(中実円、中実四角)レオウイルス血清型3(Dearing株)の経時的作用のグラフ的表示である。そのプロットした値は、示された平均の標準誤差と共に、測定の平均を表す。

本発明の上述のおよび他の目的、特徴および効果は、対応する参考文献が異なる観点を通して同じパートに関して特徴付ける添付の図面において示した通り、本発明の好適な実施態様のより特別な記載によって明らかにされるであろう。その図面は、本発明の原理を説明することを強調することを意図し、必然的に評価するためのものでない。20

発明の詳細な説明

本発明は、新生物へのレオウイルスの投与によって、哺乳動物中の新生物を治療する方法に関する。その名称レオウイルス(呼吸および腸オルファンウイルス)は、これらのウイルスがヒトにおいていずれかの周知の疾患段階に関連しないとしても、呼吸系および腸路の両方から分離され得る(Sabin, A.B. (1959), Science 130:966)。哺乳動物レオウイルスは3つの血清型からなる：1型(Lang株又はT1L)、2型(Jones株、T2J)、3型(Dearing株又はAbney株、T3D)。その3つの血清型は、中和および赤血球凝集阻害アッセイに基づいて容易に同定可能である(Sabin, A.B. (1959), Science 130:966; Fields, B.N.ら(1996)、Fundamental Virology, 3rd Edition, Lippincott-Raven; Rosen, L. (1960) Am. J. Hyg. 71:242; Stanley, N.F. (1967) Br. Med. Bull. 23:150)。レオウイルスがいずれかの特別な疾患と関連することが知られてないとしても(Fields, B.N., Knipe, D.M., とHowley, P.M. eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, p. 1597)、多くの人々は、彼らが成人に達するまでの間にレオウイルスにさらされている(即ち、5歳未満の小児において25%より少なく、20-30歳の成人において50%より大きい(Jackson G.G.とMuldoon R.L. (1973) J. Infect Dis. 128:811; Stanley N.F. (1974) In: Comparative Diagnosis of Viral Diseases, edited by E. KurstakとK. Kurstak, 385-421, Academic Press, New York)。

哺乳動物レオウイルスのための、細胞表面認識シグナルはシアリン酸である(Armstrong, G.D.ら(1984)、virology 138:37; Gentsch, J.R.K.とPacitti, A.F. (1985), J. Virol. 56:356; Paul R.W.ら(1989) Virology 172:382-385)。シアリン酸の偏在する特性のために、レオウイルスは多数の細胞系に効果的に結合し且つ上記の通り多くの異なる組織を潜在的に標的にできる；しかしながら、細胞系の間のレオウイルス感染に対する感受性において顕著な相違がある。

ここに記載した通り、出願人はRas通路において遺伝子により形質転換される場合、レオウイルス感染に感受性となるレオウイルス感染に対し耐性である細胞を発見している。レオウイルス感染に対する細胞の「耐性」は、そのウイルスによる細部の感染が有意のウイルス製造又は産出をもたらさないことを示す。「感染可能」である細胞は、細胞変性効果、ウイルス性タンパク質合成、及び/又はウイルス生産の誘導を示すそれらである。レオウイルス感染への耐性は、早期の転写というよりむしろ遺伝子翻訳のレベルであること4050

が見出され：一方ウイルス転写物が製造され、ウイルス性タンパク質は発現されない。ほぼ 65 kDa 細胞タンパク質のリン酸化と相互関係にある耐性細胞中のウイルス性遺伝子転写は、形質転換細胞中では観測されない二重鎖 RNA-活性化タンパク質キナーゼ (PKR) であることが測定された。PKR のリン酸化は、翻訳の阻害に至る。リン酸化が PKR の周知のインヒビター、2-アミノプリンによって抑制された場合、レオウイルスタンパク質合成の劇的な増大が非形質転換細胞において生じた。更に、腫瘍が右及び左後側部の両方で生じた重症複合免疫不全症 (SCID) マウスモデルにおいて、右側の腫瘍の中に直接注入した場合にレオウイルスが腫瘍サイズを顕著に減じたことが明らかとなった；加えて、腫瘍サイズの顕著な現象は、レオウイルスを直接注入していない左側腫瘍についても記録され、レオウイルスの腫瘍崩壊能力が全身的、同じく局部的であったことを示している。
10

これらの結果は、PKR をダウンレギュレートし且つ再生するための宿主細胞通路装置をレオウイルスが使用することを示した。図 1 は、レオウイルスによる宿主細胞 Ras シグナリング通路の侵害を表す。図 1 中に示した通り、非形質転換（レオウイルス-耐性）と EGFR-, Sos-, 又は Ras- 形質転換（レオウイルス感受性）細胞の両方について、ウイルス結合、インターナリゼーション、非被覆化、及びウイルス遺伝子の早期転写は全てが通常に発生した。非形質転換細胞のケースにおいて、早期ウイルス転写体についての二次構造は PKR のリン酸化を必然的に誘発し、それによってそれを活性化し、翻訳阻害因子 eIF-2 のリン酸化、従ってウイルス遺伝子翻訳の阻害に至る。EGFR-,
Sos-, 又は Ras- 形質転換細胞のケースにおいて、PKR リン酸化工程は、Ras 又はその下流エレメントの一つによって防止され又は逆転され、それによって続発するようなウイルス遺伝子翻訳を許す。Ras (又は下流エレメント) の作用は、PKR リン酸化の妨害により非形質転換細胞におけるウイルス遺伝子翻訳（及びそれによるレオウイルス感染）を促進する、2-アミノプリン (2-AP) の使用によって真似ができる。
20

これらの発見に基づいて、出願人は哺乳動物における新生物を治療するための方法を開発している。哺乳動物の典型は、ネズミ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、非-ヒト霊長類、及びヒトを含む。好適な実施態様において、哺乳動物はヒトである。

本発明の方法において、レオウイルスは個々の哺乳動物中の新生物に投与される。使用できるヒトレオウイルスの典型的な型は、1 型（例えば Lang 株又は T1L）；2 型（例えば Jones 株又は T2J）；及び 3 型（例えば Dearing 株又は Abney 株、T3D 又は T3A）；
30 使用することができるレオウイルスの他の株を含む。好適な実施態様において、レオウイルスは Dearing 株である。代替的に、レオウイルスは、非-ヒト哺乳動物レオウイルス（例えば、ヒヒレオウイルスのような非-ヒト霊長類レオウイルス；ウマの；又はイヌのレオウイルス）、又は非-哺乳動物レオウイルス（例えば鳥類のレオウイルス）とされ得る。

動物の異なる種からのレオウイルスのような、レオウイルスの異なる血清型及び / 又は異なる株の組合せが使用できる。そのレオウイルスは「自然発生的」である：すなわち、それは天然にあるソースから分離でき且つ実験室においてヒトによって意図的に修飾していない。例えば、該レオウイルスは「フィールドソース」から：すなわち、ヒトの患者からのものとされ得る。もし望むなら、そのレオウイルスは新生物への投与の前に、化学的に又は生化学的に予備処理（例えば、キモトリプシン又はトリプシンのようなプロテアーゼによる処理によって）され得る。そのような予備処理はウイルスの外被を取り除き且つそれによって該ウイルスの良好な感染性を生じ得る。
40

新生物は、固体新生物（例えば、肉腫又は癌腫）、又は造血系を冒すガン性の増殖（「造血の新生物」；例えばリンパ腫又は白血病）とされ得る。新生物は、異常な組織増殖であり、一般に通常の組織増殖よりもより急速な細胞増殖によって成長するまるで異なった塊を形成する。新生物は、通常組織による構造組織及び機能的協同性の部分的又は全体的な欠如を示す。ここで使用したような「新生物」は、「腫瘍」としても関連し、造血の新生物、同様に固体新生物を包含することが意図される。新生物の少なくとも幾つかの細胞は変異を有し、Ras 遺伝子（又は Ras シグナリング通路のエレメント）は直接（例えば、Ras 中の活性化変異によって）又は間接的（例えば Ras 通路中の上流エレメントの
50

活性化により)のいずれか一方で活性化される。Ras通路中の上流エレメントの活性化は、例えば、上皮増殖因子レセプター(EGFR)又はSosによる形質転換を含む。Ras、Rasの上流エレメント、又はRasシグナリング通路中のエレメントの少なくとも部分的な活性化の結果生じる新生物は、「Ras-介在新生物」としてここに関係付けられる。本発明の方法によって治療するための特に感染可能な新生物の一つは、膵臓ガンに関連したRas-介在新生物の有病率のために、膵臓ガンである。本発明の方法によって治療するための特に感染可能な他の新生物は、乳ガン、脳ガン(例えば、グリア芽細胞腫)、肺ガン、前立腺ガン、結腸直腸ガン、甲状腺ガン、腎臓ガン、副腎ガン、肝臓ガン及び白血病を含む。

