

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-538494
(P2008-538494A)

(43) 公表日 平成20年10月30日(2008.10.30)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 7/00 (2006.01)	C 12 N 7/00	4 B 0 6 3
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 C 0 8 4
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-505606 (P2008-505606)	(71) 出願人	507333683 ザ クリーブランド クリニック ファウ ンデーション アメリカ合衆国 オハイオ 44195 クリーブランド、ユークリッド アベニュー ー 9500, シーシーエフ イノベーシ ョンズ/ディー20
(86) (22) 出願日	平成18年4月7日 (2006.4.7)	(71) 出願人	507333801 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 07 オークランド、12ティーエイチ フロア、フランクリン ストリート 11 1
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月22日 (2007.11.22)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/013167		
(87) 國際公開番号	W02006/110589		
(87) 國際公開日	平成18年10月19日 (2006.10.19)		
(31) 優先権主張番号	60/669,473		
(32) 優先日	平成17年4月7日 (2005.4.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/751,809		
(32) 優先日	平成17年12月19日 (2005.12.19)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌と関連するガンマレトロウイルス

(57) 【要約】

本発明は、ウイルスをコードする単離された核酸配列；該ウイルスのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド；該ウイルスの核酸配列を含むベクター；該ベクターを含む細胞；該ウイルスに結合特異性を有する抗体およびその抗原結合断片；該ウイルスの検出またはスクリーニング方法（例えば、個体において）；該ウイルスを阻害する薬剤の同定方法；該ウイルスに対する免疫応答の誘導方法；個体におけるXMRVの存在と関連する疾患（例えば、前立腺癌などの癌）の処置方法；無症候性癌（例えば、前立腺癌）の検出方法；癌（例えば、前立腺癌）を発症するリスクのある個体の同定方法；ならびに該ウイルスを検出するためのキットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

個体の前立腺腫瘍内に存在する単離されたXMRV。

【請求項 2】

個体が、RNアーゼL遺伝子をコードする遺伝性前立腺癌-1(HPC1)対立遺伝子に変異を含む、請求項1記載のウイルス。

【請求項 3】

変異がホモ接合変異である、請求項2記載のウイルス。

【請求項 4】

変異がRNアーゼL変異R462Qについてホモ接合である、請求項3記載のウイルス。 10

【請求項 5】

配列番号:1またはその相補配列と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列を含む単離されたウイルス。

【請求項 6】

配列番号:1およびその相補配列を含む単離されたウイルス。

【請求項 7】

配列番号:1と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列にコードされたアミノ酸配列を含む単離されたウイルス。 20

【請求項 8】

配列番号:1にコードされたアミノ酸配列を含む単離されたウイルス。

【請求項 9】

配列番号:2を含む単離されたウイルス。

【請求項 10】

配列番号:3と少なくとも97%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。 20

【請求項 11】

配列番号:4と少なくとも97%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号:5と少なくとも94%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。 30

【請求項 13】

配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

請求項5記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 15】

請求項14記載のベクターを含む細胞。

【請求項 16】

配列番号:1と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列にコードされたアミノ酸配列を含むウイルスに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片。 40

【請求項 17】

該ウイルスにコードされたgagポリペプチドに結合する、請求項16記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 18】

gagポリペプチドが配列番号:3を含む、請求項17記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 19】

a) 核酸配列およびXMRV核酸配列間でハイブリダイゼーション複合体が生じ得る条件下で、試料を、XMRV核酸配列の全体または一部にハイブリダイズする核酸配列と接触させる工程;ならびに

b) ハイブリダイゼーション複合体が試料中に検出されるかどうかを測定する工程、を含み、

ここで、ハイブリダイゼーション複合体が検出される場合、XMRVが試料中に存在する、試料中のXMRVの検出方法。

【請求項 2 0】

a) 抗体およびXMRVポリペプチド間で複合体が生じ得る条件下で、試料を、XMRVポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程;ならびに

b) 複合体が試料中に検出されるかどうかを測定する工程を含み、

ここで、複合体が検出される場合、XMRVが試料中に存在する、試料中のXMRVの検出方法。

10

【請求項 2 1】

a) XMRVを、評価される薬剤と接触させる工程;ならびに

b) 該薬剤の存在下でXMRVが阻害されるかどうかを測定する工程を含み、

ここで、該薬剤の存在下でXMRVが阻害される場合、該薬剤はXMRVを阻害する、XMRVを阻害する薬剤の同定方法。

【請求項 2 2】

該薬剤の存在下でのXMRVの活性が、逆転写酵素活性を有するレトロウイルス粒子を作製するXMRVの能力を測定することにより測定される、請求項 2 1 記載の方法。

20

【請求項 2 3】

投与されると個体においてXMRVに対する免疫応答を誘導する薬剤の有効量を個体に投与することを含む、XMRVに対する免疫応答をその必要がある個体に誘導する方法。

【請求項 2 4】

該薬剤が、XMRVのサブユニットおよび弱毒化XMRVからなる群より選択される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

XMRVを阻害する薬剤の有効量を個体に投与することを含む、XMRVが前立腺に存在する個体における前立腺癌の処置方法。

30

【請求項 2 6】

個体内のXMRVの存在を検出することを含み、個体内のXMRVの存在は個体内の初期段階の前立腺癌を示す、XMRVが前立腺に存在する個体における無症候性(初期段階)の前立腺癌の検出方法。

【請求項 2 7】

XMRVが個体に存在するかどうかを測定する工程を含み、ここで、XMRVが個体に存在する場合、個体は前立腺癌を発症するリスクがある、前立腺癌を発症するリスクがある個体の同定方法。

【請求項 2 8】

個体が、RNアーゼL遺伝子をコードする遺伝性前立腺癌-1(HCP1)対立遺伝子に変異を有する、請求項 2 7 記載の方法。

40

【請求項 2 9】

変異がホモ接合変異である、請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

変異が、RNアーゼL変異R462Qについてホモ接合である、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