レオウイルスは、新生物に対し、リン酸緩衝塩溶液のような生理学的に許容されるキャリア又はビヒクルにおいて典型的に投与される。「新生物への投与」は、レオウイルスが、それが新生物の細胞と接触するための手法において投与されることを示す(「腫瘍性の細胞」としてもここに関係付けた)。レオウイルスが、同様にその調製物、キャリア又はビヒクルが投与される経路は、その位置、同様に新生物の型に依存するであろう。幅広い各種の投薬ルートが利用され得る。例えば、受け入れやすい固体新生物のために、レオウイルスは、新生物に直接注入によって投与され得る。造血の新生物のためには、例えば、レオウイルスは静脈内又は脈管内に投与され得る。転移又は脳腫瘍のような、身体の中で容易に受け入れできない新生物のためには、レオウイルスは、哺乳動物の身体を通して全身的に輸送され得る且つそれによって新生物に至るような手法において投与される(例えば、鞘内、静脈内又は筋肉内)。代替的に、レオウイルスは、転移に対して身体を通って全身的に運ばれる、単一の固体新生物に直接投与され得る。レオウイルスは、皮下、腹腔内、局所(例えば白血病用)、経口内(例えば、口又は食道の新生物用)、直腸内(例えば結腸直腸の新生物用)、膣内(例えば頸部又は膣の新生物用)、経鼻又は吸入スプレー(例えば肺の新生物用)により投与することもできる。

レオウイルスは、新生物を治療するために十分な量(例えば「有効量」)で投与される。新生物は、新生物の細胞に対してレオウイルスの投与が腫瘍細胞の腫瘍崩壊の影響を受ける場合に「治療」され、新生物のサイズの減少又は新生物の完全な除去の結果となる。新生物のサイズの減少又は新生物の除去は、一般にレオウイルスによる腫瘍細胞の分解(「腫瘍崩壊」)をもたらす。その有効量は個体に基づき決定されるであろうし、及び少なくとも部分的に、レオウイルスの型;その個体のサイズ、年齢、性別;及び新生物のサイズ及び他の特徴の考慮に基づいてなされ得る。例えば、ヒトの治療のためには、レオウイルスのほぼ 10^3 から 10^{12} plaques forming unit(PFU)が、存在する腫瘍の型、サイズ及び数に基づいて、使用され得る。レオウイルスは、单一投薬量、又は複数投薬量(すなわち、1より多い投薬量)において投与され得る。複数投薬は、共同的に、又は連続的に(例えば日又は週の期間にわたり)投与できる。レオウイルスは、同一個体中の1より多い新生物に投与することもできる。

本発明は以下の実施例によって更に説明される。

実施例

材料と方法

細胞とウイルス

多数のオンコジーンにより形質転換したNIH-3T3細胞に属する親NIH-3T3細胞系は、各種のソースから得られる。親NIH-3T3細胞及びHarvey-ras(H-ras)及びEJ-rasオンコジーンで形質転換したNIH-3T3細胞は、Douglas Faller博士(Boston University School of Medicine)の寛大な寄贈である。Sos-形質転換相補(TNIH#5と定義した)のそれらに属するNIH-3T3細胞は、Michael Karin博士(University of California, San Diego)の寛大な寄贈である。H.-J. Kung博士(Case Western Reserve University)は、v-erbBオンコジーンで形質転換したNIH-3T3細胞に属する親NIH-3T3細胞を親切に寄贈された。マウスマタロチオネイン-1プロモーターの転写コントロールの下にHarvey-ras遺伝子を含んだ、C3H 10T1/2ネズミ纖維芽細胞系の誘導体、2H1細胞は、Nobumichi Hozumi博士(Mount Sinai Hospital)

10

20

30

40

50

al Research Institute) から得た。これらの 2 H 1 細胞は、 $50 \mu M ZnSO_4$ の存在において H-ras オンコジーンを発現する仮定的 ras 形質転換体である。全ての細胞系は、10% 胎児ウシ血清 (FBS) を含む Dulbecco の修正イーグル培地で培養した。

NIH-3T3 tet-myc 細胞は、R.N. Johnston 博士 (University of Calgary) から得、10% 加熱不活性化 FBS 及び $2 \mu g / ml$ テトラサイクリンの存在又は不在において抗生物質を含む DMEM 中で培養した (Helbing, C.C. ら、Cancer Res. 57:1255-1258 (1997))。テトラサイクリンの存在において、ヒト c-myc 遺伝子の発現が抑制される。テトラサイクリンの除去は、形質転換した表現型をも表現する、これら細胞において 100 倍まで c-myc の発現の増加の結果となる。

PKR^{+/+} 及び PKR^{0/0} マウス胚纖維芽細胞 (MEFs) は、B.R.G. Williams 博士 (the Cleveland Clinic Foundation) から得、胎児ウシ血清と予め記載された (Yang, Y.L., ら、EMBO J. 14:6095-6106 (1995); Der, S.D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3279-3283 (1997)) 抗生物質を含む -MEM 中で培養した。

これら研究において用いたレオウイルス血清型 3 の Dearing 株は、L 細胞の懸濁培養において増殖させ、-メルカプトエタノール (-ME) が抽出緩衝液から省略された例外を伴う、スミス (Smith, R.E. ら (1969)、Virology, 39:791-800) に従い精製した。 $[^{35}S]$ メチオニンで標識したレオウイルスは、McRae と Joklik (McRae, M.A. と Joklik, W.K., (1978) Virology, 89:578-593) によって記載された通り増殖し精製した。精製したレオウイルスの粒子 / PFU 比は典型的には 100 / 1 である。

レオウイルス感染の免疫蛍光分析

免疫蛍光実験のために、NIH-3T3、TNIH#5、H-ras、EJ-ras、2H1 (+/- $ZnSO_4$)、及び TH-C-11 細胞をカバーガラス上で培養し、該細胞へのウイルスの投与と同じ形式で細胞に、~10 PFU 細胞の感染多度 (MOI) でレオウイルスによって感染させ又はキャリア剤 (リン酸緩衝塩溶液、PBS) の適用によって模倣感染した。注入後 48 時間で、その細胞を 5 分間、エタノール / 酢酸 (20/1) 混合液で固定し、次いで、75%、50% 及び 25% エタノール中で連続洗浄し、その後リン酸緩衝塩溶液 (PBS) で 4 回洗浄により再水和した。固定し且つ再水和した細胞は、室温で 2 時間、最初の抗体にさらした (PBS で 1/100 希釈したウサギポリクローナル抗-レオウイルス 3 型血清) [抗血清は、フロイント完全アジュvant 中レオウイルス 3 型のウサギへの注射、及び継続的な飼育によって調製した]。PBS による 3 度の洗浄の後、その細胞は室温で 1 時間、第 2 の抗体にさらした [ヤギ抗-ウサギ IgG (全体の分子) - フルオレセインイソチオシアナート接合体 (FITC) [Sigma ImmunoChemicals F-0382] 10% ヤギ血清と 0.005% エバンスブルーを含み PBS で 1/100 に希釈した]。最後に、固定し且つ処理した細胞は、3 回以上 PBS で、且つ二重蒸留水で一度洗浄し、乾燥し、且つ 0.1% フェニレンジアミンを含む 90% グリセリン中のスライドガラス上に載置し、且つ Carl Zeiss カメラを乗せた Zeiss Axiophot 顕微鏡により観測した (全ての写真のための拡大率は 200X とした)。

MAP キナーゼ (ERK) 活性の検出

PhosphoPlus p44/42 MAP キナーゼ (Thr202/Tyr204) 抗体キット (New England Biolabs) を、製造者の指示に従って細胞溶解における MAP キナーゼの検出のために用いた。概略的には、サブ融合性单層培養物を、推奨された SDS-含有サンプル緩衝液によって溶解し、SDS-PAGE にかけ、続いてニトロセルロース紙上に電気プロッティングした。その膜は、次いで最初の抗体 (抗-全 MAPK 又は抗-ホスホ-MAPK) により、続いて製造者の指示マニュアル中に記載された通りホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) - 接合した第 2 の抗体でプローブした。

レオウイルス感染細胞の放射能標識化と溶解物の調製

NIH-3T3、TNIH#5、H-ras、EJ-ras、2H1 (+/- $ZnSO_4$)、及び TH-C-11 細胞の融合性单層をレオウイルスで感染した (MOI ~ 10 PFU/細胞)。感染後 12 時間で、その培地を、10% 透析 FBS と 0.1 nCi/ml [^{35}S] メチオニンを含む無メチオニン DMEM に置き換えた。37° で 36 時間の更なるインキュベーション後、その細胞

10

20

30

40

50

はリン酸緩衝塩溶液（PBS）中で洗浄し、1% Triton X-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウムと1mM EDTAを含む同一の緩衝液中で溶解した。その核を低速の遠心分離で取り除き、その上清を使用するまで -70°で保存した。

インビトロでのキナーゼアッセイのための細胞質抽出物の調製

各種細胞系の融合性単層を、96ウェル細胞培養プレート上で培養した。感染後の適切な時点で、その培地を吸引し去り、その細胞を20mM HEPES [pH7.4]、120mM KCl、5mM MgCl₂、1mMジチオトレイトル、0.5% Nonidet P-40、2μg/mlロイペプチド、及び50μg/mlアプロチニンを含む緩衝液で溶解した。その核を低速の遠心分離で取り除き、その上清は、使用するまで -70°で保存した。

細胞質抽出物を、Bio-Radタンパク質ミクロアッセイ法により使用する前にタンパク質濃度で標準化した。各インビトロキナーゼ反応は、細胞抽出液の20μl、反応緩衝液（20mM HEPES [pH7.4]、120mM KCl、5mM MgCl₂、1mMジチオトレイトル、及び10%グリセリン）の7.5μl及びATP混合液（反応緩衝液の7μl中に1.0μCi [⁻³²P] ATP）の7.0μlを含有せしめ、37°で30分間インキュベートした（Mundschau, L.J., とFaller, D.V., J. Biol. Chem., 267:23092-23098 (1992)）。インキュベーション直後、その標識した抽出物は、Laemmli SDS-サンプル緩衝液中いずれかを煮沸し、又はアガロース-ポリ(I)ポリ(C)ビーズによる沈澱化又は抗-PKR抗体により免疫沈降されるいずれかとした。

アガロースポリ(I)ポリ(C)沈澱

各インビトロでのキナーゼ反応混合物に、50%Agポリ(I)ポリ(C)タイプ6スラリー（Pharmacia LKB Biotechnology）を加え、その混合物を4°で1時間インキュベートした。吸着した、標識タンパク質と共にそのAgポリ(I)ポリ(C)ビーズを、室温で緩衝液（20mM HEPES [pH7.5]、90mM KCl、0.1mM EDTA、2mMジチオトレイトル、10%グリセリン）で4回洗浄し、2X Laemmli SDS-サンプル緩衝液と混合した。そのビーズを5分間煮沸し、放出したタンパク質をSDS-PAGEで分析した。

ポリメラーゼ連鎖反応

各種の感染後の経時で細胞を収穫し、氷温TNE（10mMトリス [pH7.8]、150mM NaCl、1mM EDTA）中に再懸濁し、NP-40を1%の最終濃度まで加えた。5分後、その核をペレット化し、RNAをフェノール：クロロホルム法を用いて上清から抽出した。各サンプルからの全細胞RNAの等量を、製造者のプロトコルに従い、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー（Pharmacia）とRTase（GIBCO-BRL）を用いるRT-PCR（Wong, H.ら (1994)、Anal. Biochem., 223:251-258）を受けさせた。該RT-PCR工程からのcDNAは次いで、予期した116bpフラグメントを增幅する、プライマー5'-AATTCTGATTAGGTGACACTATAGCTATTGGTCGGATG-3'（配列番号：1）及び5'-CCCTTTGACAGTGATGCTCCGTTATCACCTCG-3'（配列番号：2）を用い、レオウイルスs1 cDNAの選択的増幅を受けさせた。これらのプライマー配列は、予め決定したS1配列から誘導した（Nagata, L.ら (1984)、Nucleic Acids Res., 12:8699-8710）。そのGAPDHプライマー（Wong, H.ら (1994)、Anal. Biochem., 223:251-258）、5'-CGGAGTCAACGGATTG GTCTGAT-3'（配列番号：3）と5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAAGAC-3'（配列番号：4）は、PCRとして及びゲル積載コントロールとして奉仕した予期される306bp GAPDHフラグメントを増幅するために用いた。s1とGAPDH cDNAの選択的な増幅は、Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600を用いる製造者のプロトコルに従いTaq DNAポリメラーゼ（GIBCO-BRL）を用いて実施した。PCRは、97°で30秒間の変性化工程、55°で45秒間のアニール化工程、72°で60秒間の重合化工程からなるそれぞれに28サイクルで実行した。PCR生産物は、臭化工チジウム-浸透させたTAE-2%アガロースゲルを通す電気泳動により分析し、且つ紫外線照射下にポラロイド57フィルムで写真撮影した。

免疫沈降化とSDS-PAGE分析

抗-レオウイルス血清型3血清による³⁵S-標識レオウイルス-感染細胞溶解物の免疫沈降

10

20

30

40

50

は、予め記載された通り実施した (Lee, P.W.K. ら (1981)、Virology, 108:134-146)。抗-PKR抗体 (Michael Mathews博士から、Cold Spring Harbor) による³⁵S-標識レオウイルス-感染細胞溶解物の免疫沈降を同じく実施した。免疫沈降は、Laemmliのプロトコル (Laemmli, U.K., (1970) Nature, 227:680-685) に従い不連続の SDS-PAGE により分析した。

実施例1. Rasシグナリング通路中の活性化中間体がレオウイルス感染効率を増すEGFR又はv-erbBのいずれか一方で形質転換した同じ細胞が、細胞変性効果、ウイルスタンパク質合成、及びウイルス生産により測定されるような高い感受性であるのに對し、上皮増殖因子レセプター (EGFR) を欠く3T3細胞及びその誘導体はレオウイルスによるより乏しい感染可能性であることが予め示された (Strong, J.E. ら (1993)、Virology, 197:405-411; Strong, J.E. と Lee, P.W.K. (1996) J. Virol., 70:612-616)。
EGFRシグナリング形質導入通路の下流メティエータが含まれ得るかどうかを測定するため、EGFRの構造的に活性化したオンコジーン下流で形質転換した多数の異なるNIH 3T3-誘導化を、レオウイルス感染への相対感受性により測定した。独特の興味は、rasシグナリング通路の中間体であった (Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem., 56: 779-827 (1987); Cahill, M.A. ら、Curr. Biol., 6:16-19 (1996) によって再考した)。
Rasシグナリング通路を研究するために、NIH 3T3親細胞系とSosの活性化版 (Aronheim, A. ら (1994)、Cell, 78:949-961) でトランスフェクションしたNIH 3T3又はras (Mundschau, L.J. と Faller, D.V., (1992) J. Biol. Chem., 267:23092-23098) オンコジーンをレオウイルスにさらし、そのウイルスタンパク質合成を促進する能力を比較した。
10

ウイルスタンパク質の検出は、上述した通りの間接免疫蛍光検鏡法を用いてはじめに実行した。その結果は、NIH 3T3細胞が典型的に平坦化された、顕著な接触阻害を持った開かれた形態をとるのに対し、形質転換した細胞は、より劣る接触阻害を持つ紡錘体形細胞として全てが成長した。各種の形質転換細胞形と非感染親細胞形との比較において、細胞の形態が形質転換で完全に区別されることが明らかとなる。レオウイルスによる挑戦において、親のNIH 3T3系は、親のNIH 3T3に関わらず乏しい感染可能性 (<5%) であった。これに対して、遺伝子導入した細胞系は、感染後48時間で相対的に顕著な免疫蛍光をそれぞれ示した (データは示さず)。

ウイルスタンパク質合成がSos-又はRas-形質転換細胞系においてより有効であることを証明するために、細胞は感染後12から48時間まで [³⁵S]-メチオニンで連続的に標識し、そのタンパク質を上述した通りドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分析した。
30

その結果は、ウイルスタンパク質合成のレベルが親NIH 3T3細胞におけるよりもSos-又はRas-形質転換細胞系において有意に高いことを明確に示した。ウイルス結合の同一性は、ポリクローナル抗レオウイルス抗体と標識化タンパク質との免疫沈降によって確認した。非感染NIH 3T3細胞とその形質転換相補体が細胞のタンパク質合成の匹敵するレベルと倍加時間を表示したことから (データは示さず)、ウイルスタンパク質合成のレベルにおいて観測した相違は、これらの細胞系のために十分な増殖率と翻訳における本質的な相違のためとすることはできない。
40