試料中のXMRVを検出する標識された部分を含む、試料中のXMRVの存在を検出するためのキット。

【請求項 3 2】

標識された部分が、XMRV核酸配列の全体または一部にハイブリダイズする核酸配列である、請求項 3 1 記載のキット。

50

【請求項 3 3】

標識された部分が、XMRVに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、請求項31記載のキット。

【請求項 3 4】

XMRVが作製される条件下で、請求項14記載の細胞を維持することを含む、XMRVの作製方法。

【請求項 3 5】

該細胞によって產生されるXMRVを単離することを含む、請求項33記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】****(関連出願)**

本出願は、2005年4月7日に出願された米国特許仮出願第60/669,473号および2005年12月19日に出願された米国特許仮出願第60/751,809号の利益を主張する。上記の出願の全教示は、参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】**(米国政府補助)**

本発明は、全体または一部において、米国立衛生研究所からの助成金NIH/NCI R01CA103943-01により補助された。米国政府は、本発明において一部権利を有する。

20

【0 0 0 3】**(発明の背景)**

性感染する疾患は、ここ30年間で増加している。かかる疾患は癌(例えば、前立腺癌)と関連している。前立腺の癌は、アメリカ人男性の癌での死亡の原因の第2位であり、最もよく見られる内臓の癌である(Kumar, V., et al., S. L. (1997) in Basic Pathology, 6th ed., pp. 584-588, W. B. Saunders Co., Philadelphia Kumar et al., 1997)。米国の人口のうち、アフリカ系アメリカ人は最も高いリスクを有する。米国癌協会は、2003年では米国において約190,000件の新たな例および30,000件の前立腺癌による死亡があったと推定した。遺伝学、加齢、ホルモンおよび環境的リスクファクターはすべて、前立腺癌の病因に役割を果たす(Nelson WG., et al., N Engl J Med, 349(4):366-81, 2003)。

30

【0 0 0 4】

かかる癌の改善された検出および処置方法の必要が存在する。

【0 0 0 5】**(発明の概要)**

本発明は、個体において癌を引き起こし得る単離された異種栄養性マウス白血病ウイルス(MLV)関連ウイルス(XMRV)に関する。すなわち、個体における癌の病因は、個体におけるXMRVの存在と関連し得る。

【0 0 0 6】

1つの態様において、本発明は、個体の前立腺腫瘍内に存在する単離されたXMRVに関する。特定の態様では、XMRVは、ヒト異種栄養性ウイルス(HXV)である。個体は、RNアーゼL遺伝子をコードする遺伝性前立腺癌-1(HPC1)対立遺伝子に変異を有し得る。特に、(In a particular)、変異は、ホモ接合変異(例えば、RNアーゼL変異R462Qに対してホモ接合)である。

40

【0 0 0 7】

1つの態様において、単離されたウイルスは、配列番号:1およびその相補配列と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列を含む。特定の態様では、単離されたウイルスは配列番号:1またはその相補配列を含む。

【0 0 0 8】

別の態様において、本発明は、配列番号:1と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列にコードされたアミノ酸配列を含む単離されたウイルスに関する。例えば、単離されたウ

50

イルスは、配列番号:1にコードされたアミノ酸配列を含み得る。

【0009】

本発明はまた、単離されたペプチドに関する。1つの態様において、本発明は、配列番号:2を含む単離されたウイルスに関する。特定の態様において、単離されたポリペプチドは、配列番号:3と少なくとも97%の類似性を有するアミノ酸配列、配列番号:4と少なくとも97%の類似性を有するアミノ酸配列および／または配列番号:5と少なくとも94%の類似性を有するアミノ酸配列を含む。

【0010】

本発明はまた、本明細書に記載の1つ以上の核酸配列を含むベクターに関する。本発明は、さらに、該ベクターを含む細胞を包含する。また、本発明は、XMRVの作製方法を含む。1つの態様において、該方法は、XMRVでトランスフェクトまたは感染させた細胞を維持する工程を含む。該方法は、該細胞によって產生されたXMRVを単離する(例えば、細胞上澄から)工程をさらに含み得る。

10

【0011】

また、配列番号:1と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含むウイルスに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が本発明に包含される。該抗体または抗原結合断片は、ウイルスのgagポリペプチド(例えば、配列番号:3)、pro-pol ペプチド(例えば、配列番号:4)および／またはenvポリペプチド(例えば、配列番号:5)に結合し得る。

20

【0012】

本発明はまた、XMRVの検出方法に関する。1つの態様において、個体におけるXMRVの検出は、個体が癌を有するか、または癌(例えば、前立腺癌)を発症するリスクがあることを示す。該方法は、

XMRVの全体または一部(例えば、配列番号:1と少なくとも94%の同一性を有する核酸配列またはその相補配列)をコードする核酸配列を検出することにより、個体におけるXMRVを検出する工程を含み得る。あるいは、該方法は、XMRVにコードされるポリペプチド(例えば、gagポリペプチド、polポリペプチド、envポリペプチドおよびその組合せ)を検出することにより、個体におけるXMRVを検出する工程を含み得る。

30

【0013】

別の態様において、本発明は、核酸配列とXMRV核酸配列間でハイブリダイゼーション複合体が生じ得る条件下で、試料を、XMRV核酸配列の全体または一部にハイブリダイズする核酸配列と接触させる工程を含む、試料中のXMRVの検出方法に関する。試料中にハイブリダイゼーション複合体が存在するかどうかを測定し、このとき、ハイブリダイゼーション複合体が検出される場合は、XMRVが試料中にある。

【0014】

別の態様において、本発明は、抗体とXMRVポリペプチド間で複合体が生じ得る条件下で、試料を、XMRVポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程を含む、試料中のXMRVの検出方法に関する。試料中に複合体が存在するかどうかを測定し、このとき、複合体が検出される場合は、XMRVが試料中にある。

40

【0015】

本発明はまた、XMRVを、評価する薬剤と接触させる工程を含む、XMRVを阻害する薬剤の同定方法に関する。該薬剤の存在下でXMRVが阻害されるかどうかを測定し、このとき、該薬剤の存在下でXMRVが阻害される場合、該薬剤はXMRVを阻害する。特定の態様では、該薬剤の存在下でXMRVの活性が、逆転写酵素活性によってレトロウイルス粒子を作製するXMRVの能力を測定することによりを測定する。