感染したNIH 3T3細胞の長期の天命は、少なくとも4週間これらの細胞を経過することに続く。それらは通常に成長し且つ溶解又は永続的な感染の徵候無く健全に見えた; この時点以後ウイルスは培地に検出できるものはない (データは示さず)。

実施例2. 活性化オンコジーンにより与えられた増大した感染性が細胞の長期形質転換又は一般化した形質転換段階のためでない

感受性における相違が形質転換の長期効果の結果又は活性化オンコジーンそれ自身の結果とされ得るかどうかを決定するため、亜鉛-誘導化細胞のHarvey-ras (c-H-ras) 遺伝子を発現する細胞系を、上述した通りレオウイルス感染性への感受性について試験した。2H 1と称したこれら細胞は、レオウイルスによる乏しい感染性であるC3H 10T1/2細胞系から誘導し (データは示さず)、マウスマタロチオニン-I プロモーターのコント
50

ロールの下にc-H-ras遺伝子を運ぶ(Trimble, W.S.ら(1986)、Nature, 321:782-784)。

細胞は、感染の前18時間、 $50\mu M$ ZnSO₄で模擬処理し又は予備処理し又は模擬感染(キャリア剤の投与)のいずれか一方とし、感染後又は模擬感染の48時間でこれら細胞の間接免疫蛍光分析を続行した。

その結果(データは示さず)は、18時間のみ誘導したそれらがより感受性(>40%)であったのに対し、非誘導細胞は乏しい感染性(<5%)であることを示した。Zn-誘導2H1細胞における増大したウイルスタンパク質合成は、[³⁵S]-メチオニンによる細胞の代謝標識と続行したウイルス特異的タンパク質のSDS-PAGE分析によって更に確認した(データは示さず)。

これらの観測に基づいて、形質転換細胞中のレオウイルス感染効率の増大は、活性化オンコジーン生産物の直接の結果であり、長期形質転換でしばしば関係した異数性、又は慢性の形質転換段階の下で獲得され得る他の累積した変異のような他のファクターのためではない(例えばp53又はmyc活性化)。

レオウイルス感染に対する感受性が形質転換体自身の結果でない(即ち、宿主細胞の形質転換段階の結果)であることを更に示すために、テトラサイクリン-制御したヒトc-myc遺伝子を含むNIH3T3細胞(tet-myc細胞)を検討した(Helbing, C.C.ら、Cancer Res. 57:1255-1258(1997))。これらの細胞は、c-mycの発現を抑制するテトラサイクリン(2μg/ml)中で保持される。通常の増殖条件下(10%胎児ウシ血清)のテトラサイクリンの除去は、c-Mycタンパク質の蓄積に至り、且つその細胞は形質転換した表現型を表す。我々は、これらの細胞がテトラサイクリンの存在中又は不在中のいずれか一方でウイルス成長を支持することができないことを見出し(データは示さず)、レオウイルス感染に対する感受性が宿主細胞の全般的な形質転換段階のためではなく、むしろRasシグナリング通路のエレメンツによる特異的形質転換を要求することを示唆している。Rasシグナリング通路の活性化の良好な指示剤は、MAPキナーゼERK1及びERK2の活性化である(再考のため、Robinson, M.J.とCobb, M.H., Curr. Opin. Cell. Biol. 9:180-186(1997))。この点については、非形質転換細胞と比較して、Ras-形質転換細胞が顕著により高いERK1/2活性を有することが見出された(データは示さず)。更に、多数のヒトガン細胞系の検査は、ERK1/2それ自身がそれにおける何らかの役割を演じることが明らかでないとしても、ERK1/2活性のレベルとレオウイルス感染への感受性との間の際だった相関関係が明らかにされている(データは示さず)。レオウイルスが非常に良好に増殖するマウスL細胞とヒトHeLa細胞は、両方とも高いERK1/2活性を明示する(データは示さず)。

実施例3. ウィルスの転写体が生成されしかしレオウイルス-耐性NIH3T3細胞中に翻訳されない

レオウイルス感染が非感受性NIH3T3細胞中で妨害されるそのステップも同定した。非感受性細胞へのウィルス結合及びウィルス標準化が感受性細胞で観測したそれに匹敵したため(Strong, J.E.ら(1993)、Virology, 197:405-411)、ウィルス遺伝子の転写を調査した。

感染の最初の12時間のうちにNIH3T3細胞とRas-形質転換細胞中で生成したレオウイルスS1転写体の相対量は、上述した通り、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によつてこれらの転写体の增幅後に比較した。その結果は、2つの細胞系におけるS1転写体の蓄積の割合が、感染後少なくとも12時間までは同じであることを実証した。同様のデータは、他のレオウイルス転写体の蓄積の割合が比較された場合に得られた(データは示さず)。これらの結果は、非感受性細胞における感染の妨害がウィルス遺伝子の転写のレベルではなく、むしろその転写物の翻訳のレベルであることを実証した。

より後の時点で、非形質転換NIH3T3細胞中に存在するウィルス転写体のレベルは、形質転換細胞中の転写体が蓄積するように継続されたのに対し、顕著に減少した。(データは示さず)。NIH3T3細胞において翻訳されるべきこれら転写物の無力性はそれらを劣化させるように寄与するであろう。予期されるように、感染したL細胞中のウイ

10

20

30

40

50

ルス転写体のレベルは、感染した R a s -形質転換細胞中のそれと少なくとも匹敵した（データは示さず）。

実施例 4 . 6 5 k D a タンパク質はレオウイルス-処理した N I H 3 T 3 細胞中でリン酸化されるが、レオウイルス-感染した形質転換細胞中ではされない

ウイルス転写体が生成されるが、しかし N I H 3 T 3 細胞中で翻訳されないことから、今度はウイルス遺伝子の翻訳の阻害に至る、これらの細胞（例えば、P K R の強力な活性化剤とされることが示されている（Bischoff, J.R. と Samuel, C.E., (1989) *Virology*, 172:106-115））において活性化した（リン酸化した）、二重鎖 R N A (dsRNA) - 活性化したキナーゼ、P K R かどうか評価した。そのようなシナリオの直接の推論は、この活性化が形質転換した細胞のケースにおいて、確保のためにウイルスタンパク質合成を許すことを妨げることになるであろう。 10

N I H 3 T 3 細胞と v - e r b B - 又は R a s - 形質転換細胞（それぞれ T H C - 1 1 と H - r a s と定義した）は、レオウイルス（即ち感染した）で処理し又は模擬感染し（上記の通り）、そして処理後 4 8 時間で、インビトロでのキナーゼ反応を受けさせ、上述した通りオートラジオグラフ分析を行った。

その結果は、N I H 3 T 3 細胞のみでレオウイルスにさらした後でのみ、P K R の予期したサイズ、ほぼ 6 5 k D a で別個のリン蛋白質移動があることが明瞭に示された。このタンパク質は、非感染形質転換細胞系又は感染した形質転換細胞系のいずれか一方の溶解物において標識されない。その代わり、ほぼ 1 0 0 k D a でタンパク質移動が、ウイルス感染後の形質転換細胞系において標識されることが見出された。このタンパク質は、N I H 3 T 3 細胞系の前感染又は感染後溶解物のいずれかにおいて不在であり、且つそれが全てのレオウイルスタンパク質が沈殿した抗-レオウイルス血清と反応しないことから（データは示さず）、レオウイルスタンパク質でなかった。同様に 1 0 0 k D a タンパク質もまた、S o s - 形質転換細胞系の感染後溶解物のインビトロでのキナーゼ反応で³²P - 標識されることが見出された（データは示さず）。 20

R a s シグナリング通路中のその中間物は、Z n - 誘導 R a s オンコジーンを含む 2 H 1 細胞の使用によってさらに確証された 6 5 k D a タンパク質のリン酸化の欠如のために応答可能であった。非誘導 2 H 1 細胞（先に示したように、レオウイルス感染に相対的に耐性の）は、ウイルスにさらされた後でのみ、6 5 k D a リン蛋白質を生産することができた。しかしながら、H - R a s オンコジーンの Z n - 誘導を受けさせた 2 H 1 細胞は、このリン蛋白質の生産の顕著な減少を示した。この減少はウイルス合成の増大と同時に起こる。これらの結果は、それ故に、6 5 k D a リン蛋白質の誘導が、N I H 3 T 3 - 特異的事象であった可能性を排除し、且つこのリン蛋白質の生産の誘導を妨げる（又は逆進する）ことにおいて R a s の役割を明確に確立した。Z n - 誘導 2 H 1 細胞は、感染した、慢性的形質転換 H - R a s 細胞において見られる 1 0 0 k D a リン蛋白質を生産しなかった。 30

実施例 5 . 6 5 k D a 蛋白質のリン酸化の誘導は活性なウイルス転写を要する

6 5 k D a リン蛋白質の生産がレオウイルス感染に耐性であった細胞中でのみ及びその細胞がレオウイルスにさらされたあとでのみ生起したことから、活性なウイルス転写が 6 8 k D a リン蛋白質の生産のために要求されるかどうかを調査した。レオウイルスは、N I H 3 T 3 細胞へのレオウイルスの投与の前にそれのゲノムを不活性化するため U V - 処理した。U V - 処理のために、レオウイルスは、ほぼ 4×10^8 PFU/mL の濃度に D M E M 中に懸濁し、2 0 分間短波長（254nm）U V に露光した。U V - 不活性化ウイルスはマウス L - 9 2 9 繊維芽細胞について細胞変性効果の欠如及び予め記載されたような [³⁵S] - メチオニン標識の方法によるウイルス蛋白質合成の欠如によって測定した通りに非感染性であった。そのような U V 処理は、P C R により分析したような、ウイルス遺伝子転写を、かくしてウイルス感染性を廃止した（データは示さず）。次いでその細胞を 4 8 時間インキュベートし、且つ溶解物を調製し上記の通りインビトロで³²P - 標識化を受けさせた。その結果は、非処理レオウイルスに感染した N I H 3 T 3 細胞が、非感染化細胞中に見出されない顕著な 6 5 k D a ³²P - 標識化バンドを生産したことを示した。U V 処理したレオウイルスにさらした細胞は、6 5 k D a 蛋白質の明確な小さいリン酸化、非感染コント 40

ロール細胞と同様に挙動した。かくして、65 kDa リン蛋白質のリン酸化の誘導は、導入レオウイルス中に存在する dsRNA によるものではない；むしろ、それは PKR としての 65 kDa リン蛋白質の同定に密接したウイルス遺伝子の新たな転写を要する。

実施例 6 . PKR としての 65 kDa リン蛋白質の同定

65 kDa リン蛋白質の同定が PKR であるかどうかを決定するために、dsRNA 結合実験を実行し、ここでポリ(I)-ポリ(C)アガロースビーズを上述した通りの³²P-標識化溶解物に加えた。4 で 30 分間のインキュベーションの後、そのビーズを洗浄し、結合タンパク質を放出させ且つ SDS-PAGE によって分析した。その結果は、感染後の NIH 3T3 細胞溶解物中で生産された 65 kDa リン蛋白質が dsRNA に結合できることを示した；そのような結合は、PKR の良く認識された特徴である。これに対して、感染した H-ras-形質転換細胞系中で検出した 100 kDa リン蛋白質は、ポリ(I)-ポリ(C)アガロースに結合しない。その 65 kDa リン蛋白質は、それが確かに PKR であったと認められている PKR-特異的抗体 (Mike Mathews 博士によって提供される、Cold Spring Harbor Laboratory) と免疫沈降可能でもあった。

実施例 7 . PKR 不活性化または欠失は、非形質転換細胞の感染力の増加をもたらすもし、PKR リン酸化が、NIH-3T3 細胞中のウイルス遺伝子翻訳のシャットオフに関与し、形質転換細胞中の活性化オンコジーン産物の機能のひとつがこのリン酸化の防止であるなら、他の手段（例えば、薬剤）による NIH-3T3 細胞中の PKR リン酸化の阻害は、ウイルスタンパク質合成の増加をもたらし、その結果、それらの細胞中の感染の増加をもたらすであろう。この考えを確かめるために、2-アミノプリンを用いた。この薬剤は、PKR 自己リン酸化に対して比較的特異的な阻害活性を有することが示されている (Samuel, C.E. と Brody, M., (1990) Virology, 176:106-113; Hu, Y. と Conway, T.W. (1993) J. Interferon Res., 13:323-328)。したがって、NIH 3T3 細胞を 5 mM 2-アミノプリンと、同時にレオウイルスにさらした。細胞は、感染後 12 から 48 時間 [³⁵S] メチオニンで標識し、溶解物を回収し SDS-PAGE で分析した。

その結果、2-アミノプリンにさらすと、NIH 3T3 細胞中で著しく高いレベルのウイルスタンパク質合成がおこった（示さず）。その増加は、特に、抗レオウイルス血清を用いた溶解産物の免疫沈降の後に現れた。これらの結果は、PKR リン酸化がウイルス遺伝子翻訳の阻害をもたらし、このリン酸化の阻害が翻訳ブロックを放出することを示す。したがって Ras シグナル経路の中間物は、PKR の負の制御を行い、Ras 形質転換細胞の感染力の増加をもたらす。

インターフェロン は PKR 発現を誘導することが知られ、Ras 形質転換細胞中のレオウイルスの複製を著しく減少させることが見出された（データは示さず）。

レオウイルス感染における PKR の役割を定義するための直接的なアプローチは、PKR を欠損した細胞の使用によって行う。したがって、野生型 PKR^{+/+} および PKR^{0/0} マウスからの一次胚纖維芽細胞 (Yang, Y.L. と EMBO J. 14:6095-6106 (1995)) を、レオウイルス感染に対する感受性に関して比較した。その結果は、レオウイルスタンパク質が、PKR^{+/+} 細胞中より PKR^{0/0} 細胞中で著しく高いレベルで合成されたことを明白に示した。これらの実験は PKR 不活性化または欠失は、Ras による形質転換または Ras シグナル経路因子と同様に宿主細胞のレオウイルスの感染に対する感受性を増加させることを示した。これにより、PKR の負の制御における Ras シグナル経路因子の役割が、強く裏付けられた。

実施例 8 形質転換細胞中の PKR 不活性化に、MEK は含まれていない

EGFR のようなレセプターチロシンキナーゼは、Ras を介してマイトジエン活性化または細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK 1/2) を刺激することが知られている (Robinson, M.J. と Cobb, M.H., Curr. Opin. Cell. Biol. 9:180-186 (1997))。この刺激は、マイトジエン活性化細胞外シグナル制御キナーゼ、キナーゼ MEK よる ERK 1/2 のリン酸化を必要とするが、キナーゼ MEK 自身は Raf、Ras の下流のセリン-トレオニンキナーゼにより活性化（リン酸化）される。形質転換細胞中での PKR 不活性化に MEK 活性が必要かどうかを決定するために、最近同定された EK インヒビター P D 98059 (Du

10

20

30

40

50

dley,D.T.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7686-7689 (1995); Waters,S.D., J. Biol. Chem. 270:20883-20886 (1995) の、感染された R a s 形質転換細胞に対する効果を調べた。

H-R a s -形質転換細胞を 80 % 集密 (confluence) まで増殖させ、約 10 p.f.u./細胞のm.o.i.で、レオウイルスで感染させた。ウイルスと同時にジメチルスルホキシド (D M S O) 中で溶解した P D 9 8 0 5 9 (Calbiochem) を細胞に加えた (P D 9 8 0 5 9 の最終濃度は 50 μM であった)。対照細胞は当量の D M S O を与えた。細胞は感染後 35 S -メチオニンで 12 から 48 時間標識した。ついで溶解液を調製し、ポリクローナル抗レオウイルス血清型 3 血清で免疫沈降し、S D S -P A G E で分析した。

結果 (データは示さず) は、P D 9 8 0 5 9 は、E R K 1 / 2 リン酸化を有効に阻害する濃度で、形質転換細胞中のレオウイルスタンパク質合成を阻害しないことを示した。これに対し、P D 9 8 0 5 9 処理は一貫して、これらの細胞中でのウイルスタンパク質合成のわずかな増加をもたらした。この理由は現在調査中である。P D 9 8 0 5 9 の存在下でウイルスタンパク質合成の阻害が起こらないことと一貫して、これらの細胞中の P K R はリン酸化されないままであった (データは示さず)。予想されるように、P D 9 8 0 5 9 には、非形質転換N I H - 3 T 3 細胞中のレオウイルス誘導 P K R リン酸化に対する効果はなかった (データは示さず)。これらの結果は M E K と E R K 1 / 2 は P K R 活性化に関与していないことを示した。

実施例 9 レオウイルスのインビボでの腫瘍崩壊能力

腫瘍縮小の目的でレオウイルスを利用する効率を評価するために、重症複合免疫不全症 (S C I D) 宿主腫瘍モデルを用いた。オスとメスの S C I D マウス (Charles River, Canada) に v-erbB-形質転換 N I H - 3 T 3 マウス纖維芽細胞 (T H C - 1 1 細胞という) を後脇腹の上の (overlying) 2 つの皮下部位に接種した。最初の試験では、滅菌 P B S 1 0 0 μ l 中、 $2 \cdot 3 \times 10^5$ 細胞の接種ボーラスを用いた。2 回目の試験では、P B S 1 0 0 μ l 中、 $4 \cdot 8 \times 10^6$ 細胞の接種ボーラスを用いた。触知可能な腫瘍が接種後約 2 から 3 週で現れた。