【0016】

XMRVに対する免疫応答をその必要がある個体に誘導する方法もまた本発明に包含される。該方法は、投与されると、個体のXMRVに対する免疫応答を誘導する薬剤の有効量を個体に投与することを含み得る。該薬剤は、XMRVのサブユニット、弱毒化XMRVおよびその組合せであり得る。

50

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、XMRVを阻害する薬剤の有効量を個体に投与することを含む、腫瘍内などの個体内にXMRVが存在する個体における癌(例えば、前立腺癌)の処置方法に関する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、個体内のXMRVの存在を検出することを含み、個体におけるXMRVの存在は個体における初期段階の前立腺癌を示す、個体の前立腺内にXMRVが存在する個体における無症候性(初期段階の)癌(例えば、初期段階の前立腺癌)の検出方法に関する。

【 0 0 1 9 】

また、個体においてXMRVの存在を検出することを含み、個体におけるXMRVの存在は、前立腺癌を発症するリスクがある個体を示す、癌(例えば、前立腺癌)を発症するリスクがある個体の同定方法が本発明に包含される。本発明はまた、試料中のXMRVの存在を検出するためのキットに関する。1つの態様において、キットは、試料中のXMRV(例えば、XMRV核酸配列の全体または一部とハイブリダイズする核酸配列；XMRVに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片)を検出する標識された部分を含む。10

【 0 0 2 0 】

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面(1つまたは複数)を含むこの特許または特許出願公開公報の複写は、請求および必要な費用の支払いにより、特許庁より提供される。

【 0 0 2 1 】**(発明の詳細な説明)**

本明細書に記載のように、前立腺腫瘍生物学における抗ウイルス酵素RNアーゼLの役割を調べた。前立腺切除が予定された150名の前立腺癌患者を、RNアーゼL (R462Q)における最も一般的な生殖細胞系変異について遺伝子型分類する臨床試験を行なった。前立腺組織から単離したRNAを、ウイルス配列の包括的DNAマイクロアレイであるVirochipsでの解析のために処理した。マウス白血病ウイルスの異種栄養性株と関連する新規なガンマレトロウイルス(本明細書において異種栄養性マウス白血病ウイルス(MLV)関連ウイルス(XMRV)という)を、RNアーゼL変異についてホモ接合である患者から同定し、クローニングした。特定の態様では、XMRVはヒト異種栄養性ウイルス(HXV)である。前立腺のHXV感染は、RNアーゼL変異R462Qについてホモ接合である患者(約60%発症率)に共通していたが、ヘテロ接合およびホモ接合野生型患者では比較的まれであった(10%以下の発症率)。インサイチュ方法で、前立腺においてHXV核酸の存在が確認された。20

【 0 0 2 2 】

したがって、本発明は、XMRVのアミノ酸配列を含むXMRV単離ポリペプチドをコードする単離された核酸配列；ウイルス核酸配列を含むベクター；該ベクターを含む細胞；XMRVに対する結合特異性を有する抗体およびその抗原結合断片；XMRVの作製方法；XMRVの検出もしくはスクリーニング方法(例えば、個体において)；XMRVを阻害する薬剤の同定方法；XMRVに対する免疫応答の誘導方法；個体におけるXMRVの存在と関連する疾患(例えば、前立腺癌などの癌)の処置方法；無症候性癌(例えば、前立腺癌)の検出方法；癌(例えば、前立腺癌)を発症するリスクがある個体の同定方法；ならびにXMRVを検出するためのキットを提供する。30

【 0 0 2 3 】

前立腺の癌は、アメリカ人男性の癌での死亡の原因の第2位であり、最もよく見られる内臓の癌である(Kumar, V., et al., Basic Pathology, 6th ed., pp. 584-588, W. B. Saunders Co., Philadelphia)。米国の人口のうち、アフリカ系アメリカ人は最も高いリスクを有する。米国癌協会は、2003年では米国において約190,000件の新たな例および30,000件の前立腺癌による死亡があったと推定した。遺伝学、加齢、ホルモンおよび環境的リスクファクターはすべて、前立腺癌の病因に役割を果たす(Nelson WG., et al., N Engl J Med, 349(4):366-81, 2003)。注目すべきことには、3人以上の前立腺癌の1親等を有する男性は、該疾患の家族歴を有しない男性と比べ、11倍増加したリスクを有する(Steinberg GD., et al., Prostate, 17(4):337-47, 1990)。分離比分析は、早期発症を伴う遺40

10

20

30

40

50

伝性前立腺癌(HPC)における稀な常染色体優性、高度に浸透性の遺伝子(1つまたは複数)の存在を支持する(Carter BS., et al., Proc Natl Acad Sci, 89(8):3367-71, 1992)。いくつかの異なるHPC遺伝子が、集合的に前立腺癌の早期発症(55歳以下)疾患の約43%および全症例の9%を占めると予測される。これらの遺伝性前立腺癌感受性遺伝子は、正常な前立腺上皮の増殖性炎症性萎縮(PIA)への進行中に、分子的前立腺癌病因の初期段階で機能すると考えられる(Nelson WG., et al., N Engl J Med, 349(4):366-81, 2003)。慢性または再発性微生物感染は、PIAの初期事象において疑われる。PIA病変は、今度は、前立腺上皮内新形成(PIN)の前駆体となり得、何年後かに顕性癌腫をもたらし、最終的に転移性癌となる。前立腺は、他者により、ヒトBKポリオーマウイルス(Das D., et al., Oncogene, 23(42):7031-46, 2004)およびHPV (Zambrano A., et al., Prostate, 53(4):263-76, 2002)を含む多くのウイルス感染の常在臓器であると示されている。また、大規模な患者対照研究は、前立腺癌の頻度と性感染疾患の病歴との関連性を示した(Hayes RB., et al., Br J Cancer, 82(3):718-25, 2000)。興味深いことに、5つの候補前立腺癌感受性対立遺伝子が免疫および/または炎症において機能する(HPC1/RNASEL、TLR4、MIC-1、MSR-1およびPON1)(Carpten, J., et al., Nature Genetics 30:181-4, 2002 ; Zheng SL., et al., Cancer Res. 64(8):2918-22, 2004 ; Lindmark F., et al., J Natl Cancer Inst. 96(16):1248-54, 2004 ; Xu, J., et al., Nat. Genet. 32(2):321-5, 2002 ; Marchesani M., et al., J Natl Cancer Inst. 95(11):812-8, 2003)。