レオウイルス血清型 3 (Dearing 株) を、 $1 \cdot 0 \times 10^9$ ブラーケ形成ユニット (P F U) /m l の濃度、20 μ の容量で、腫瘍塊の右側に接種した ("処理腫瘍塊")。腫瘍塊の左側は処理せずに残した ("未処理腫瘍塊")。マウスはレオウイルスの接種後 7 日間観察し、腫瘍サイズの測定をキャリパを用いて 2 日ごとに行い、動物の犠牲後に腫瘍の重量を測定した。すべてのマウスは 7 日後に犠牲となった。結果を表 1 に示す。

表 1 レオウイルスによる処理後の腫瘍塊

試験 1 (n=8)	平均の非処理腫瘍塊	602 mg
	平均の処理腫瘍塊	284 mg
試験 2 (n=12)		
	平均の対照腫瘍塊	1523.5 mg
	平均の非処理腫瘍塊	720.9 mg
	平均の処理腫瘍塊	228.0 mg

試験 1 では、処理腫瘍塊は、非処理腫瘍塊の 47 % であり、試験 2 では、非処理腫瘍塊の 31.6 % であった。これらの結果はウイルス処理腫瘍が、非処理腫瘍よりも実質的に小さかったこと、および非処理腫瘍塊に対してウイルスのさらなる全身性効果があるであろうことを示した。

腫瘍細胞の一方向の (unilateral) 誘導を用いた同様の実験も行った。S C I D マウスに後脇腹の皮下の一方向に v-erbB-形質転換 N I H 3 T 3 マウス纖維芽細胞 (T H C 1 1 細胞) を接種した。触知可能な腫瘍 (平均面積 0.31 cm²) が 2 週間後に現れた。つい

で 8 匹の動物に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBD) 中のレオウイルス血清型 3 (Dearing 株) 1.0×10^7 PFU の腫瘍内接種を 1 回与えた。対照腫瘍 ($n = 10$) に当量の UV 不活性化ウイルスを接種した。腫瘍の成長を 12 日間観察した。この間さらなるレオウイルス処理は行わなかった。

結果は、図 2 に示すように、不活性レオウイルスを 1 回接種された対照動物 (黒丸) の腫瘍が許容できる腫瘍の負荷を上回った 13 日め (終了点) までに、これらの腫瘍に対する活性レオウイルス (白丸) の 1 回の投与の処理は、腫瘍の成長の劇的な抑制を示した。この実験は数回繰り返され、高い再現性があり、腫瘍の成長の抑制に対するレオウイルスの効果を示した。

実施例 10. ヒト乳ガン由来細胞系に対するレオウイルスのインビボでの腫瘍崩壊能
SCID マウスモデル中のヒト乳ガン細胞を用いたインビボ実験も行った。メスの SCID マウスに 1×10^9 MDAMB468 細胞を後脇腹の上の 2 つの皮下部位に接種した。触知可能な腫瘍が接種後約 2 から 4 週で現れた。希釈しないレオウイルス血清型 3 (Dearing 株) を 1.0×10^9 PFU / ml 濃度、 20μ の容量で右側の腫瘍塊内に接種した。結果を表 2 に示す。

表 2 レオウイルスによる処理後の腫瘍塊

処理	平均の非処理腫瘍塊 (左側)	平均の処理腫瘍塊 (右側)
レオウイルス (N=8)	29.02 g	38.33 g
対照 (N=8)	171.8 g	128.54 g

*記：対照マウスの 1 匹が処理期間の初期に死亡した。レオウイルス処理マウス
は死亡しなかった。

これらの研究は予備的なものであるが、レオウイルス処理動物中の腫瘍のサイズが非処理動物よりも実質的に小さいことは明白であった。しかしながら、レオウイルス処理動物の右側 (処理) の腫瘍のサイズは、左側 (非処理) よりも平均でやや大きかった。このことは予期せぬことであったが、これは、これらの腫瘍が元々左側より平均して右側のほうが大きかったことだけでなく、結果として纖維症を起こした炎症細胞により塊の組成が収縮 (taken up) することによって、説明されるであろう。腫瘍塊の組織学的な組成は調査中である。これらの結果も、レオウイルスの反対方向のスライドの非処理腫瘍のサイズに対して、レオウイルスが全身性効果を有することを裏付ける。

実施例 11 他のヒト腫瘍のレオウイルス腫瘍崩壊に対する感受性
上記インビボでの結果を考慮して、ネズミの細胞中で観察された腫瘍崩壊能を他のヒト腫瘍細胞由来の細胞中で調べた。

A. 材料と方法

細胞とウイルス

すべての細胞系は、10% 胎児ウシ血清 (FBS) を含む Dulbecco's 修正イーグル培地 (DMEM) で培養した。

これらの研究で用いたレオウイルス血清型 3 の Dearing 株は、L 細胞の懸濁培養液中で増殖させ、-メルカプトエタノール (-ME) を抽出緩衝液から除いた以外はスミスの方法 (Smith, R.E. ら (1969) Virology, 39:791-800) に従って精製した。 [35 S] メチオニンで標識したレオウイルスは、McRae と Joklik に記載されたようにして (MacRae, M.A. お

よりJoklik,W.K., (1978) *Virology*, 89:578-593)、増殖させ、精製した。精製レオウイルスの粒子 / P F U 比は、典型的には 100 / 1 であった。

細胞に対するレオウイルスの細胞変性効果

集密的細胞単層に、レオウイルス血清型 3 (Dearing株)を、細胞当たり約 40 プラーク形成単位 (P F U) の感染多重度 (M O I) で感染させた。レオウイルス感染と模擬感染細胞の両方について、感染後 36 時間で写真を撮影した。

レオウイルス感染の免疫蛍光分析

免疫蛍光研究のために細胞をカバーガラス上で培養し、上述の如くレオウイルスで ~ 10 P F U / 細胞の感染多重度 (M O I) で感染させ、あるいは模擬感染させた。感染後、種々の時間において、細胞をエタノール / 酢酸 (20 / 1) 混合液で 5 分間固定し、続いて 75%、50%、25% エタノールでの洗浄により再水和し、さらにリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 4 回洗浄した。固定した再水和細胞を 1 次抗体 (P B S 中で 1 / 100 に希釈したウサギポリクローナル抗レオウイルス 3 型血清) に、2 時間室温でさらした。ついで 3 回 P B S で洗浄し、細胞を 2 次抗体 (10% ヤギ血清と 0.005% Evan's Blue 対比染色を含有する P B S 中で、1 / 100 に希釈したヤギ抗ウサギ Ig G (全分子) フルオレセインイソチオシアナート (F I T C) 接合体) に、1 時間室温でさらした。最後に固定した処理細胞をさらに P B S で洗浄し、二重蒸留水で 1 回洗浄し、乾燥させ、0.1% フェニレンジアミンを含む 90% グリセリン中のスライドに載せ、Carl Zeiss カメラが取り付けられた Zeiss Axiophot 顕微鏡で観察した (すべての写真は 200 倍の倍率)。

細胞の感染とウイルスの定量

24 ウェルプレート中で増殖させた集密的細胞単層に、レオウイルスを、10 P F U / 細胞の推定多重度で感染させた。37 で 1 時間のインキュベーションの後、単層を温 D M E M - 10% F B S で洗浄し、ついで同じ培地中でインキュベートした。感染後種々の時間で、N P - 40 とデオキシコール酸ナトリウムの混合物を感染単層上の培地中に、各々最終濃度 1% および 0.5% で直接加えた。ついで溶解液を回収し、ウイルス収率を L - 929 細胞のプラーク滴定で決定した。

レオウイルス感染細胞の放射性標識と溶解液の調製

集密的細胞単層にレオウイルスを感染させた (M O I ~ 10 P F U / 細胞)。感染後、種々の時間で、培地を 10% 透析 P B S と 0.1 mM Ci / ml [³⁵S] メチオニンを含むメチオニンフリー D M E M で置換した。さらに 37 1 時間インキュベーションした後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で洗浄し、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、1 mM E D T A を含む同じバッファーで溶解した。ついで核を低速遠心分離で除去し、使用時まで上清を 70 で保存した。