【0024】

該遺伝子ファミリーの基本型であるHPC1は、1996年に染色体1q24-25 (Smith et al., 1996)および2002年に1q25のRNASEL遺伝子(Carpten, J., et al., Nature Genetics 30:181-4, 2002)に連鎖された。HPC1/RNASELは、インターフェロン(IFN)抗ウイルス応答において機能する調節されたヌクレアーゼであるRNアーゼLをコードする(Clemens MJ, et al., Cell 13(3):565-72, 1979 ; Zhou A., et al., Cell 72(5):753-65, 1993 ; Hassel BA, et al., EMBO J. 12(8):3297-304, 1993)。細胞のIFN処理は、二本鎖RNAによって刺激され、ATPをPPiに変換し、集合的に2'-5'Aと呼ばれる一連の短鎖2'から5'に連結されたオリゴアデニレートである2'-5'Aシンセターゼのファミリーを誘導する(Kerr IM, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 75(1):25660, 1978)。(図1)。2'-5'Aの唯一充分に確立された機能は、コクサッキーウィルスを含むある種のウイルスの複製の阻害をもたらすRNアーゼLの活性化である(Flodstrom-Tullberg, M., et al., J. Immunol, 174, 1171-1177, 2005)。2'-5'A結合すると、RNアーゼLは、不活性なモノマーから活性なダイマーに変換される(Dong B., et al., J Biol Chem. 270(8):4133-7, 1995)。2'-5'A結合によるRNアーゼLの持続される活性化は、28Sおよび18S rRNAの切断ならびにカスパーーゼ依存性アポトーシスをもたらす(Rusch L., et al., J Interferon Cytokine Res. 20(12): 1091-100, 2000)。RNアーゼL媒介性アポトーシスは、ミトコンドリアからのシトクロムC放出によって行なわれ、JNKおよびカスパーーゼ-3活性を必要とする(Iordanov MS, et al., Mol Cell Biol. 20(2):617-27, 2000)；Li G., et al., J Biol Chem. 279(2):1123-31, 2004 ; Malathi K., et al., Cancer Res. 64(24):9144-51, 2004)。以前に、2'-5'AによるRNアーゼLの活性化が後期ヒト前立腺癌細胞株のアポトーシスをもたらすが、RNASELにおける天然の変異は細胞生存を可能にすることが示された(Xiang Y., et al., Cancer Res. 63(20):6795-801, 2003)。遺伝性前立腺癌におけるRNASEL/HPC1の関与は、異なる変異(M11、E265X、471 AAAGおよびR462Q)の同定ならびに疾患発症および/または頻度との関連によって支持される(Carpten, et al., Nature Genetics 30: 181-4, 2002 ; Rokman A., et al., Am J Hum Genet. 70(5): 1299-304, 2002 ; Rennert H., et al., Am J Hum Genet. 71 (4):981-4, 2002 ; Casey, G., et al., Nat Genet. 32(4):581-3, 2002 ; Silverman, R.H., Biochemistry 72, 25;42(7): 1805-12., 2003)(図2)。HPCにおけるRNASELの役割に関する機能的または疫学的データは、すべてではないがほとんどの研究で観察された(Downing SR., et al., Clin Prostate Cancer 2:177-80, 2003 ; Kotar K., et al., J Med Genet 40: e22, 2003)。

【0025】

最近、RNASELのR462Q変異型が、非選択(家族性および非家族性の両方を含む)前立腺癌

10

20

30

40

50

症例に関与していた(Casey G., et al., Nat Genet. 32(4):581-3, 2002)。興味深いことに、RNアーゼLのR462Q変異型は、インビトロで約3倍低減された触媒活性を有した。RNアーゼL R462Qの低減されたリボヌクレアーゼ活性は、二量体化して該酵素の活性形態になる能力の減少による(Xiang Y., et al., Cancer Res. 63(20):6795-80, 2003)。423の非選択前立腺癌症例および454の非罹患同胞コントロールから単離したDNAにおいて、拡張された研究を行なった(Casey G., et al., Nat Genet. 32(4):581-3, 2002)。該症例とのR462Q変異型の有意な関連が観察された($P=0.011$)。この確率比は、1コピーのR462Q変異型遺伝子を有することは、前立腺癌のリスクを約1.5倍増大させるが、2つの変異型対立遺伝子を有することはリスクを倍増させることを示した。他方、RNアーゼLの別の変異型であるD541Eは、前立腺癌のリスクの増大と関連せず、RNアーゼL活性に影響しなかった。結果は、症例の13%までにR462Qを示し、これは、前立腺癌の(およびもしかすると、任意の一般的な癌の)最も有力な遺伝子マーカーとなる。したがって、R462Qは、一般的な男性集団における前立腺癌の重要なリスクマーカーであり得る。

10

【0026】

本明細書に記載のように、腫瘍を有する前立腺においてウイルスが同定され、異なるRNASEL遺伝子型を有する男性におけるウイルス頻度と比較した。RNアーゼLにおける変異の不活性化は比較的まれであるため、試験は、ミスセンス変異型R462Qに焦点をあてた。伝統的なウイルス検出法は、いくつかのウイルスは細胞培養物中で増殖しないこと、マルチプレックスPCRによって同時に増幅され得るDNA配列の数、抗体利用可能性およびウイルス血清型の進化が制限されることを含む、いくつかの欠点を有する。したがって、特定のウイルスと前立腺癌との関連を決定するため、UCSFでDeRisi博士およびGanem博士によって開発されたウイルス病原体の遺伝子型分類のために、マイクロアレイ系検出法(Virochip)を使用した(Wang D., et al., Proc Natl Acad Sci USA. 99(24): 15687-92, 2002; Wang D., et al., Biol. i(2):E2. Epub, 2003)。これらのマイクロアレイは、数百の異なる型のウイルスを検出し、同定し得る長鎖の(70量体)オリゴヌクレオチドを含む。該アレイは、ウイルス核酸内で高度に保存された配列を含むため、明白に提示されないウイルスが検出され得る。マウス白血病ウイルスの異種栄養性株と関連する新規なガンマレトロウイルス(本明細書において、異種栄養性マウス白血病ウイルス(MLV)関連ウイルス(XMRV)という)を、RNアーゼL変異についてホモ接合である患者から同定し、クローニングした。

20

【0027】

したがって、本発明は、単離された、または組換え異種栄養性マウス白血病ウイルス(MLV)関連ウイルス(XMRV)を提供する。本発明はまた、単離された、または組換えXMRVプロウイルスおよびレトロウイルス粒子(例えば、XMRVに感染させた細胞によって產生される)に関する。1つの態様において、XMRVウイルスは、単離された、または組換えヒト異種栄養性ウイルス(HXV)である。

30

【0028】

本発明は、A.T.C.C, 10801 University Boulevard, Manassass, VA, 02110-2209に2005年3月30日に、A.T.C.C.番号_____で寄託されたウイルスまたはこれに由来するウイルスを具体化する。A.T.C.C.に寄託されたウイルスは、動物(ヒト)のLNCaPクローンから単離されたHuman Xenotropic Virus (HXV)-LNCaP (HXV-LN)と指定される。HXVは、マウス白血病ウイルス(MLV)に関連するレトロウイルス(ガンマ)であり、gagは、ウエスタンプロット上でローシャーMLV P30 抗体(A.T.C.C. 受託番号VR-15645A-Gt)と反応する。本明細書に示すように、ウイルスは、細胞株LNCaP (A.T.C.C. 受託番号CRL-1740)およびDU145 (A.T.C.C. 受託番号HTB-81)において増殖させ得る。細胞株培地およびウイルスが増殖され得る細胞株の増殖のための条件としては、0-グルコース2.0g/L、グルタミン(2.05mM)300mg/L、ピリドキシンHCl 1.0mg/L、重炭酸ナトリウム2g/L、ウシ胎児血清(熱不活化)10%、PEN/STREP 200単位を含むRPMI 1640、空気95%:CO₂ 5%、37℃が挙げられる。感染細胞(例えば、LNCaP細胞)の上澄液を、(例えば、12,000gで15分間)遠心分離した後、濾過(例えば、2つの連続する0.2μmフィルターにより)し得る。

40

【0029】

50

核酸分子

本発明は、単離されたXMRV核酸分子を提供する。「XMRV核酸分子」により、XMRVポリペプチドをコードする核酸分子が意図される。かかる核酸分子としては、例えば、本明細書に詳細に記載するXRMV核酸分子；配列番号:1を含む単離された核酸；配列番号:1を含む単離された核酸の相補配列；配列番号:2のXRMVポリペプチドをコードする単離された核酸；配列番号:2のXRMVポリペプチドをコードする単離された核酸の相補配列；高ストリンジエンシー条件下で配列番号:1をコードする核酸分子またはその相補配列にハイブリダイズ可能な核酸；高ストリンジエンシー条件下で配列番号:1を含む核酸にハイブリダイズ可能な核酸分子；および配列番号:1のすべてまたは一部と少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%配列同一性を有する単離された核酸分子またはその相補配列が挙げられる。1つの態様において、同一性割合は、XMRV核酸分子の全長(例えば、配列番号:1の全長)にわたって決定される。別の態様において、同一性割合は、XMRV核酸分子の一部(例えば、XMRVのgag、pro-polおよび/またはenvポリペプチドをコードする部分)にわたって決定される。例えば、単離された核酸分子は、XMRVの配列番号:1のpolポリペプチドをコードする部分(例えば、配列番号:4)と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有し得る。

10

【0030】

本発明の単離された核酸分子は、RNA、例えば、mRNA、またはcDNAなどのDNAであり得る。DNA分子は二本鎖または单鎖であり得る；单鎖RNAまたは单鎖DNAは、コード(センス)または非コード(アンチセンス)鎖のいずれかであり得る。核酸分子は、遺伝子のコード配列のすべてまたは一部を含み得、イントロンならびに非コード3'および5'配列(例えば、調節配列を含む)などのさらなる非コード配列をさらに含み得る。さらに、核酸分子は、マーカー配列、例えば、ポリペプチドの単離または精製を補助するポリペプチドをコードする配列と融合させ得る。かかる配列としては、限定されないが、FLAG標識、ならびにグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質をコードする配列およびインフルエンザ由来の血球凝集素A(HA)ポリペプチドマーカーをコードするものが挙げられる。

20

【0031】

本明細書で使用される「単離された」、「実質的に純粋な」または「実質的に純粋で単離された」核酸分子は、通常、遺伝子もしくはヌクレオチド配列と隣接する核酸(ゲノム配列のように)から分離されたもの、および/または他の転写配列から完全に、もしくは一部精製されたもの(例えば、RNAもしくはcDNAライブラリーのように)である。例えば、本発明の単離された核酸は、これが天然に生じる複雑な細胞環境、または組換え技術によって作製される場合は培養培地、または化学的に合成される場合は化学的前駆体もしくは他の化学物質に関して実質的に単離され得る。ある場合において、単離された物質は、組成物(例えば、他の物質を含む粗抽出物)、バッファー系または試薬混合物の一部を形成する。他の環境において、該物質は、例えば、アガロースゲル電気泳動またはHPLCなどのカラムクロマトグラフィーによって測定したとき、本質的に均質になるまで精製され得る。好ましくは、単離された核酸分子は、存在するすべての巨大分子種の少なくとも約50%、80%、90%、95%、98%または99%(モルベースで)を構成する。