免疫沈降と S D S - P A G E 分析

抗レオウイルス血清型 3 血清での [³⁵S] 標識レオウイルス感染細胞溶解液の免疫沈降は、すでに記載されたように (Lee, P.W.K. ら (1981) *Virology*, 108:134-146) 行った。免疫沈降は、Laemmli のプロトコール (Laemmli, U.K., (1970) *Nature*, 227:680-685) に従って不連続 S D S - P A G E により分析した。

B. 乳ガン

c-erbB-2/neu 遺伝子は、乳ガンの患者の 20 - 30% で過剰発現している F G F R と非常に相同性のある膜間タンパク質をコードしている (Yu, D. ら (1996) *Oncogene* 13:1359)。ここでは、ポイント変異によっても、あるいは R a s 上流の増強されたシグナルカスケード因子 (c-erbB-2/neu 相同遺伝子 E G F R を含む) によっても、R a s 活性化がレオウイルスの複製に適した環境を最後に作り出すことがここで確立されているので、ヒト乳ガン由来の 1 つの細胞系のレオウイルス感受性についてアッセイした。細胞系には、MDA-MD-435SD (ATCC 寄託 HTB-129)、MCF-7 (ATCC 寄託 HTB-22)、T-27-D (ATCC 寄託 HTB-133)、B T-20 (ATCC 寄託 HTB-19)、HBL-100 (ATCC 寄託 HTB-124)、MDA-MB-468 (ATCC 寄託 HTB-132)、および SKBR-3 (ATCC 寄託 HTB-30) が含まれていた。

細胞変性効果の誘導、および上述の放射性代謝標識および免疫蛍光により測定したウイルスタンパク質合成によって、7 つのうち 5 つの被検乳ガンが、レオウイルス感染に感受性

10

20

30

40

50

があることがわかった。MDA-MD-435SD、MCF-7、T-27-D、MDA-MB-468、およびSKBR-3は感染に強く感受性であり、BT-20およびHBL-100は感染を示さなかった。

C . 脳神経膠芽腫症

次に、ヒト脳神経膠芽腫症由来の種々の細胞系を調べた。細胞系には、A-172, U-118, U-178, U-563, U-251, U-87, およびU-373が含まれていた（細胞はカルガリー大学のWee Yong博士より好意的に贈与された）。

細胞変性効果、免疫蛍光、およびレオウイルスタンパク質の [³⁵S] メチオニン標識で測定すると、7つの脳神経膠芽腫症のうち6つの細胞系、U-118, U-178, U-563, U-251, U-87, およびU-373がレオウイルス感染感受性を示し、A-172は全く感染を示さなかった。

U-87脳神経膠芽腫症細胞系をさらに調べた。レオウイルスに対するU-87細胞の感受性を評価するために、U-87細胞（カルガリー大学のWee Yong博士より贈与）を80%集密まで増殖させ、感染多重度（MOI）10でレオウイルスを加えた。48時間以内に、劇的な広い細胞変性効果が現れた（データは示さず）。これらの細胞の溶解がレオウイルスの複製のためにあることをさらに示すために、感染後種々の時間で、細胞を [³⁵S] メチオニンで3時間パルス標識し、タンパク質を、上述したようにドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析した。その結果（示さず）は、感染後24時間までに、これらの細胞内の効果的なレオウイルス複製と、その結果の宿主タンパク質合成のシャットオフを示した。

U-87細胞は、また、10匹のSCIDマウスの後脇腹へのヒト腫瘍異種移植として導入された。U-87細胞は、上述したように、10%胎児ウシ血清を含むDulbecco's修正イーグル培地で増殖させた。細胞を集めて、洗浄し、滅菌PBS中に再懸濁した。100μl中2.0 × 10⁶細胞を、5から8週令のオスのSCIDマウス（Charles River、カナダ）の後脇腹の上の部位の皮下に接種した。腫瘍の成長を4週間の間、週2回ごとに測定した。結果は、図3に示すように、同じ量のUV-不活性化レオウイルスの1回の腫瘍内接種での腫瘍の処理（黒丸、n = 5）と比較して、生きたレオウイルスの1.0 × 10⁷PFUの1回の腫瘍内接種によるU-87腫瘍の処理（白丸、n = 5）が、腫瘍の成長の劇的な抑制をもたらすことを示し、この中には処理後第4週までの腫瘍退行も含まれていた（P=0.008）。

活性ウイルスで処理した腫瘍の残りのミクロ焦点（microfoci）のヘマトキシリノン／エオシン（HE）染色を、記載されたように（H.Lyon, Cell Biology, A Laboratory Handbook, J.E.Celis, ed., Academic Press, 1994, p.232）実施したところ、残りの腫瘍塊には、目に見える数の生きた腫瘍細胞はなく、また下の骨格筋中への腫瘍細胞の炎症の証拠もなく、大部分が正常のストロマで構成されていることが明らかとなった（データは示さず）。腫瘍細胞の壊死は、ウイルスによる直接の溶解によるものであり、インビボでのレオウイルスによる細胞破壊と同じメカニズムだった。

ウイルスが腫瘍塊を超えて拡散しているかどうかを調べるために、レオウイルスタンパク質全体に対する抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡検査を、腫瘍のセクションと隣接組織について上述のごとく実施した。レオウイルス特異的タンパク質が腫瘍塊に限定されていることが見出された。下の骨格筋には生きた染色は検出されなかった（データは示さず）。予想されたように、ウイルスタンパク質は、UV-不活性化ウイルスを接種された腫瘍内に存在しなかった（データは示さず）。これらの結果は、これらの動物でのレオウイルス複製は、腫瘍特異性が高く、標的的U-87細胞においてのみウイルスが増幅することを示した。

大部分の腫瘍は血管化がすすんでいるため、いくつかのウイルスは血流に入ることができ、感染腫瘍細胞の溶解を起こしたようである。全身拡散したかどうかを調べるため、処理および対照動物から血液を集めて、連続的に希釀して、ブラーク滴定をおこなった。血液中に1 × 10⁵ PFU s/m l の濃度で感染性ウイルスが存在していることが見出された（データは示さず）。

乳ガン細胞に関して上記で示されたように、ウイルスの高い腫瘍特異性は、全身拡散と併せて、レオウイルスが、最初の接種腫瘍から離れた、神経膠芽腫症の腫瘍内で複製できることを示唆した。この仮説を確かめるために、SCIDマウスに、動物の各後脇腹の上の部位に、U-87ヒト腫瘍異種移植で、両側性の移植を行った。これらの腫瘍は、0.5 × 0.5

10

20

30

40

50

c mになるまで成長させた。ついで処理動物では(n = 5)左側腫瘍にレオウイルスを1回接種した。対照動物(n = 7)はUV不活性化ウイルスを偽接種した。腫瘍は4週間の間週2回測定した。

その結果、図4に示すのように、不活性化レオウイルス処理動物(黒い丸と四角)と比較して、処理(丸)と非処理腫瘍塊(四角)の両方で阻害とその結果の退行が、生きたレオウイルス処理動物(白い丸と四角)でのみ起こったことが示された。その後の免疫蛍光分析は、レオウイルスタンパク質が、同側(処理)と対側の(非処理)腫瘍の両方に存在することを示し、非処理側の退行はレオウイルスの腫瘍崩壊の結果であることが示された(データは示さず)。

D. 脾臓ガン

脾臓ガン由来の細胞系を調べた。細胞系には、Capan-1(ATCC寄託HTB-79) , BxPC3(ATCC寄託CRL-1687) , MIAPACA-2(ATCC寄託CRL-1420) , PANC-1(ATCC寄託CRL-1469) , AsPC-1(ATCC寄託CRL-1682) , およびHs766T(ATCC寄託HTB-134)が含まれていた。

ウイルス誘導細胞変性効果、免疫蛍光、[³⁵S]メチオニン標識で測定すると、これら6つの細胞系のうちの5つ、Capan-1 , MIAPACA-2 , PANC-1 , AsPC-1 , およびHs766Tがレオウイルス感染感受性を示し、BxPC3はわずかな感染しか示さなかった。興味深いことに、レオウイルス腫瘍崩壊に感受性を示した5つのセルラインのうち、4つが、K-ras遺伝子のコドン12に形質転換変異を有する(Capn-1, MIAPACA-2, PANC-1, AsPC-1)ことが示されているが、感受性を有していないもの(BxPC3)はその変異がないことが示されている(Berrozpe,G.ら(1994), Int. J. Cancer, 58:185-191)。他のK-rasコドンの状態は現在のところHs766T細胞系では知られていない。