30

【0032】

XMRV核酸分子は、他のコード配列または調節配列と融合させ得、なお単離されたとみなされ得る。したがって、ベクターに含まれる組換えDNAは、本明細書で使用される「単離された」の定義に含まれる。また、単離された核酸分子は、異種宿主細胞内の組換えDNA分子、ならびに溶液中の部分的または実質的に精製されたDNA分子を含む。「単離された」核酸分子はまた、本発明のDNA分子のインビオおよびインビトロRNA転写物を包含する。化学的または組換え手段によって合成された単離された核酸分子またはヌクレオチド配列は、核酸分子またはヌクレオチド配列を含み得る。したがって、ベクターに含まれる組換えDNAは、本明細書で使用される「単離された」の定義に含まれる。

40

【0033】

50

単離されたヌクレオチド分子はまた、異種生物内の組換えDNA分子、ならびに溶液中の部分的または実質的に精製されたDNA分子を含む。本発明のDNA分子のインビオおよびインビトRNA転写物もまた、「単離された」ヌクレオチド配列に包含される。かかる単離されたヌクレオチド配列は、コードポリペプチドの製造において、相同配列を単離するため(例えば、他の哺乳動物種から)またはノザンプロット解析などによって組織(例えば、ヒト組織)内の遺伝子の発現を検出するためのプローブとして有用である。

【0034】

本発明はまた、必ずしも天然に見られないが、XMRVポリペプチドをコードする変異型XMRV核酸分子に関する。したがって、例えば、天然のXRMVヌクレオチド配列と異なる配列を含むが、遺伝子コードの縮重により、本発明のXMRVポリペプチドをコードするDNA分子もまた本発明の主題である。

10

【0035】

本発明はまた、XMRVヌクレオチド配列コード部分(断片)、またはXMRVポリペプチドのアナログもしくは誘導体などのコード変異型ポリペプチドを包含する。1つの態様において、XMRVヌクレオチド配列の断片は配列番号:6を含む。かかる変異型は、対立遺伝子変化もしくは單一ヌクレオチド多型の場合などのように天然に生じ得るか、または種々の変異原および変異原性プロセスによって誘導されるものなどのように天然に生じ得ない。意図される変化としては、限定されないが、付加および欠失を含む同類または非同類アミノ酸変化をもたらし得る1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失および置換が挙げられる。好ましくは、XMRVヌクレオチド(および/または生じるアミノ酸)変化は、サイレントまたは保存される; すなわち、XMRVポリペプチドの特徴または活性を改変しない。

20

【0036】

本発明のXMRV核酸分子の他の改変としては、例えば、標識、メチル化、非電荷結合(例えば、メチルホスホン酸塩、リン酸トリエステル、ホスホアミデートおよびカルバメート)などのヌクレオチド間修飾、電荷結合(例えば、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート)、懸垂部分(例えば、ポリペプチド)、インターラーカー(例えば、アクリジンまたはソラレン)、キレート形成体、アルキル形成体(alkylator)、および修飾結合(例えば、アノマー核酸)が挙げられ得る。

30

【0037】

本発明はまた、選択的ハイブリダイゼーションのような高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で本明細書に記載されるヌクレオチド配列(例えば、本明細書に記載されるXMRVポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズする核酸分子、および任意にXMRVポリペプチドの活性を有する核酸分子)にハイブリダイズするXMRV核酸分子に関する。1つの態様において、本発明は、高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件(例えば、選択的ハイブリダイゼーションについて)下で配列番号1のヌクレオチド配列および配列番号1の相補物を含むヌクレオチド配列にハイブリダイズする本明細書に記載されるバリアントを含む。別の態様において、本発明は、高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件(例えば、選択的ハイブリダイゼーションについて)下で配列番号2のアミノ配列をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズする本明細書に記載されるバリアントを含む。好ましい態様において、高いストリンジェンシーハイブリダイゼーションの下でハイブリダイズするバリアントはXMRVポリペプチドの生物学的活性(例えば、前立腺組織に感染する能力)を有するポリペプチドをコードする。

40

【0038】

XMRVの活性は、細胞(例えば、前立腺細胞)に感染し、プロウイルスを生成し、かつレトロウイルス粒子を生成する能力を含む。

【0039】

かかる核酸分子は特異的なハイブリダイゼーション(例えば、高いストリンジェンシーサイド)によって検出および/または単離され得る。ハイブリダイゼーションについて「ストリンジェンシーサイド」は、特定の核酸の第二の核酸へのハイブリダイゼーションを可能

50

にする；第一の核酸分子は第二と完全に（すなわち、100%）相補的であり得るか、あるいは第一および第二は完全より低いある程度の相補性（例えば、約または少なくとも70%、75%、85%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）を共有し得る、インキュベーションおよび洗浄条件、例えば、温度およびバッファ濃度の条件を指す技術用語である。例えば、完全に相補的な核酸をより低い相補性のものと区別する特定の高いストリンジエンシー条件が使用され得る。核酸ハイブリダイゼーションについて「高いストリンジエンシー条件」、「中程度のストリンジエンシー条件」および「低いストリンジエンシー条件」は、Molecular BiologyのCurrent Protocolsに説明される（Ausubelら、上掲を参照、全教示は参照によって本明細書に援用される）。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する正確な条件は、イオン強度（例えば、0.2XSSCまたは0.1XSSC）、温度（例えば、室温、42または68）、およびホルムアミドのような脱安定剤またはSDSのような変性剤の濃度だけでなく、核酸配列の長さ、塩基組成、ハイブリダイズする配列間のミスマッチ割合、および他の同一でない配列内での配列の部分集合の発生頻度のような因子に依存する。従って、2つの核酸分子間で同程度の同一性または類似性を維持しながら同等な条件がこれらのパラメーターの1つ以上を変更することで決定され得る。典型的に、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%以上互いに同一な配列が互いにハイブリダイズしたままである、条件が使用される。ハイブリダイゼーションが生じないストリンジエンシーレベルからハイブリダイゼーションが最初に観察されるレベルまでハイブリダイゼーション条件を変化することで、所定の配列が試料中の最も類似する配列と（例えば、選択的に）ハイブリダイズすることを可能にする条件が決定され得る。

【0040】

例示的なハイブリダイゼーション条件は、KrauseおよびAaronson, Methods in Enzymology, 200:546-556(1991)、ならびにAusubelら、上掲にも記載され、中程度または低いストリンジエンシー条件について洗浄条件の決定を記載する。洗浄は、条件が最小レベルのハイブリッド相補性を決定するように通常設定される工程である。一般に、相同なハイブリダイゼーションだけが生じる一番低い温度から開始して、（SSC濃度を一定に保ちながら）減少される最終洗浄温度の各々はハイブリダイズする配列の中で最大程度のミスマッチにおいて1%の増大を可能にする。一般に、SSC濃度を2倍にすることで17のT_m增加となる。これらのガイドラインを用いて、洗浄温度は、探し出されたミスマッチのレベルに依存して、高い、中程度、または低いストリンジエンシーについて経験的に決定され得る。

【0041】

例えば、低いストリンジエンシー洗浄は、0.2XSSC/0.1% SDSを含む溶液中室温で10分間洗浄することを含み得；中程度のストリンジエンシー洗浄は、0.2XSSC/0.1% SDSを含む予め温めた（42）溶液中42で15分間洗浄することを含み得；および高いストリンジエンシー洗浄は、0.1XSSC/0.1% SDSを含む予め温めた（68）溶液中68で15分間洗浄することを含み得る。さらに、洗浄は当該分野で公知のような所望の結果を得るために繰り返してまたは連続的に実施され得る。同等の条件は、使用される標的核酸分子およびプライマーまたはプローブの間で同程度の同一性または類似性を維持しながら、実施例として提示する1つ以上のパラメーターを当該分野で公知のように変化させることで決定され得る。

【0042】

本発明はまた、高いストリンジエント条件下で配列番号1および配列番号1の相補物から選択されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列とハイブリダイズする断片または部分を含む単離されたXMRV核酸分子を提供し、高いストリンジエント条件下で配列番号2から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズする断片または部分を含む単離された核酸分子も提供する。本発明の核酸断片は少なくとも約15、好みしくは少なくとも約18、20、23、または25ヌクレオチドであり、30、40、50、100、200以上のヌクレオチド長であり得る。例えば、30以上のヌクレオチド長であり、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドをコードする断片が、本明細書に記載される抗体の生成等について特に有用である。

【 0 0 4 3 】

関連する局面において、本発明のXMRV核酸断片は本明細書に記載されるようなアッセイのプローブまたはプライマーとして使用される。「プローブ」または「プライマー」は、塩基特異的な様式で核酸分子の相補鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。かかるプローブおよびプライマーは、Nielsenら, *Science*, 254, 1497-1500(1991)に記載されるようなポリペプチド核酸を含む。本明細書でも使用される場合、用語「プライマー」とは具体的に、限定されないが、本明細書に記載されるものを含む周知の方法（例えば、PCR、LCR）を用いた錆型指向DNA合成の開始点として作用する単一鎖オリゴヌクレオチドのことをいう。

【 0 0 4 4 】

典型的に、プローブまたはプライマーは、少なくとも約15、典型的に約20～25、より典型的に約40、50または75の、配列番号1、配列番号1の相補物、および配列番号2のアミノ酸配列をコードする配列から選択される連續的なヌクレオチド配列を含む核酸分子の連續的なヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【 0 0 4 5 】

好ましい態様において、プローブまたはプライマーは、100以下のヌクレオチド、好ましくは6～50のヌクレオチド、より好ましくは12～30のヌクレオチドを含む。他の態様において、プローブまたはプライマーは、連續的なヌクレオチド配列もしくは連續的なヌクレオチド配列の相補物と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%同一であるか、あるいは連續的なヌクレオチド配列もしくは連續的なヌクレオチド配列の相補物と選択的にハイブリダイズさえし得る。しばしば、プローブまたはプライマーは、標識、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補助因子をさらに含む。

【 0 0 4 6 】

上記のような本発明の核酸分子は、標準の分子生物学的技術ならびに配列番号1、および/または配列番号2に提供される配列情報を用いて同定および単離され得る。例えば、核酸分子は、上記に提供される核酸配列および/またはこれらの配列の相補物の、1つ以上の核酸配列を基にして設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応によって増幅および単離され得る。あるいは、かかる核酸分子は配列番号2に提供されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を基にして設計され得る。PCR技術：*Principles and Applications for DNA Amplification*(編H.A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, (1992); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*(編Innisら, Academic Press, San Diego, CA, (1990); Mattilaら, *Nucleic Acids Res.*, 19:4967(1991); Eckertら, *PCR Methods and Applications*, 1:17(1991); PCR(編McPhersonら, IRL Press, Oxford)); および米国特許第4,683,202号を一般に参照。核酸分子は錆型としてcDNA、mRNA、またはゲノムDNAを用いて増幅され得、適切なベクターにクローニングされ得、DNA配列分析で特徴付けられ得る。

【 0 0 4 7 】

適切な増幅方法は、リガーゼ連鎖反応(LCR)(WuおよびWallace, *Genomics*, 4:560(1989);ならびにLandegrenら, *Science*, 241:1077(1988)を参照)、転写増幅(Kwohら, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 86:1173(1989))、ならびに自己持続性配列複製(Guatelliら, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 87:1874(1990)を参照)ならびに核酸ベース配列増幅(NASBA)を含む。後者の2つの増幅方法は、増幅産物として单鎖RNA(ssRNA)および二本鎖DNA(dsDNA)の両方をそれぞれ約30～100対1の割合で生成する、等温転写に基づく等温反応を含む。

【 0 0 4 8 】

増幅DNAは放射性同位元素で標識され得、例えば、ヒト細胞または任意の他の所望の細胞型由来のcDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いられ得る。対応するクローンが単離され得、インビボ切除に続いてDNAが取得され得、クローン挿入物が当該分野で認知される方法によっていずれかまたは両方の方向で配列決定され、適切な分子量のポリペプチドをコードする正しいリーディングフレームを同定し得る。例えば