実施例12. 免疫応答能のある動物中での腫瘍崩壊剤としてのレオウイルスの使用

上述のSCIDマウスではなく、免疫応答能のある動物中でのレオウイルスの使用を調べるために、同系マウスマodelを開発した。C3Hマウス(Charles River)に1.0 × 10⁷ PFU s ras形質転換C3H細胞(カルガリー大学、D.Edwardsより贈与)を皮下に移植した。腫瘍形成の後、マウスを生きたレオウイルス(1.0 × 10⁸ PFU s)あるいはUV-不活性化レオウイルスのいずれかの連続接種で処理した。最初のシリーズの後(9日間6回接種)、試験動物は希釈レオウイルス(1.0 × 10⁷ PFU s)処理を2日毎に受けた。模擬処理動物は同量のUV-不活性化ウイルスを受けた。

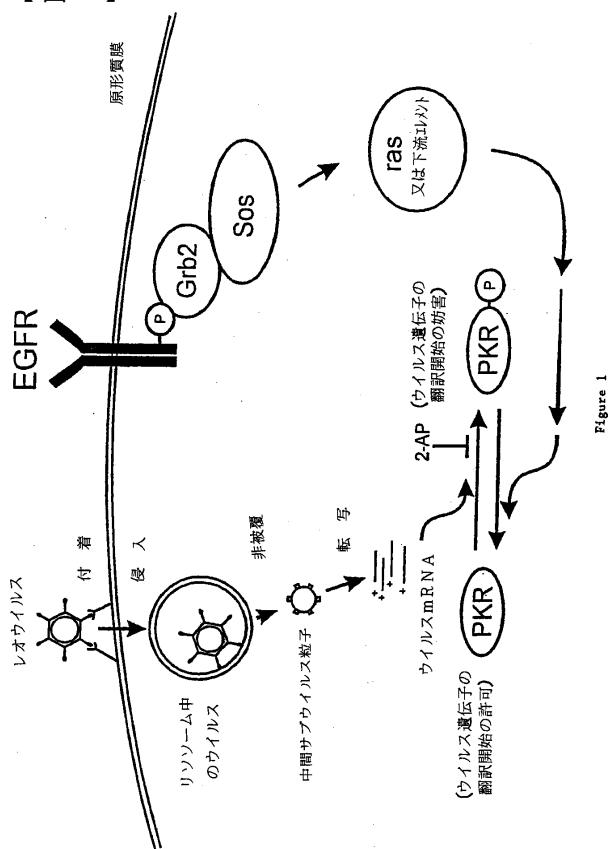
その結果、レオウイルスは、これらの免疫応答能のある動物内で効果的な腫瘍崩壊剤であることが示された。全ての試験動物は腫瘍の退行を示した。9匹のうち5匹の試験動物は、22日後に完全な腫瘍退行を示した。そのとき対照動物は許容腫瘍負荷を超えていた。さらにレオウイルス処理動物では検出可能な副作用はみられなかった。

あらかじめレオウイルスにさらしておく効果を評価するために、腫瘍形成の前に試験グループの半分にレオウイルス(腫瘍内接種1.0 × 10⁸ PFU s、3型Dearing)を接種した。接種2週間後に、すべてのさらした動物において中和抗体が検出された。腫瘍形成の後、上述のごとく動物は生きたレオウイルス、あるいはUV-不活性化レオウイルスのいずれかの連続で処理した。

結果(データは示さず)は、レオウイルスに対する循環中和抗体を有する動物(すなわち腫瘍形成前にレオウイルスを接種したもの)は、レオウイルスを前もってさらさなかつた動物と同様に、腫瘍抑制および退行が現れることを示した。このようにレオウイルスは、レオウイルスに前もってさらした免疫応答能のある動物であっても効果的な腫瘍崩壊剤として機能できる。

本発明は、その好適な実施態様を参照して詳しく述べたが、これは、当業者には、その形式や詳細において、特許請求の範囲で定義された本発明の範囲と思想から離れずに、種々の変形がなされるであろうことが理解されるであろう。

【図1】



【図2】

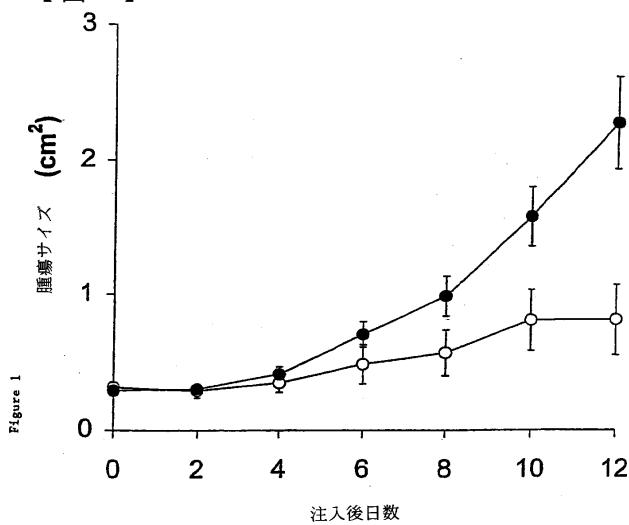


Figure 2

【図3】

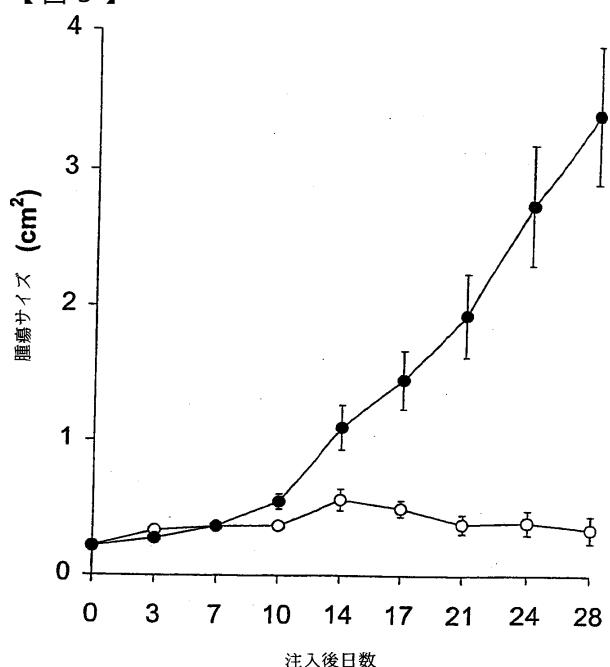


Figure 3

【図4】

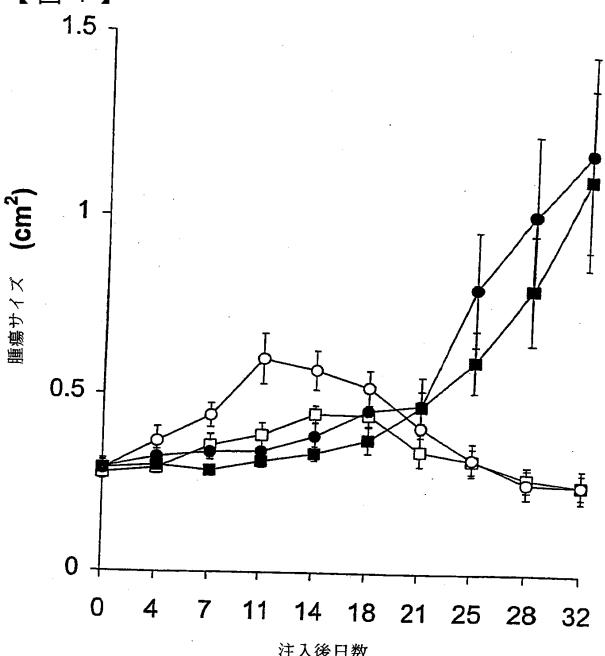


Figure 4

フロントページの続き

(72)発明者 ストロング , ジェイムズ

カナダ国 アルバータ T 2 K 2 N 6 カルガリー ノースウエスト ネスピット ロード 5
0 7 1

(72)発明者 コフィー , マシュー シー

カナダ国 アルバータ T 2 N 2 Y 5 カルガリー ノースウエスト 3 4 A ストリート 5
3 6

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 STRONG J.E. et al., The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to Reovirus infection., Journal of Virology, 1996年, Vol.70, No.1, 612-616

STEELE T.A. et al., Reovirus type 3 chemoimmunotherapy of murine lymphoma is abrogated by cyclosporine, Cancer Biotherapy, 1995年, Vol.10, No.4, p.307-315

DUNCAN M.R. et al., Differential sensitivity of normal and transformed human cells to Reovirus infection., Journal of Virology, 1978年, Vol.28, No.2, p.444-449

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 35/76

C12N 7/00

BIOSIS(STN)

CA(STN)

MEDLINE(STN)

EMBASE(STN)