、本発明の核酸分子のヌクレオチド配列の直接分析は市販で入手可能な周知の方法を用いて達成され得る。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版, CSHL, New York(1989));およびZyskindら, Recombinant DNA Laboratory Manual, (Acad. Press, (1988))を参照。これらのまたは同様の方法を用いて、ポリペプチドおよびポリペプチドをコードするDNAは、単離され、配列決定され、さらに特徴付けされ得る。

【0049】

本発明の核酸分子のアンチセンスRNAおよび干渉RNA(例えば、siRNA; shRNA)は、配列番号1のヌクレオチド配列、および/または配列番号1の相補物、および/またはこれらの配列の部分、および/またはこれらの部分もしくは配列の相補物、および/または配列番号2のアミノ酸配列をコードする配列、もしくは配列番号2の部分をコードする配列を用いて設計され得る。方法はポリヌクレオチドの相補的DNAまたはRNAへの結合に基づく。

10

【0050】

本発明のアンチセンスRNAまたは干渉RNAは、インフォマティブな遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含む。絶対的な相補性は、好ましいが、必要とされない。本明細書で指す「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし得る十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味する。ハイブリダイズする能力は、RNA配列の相補性の程度および長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が大きくなるほど、RNAとのより多くの塩基ミスマッチを含み得、さらに安定な二重鎖を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定する標準の手順を使用することで寛容な程度のミスマッチを確かめることができる。

20

【0051】

一般に、本発明の単離されたXMRV核酸配列は相同的なウイルス配列を同定し、個体または試料中のXMRVを検出するために使用され得る。本発明の核酸分子は、治療剤としても使用され得る。

【0052】

本発明のXMRV核酸分子は、プライマーを誘導するために、DNA免疫技術を用いて抗ポリペプチド抗体を惹起するために、抗DNA抗体を惹起するためにまたは免疫応答を誘発するための抗原としてさらに使用され得る。本明細書で認められるヌクレオチド配列の一部または断片(および対応する完全な遺伝子配列)は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。本発明のXMRVヌクレオチド配列は、分析、特徴付け、または治療使用のための組換えポリペプチドを同定および発現するためにまたは対応するポリペプチドが組織分化中構成的にあるいは疾患の状態のいずれかで発現される組織用マーカーとして使用され得る。核酸配列は本明細書に記載されるスクリーニングおよび/または診断アッセイの試薬としてさらに使用され得、本明細書に記載されるスクリーニングおよび/または診断アッセイに使用のためのキット(例えば、試薬キット)の構成物としても含まれ得る。

30

【0053】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびDNAハイブリダイゼーションのような標準の技術は、他の種のXMRVホモログ、例えば、哺乳動物ホモログ(例えば、靈長類、ネコ、イヌ、げつ歯類、ヒツジ、ウシホモログ)をクローニングするために使用され得る。XMRVホモログは、XMRVプローブまたはプライマーを用いた低ストリンジェンシーDNAハイブリダイゼーションまたは低ストリンジェンシーPCRを用いて容易に同定され得る。XMRVポリペプチドをコードする縮重プライマーはRT-PCRによってXMRVホモログをクローニングするために使用され得る。

40

【0054】

あるいは、さらなるXMRVホモログが、他の種の類似ポリペプチドを検索するためにXMRVポリペプチドのためのコンセンサス配列情報をを利用して同定され得る。例えば、他の種のポリペプチドデータベースが本明細書に記載されるXMRV核酸分子に特有なXMRVドメインを有するタンパク質について検索され得る。かかるモチーフを含む候補ポリペプチドは次に本明細書に記載される方法を用いてXMRVの生物学的活性を試験され得る。

50

【 0 0 5 5 】**核酸分子の発現**

本発明の別の局面は、XMRV核酸分子、例えば、配列番号1または6、および配列番号1または6（もしくはその部分）のいずれかの相補物からなる群より選択されるものを含む核酸構築物に関する。本発明のなお別の局面は、配列番号2または配列番号2の部分（例えば、配列番号3、4、5）のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むXMRV核酸構築物に関する。構築物は、本発明の配列がセンスまたはアンチセンス方向に挿入されているベクター（例えば、発現ベクター）を含む。

【 0 0 5 6 】

ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、さらなるDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す。ベクターの別の型は、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスベクターである。特定のベクターは、導入される宿主細胞で自律的な複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターである発現ベクターは、作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。一般に、組換えDNA技術における発現ベクターの有用性は、しばしばプラスミドの形態をとる。しかしながら、本発明は、同等な機能として働くウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）等のかかる他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

【 0 0 5 7 】

本発明の好ましい組換え発現ベクターは、宿主細胞で核酸分子の発現に適切な形態の本発明の核酸分子を含む。これは、組換え発現ベクターが発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列に作動可能に連結される1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターの中で、「作動可能に連結される」は、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で（例えば、インビトロの転写／翻訳系またはベクターが宿主細胞に導入される場合の宿主細胞において）目的のヌクレオチド配列が1つまたは複数の調節配列に連結されることを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニレーションシグナル）を含むことを意図する。かかる調節配列は、例えば、GoeddelのGene Expression Technology:Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)において記載されている。調節配列は、多くの宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指向するもの、および特定の宿主細胞のみでヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）を含む。

【 0 0 5 8 】

発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、および所望されるポリペプチドの発現レベルのような因子に依存し得ることが当業者に認められよう。本発明の発現ベクターは、従って本明細書に記載される核酸分子によってコードされる融合ポリペプチドを含むポリペプチドを生成するために宿主細胞に導入され得る。

【 0 0 5 9 】

本発明の組換え発現ベクターは、原核または真核細胞、例えば、E. coliのような細菌細胞、（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドの発現について設計され得る。適切な宿主細胞は上掲のGoeddelにおいてさらに議論されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写および翻訳され得る。

【 0 0 6 0 】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書で相互交換可能に使用されるかかる用語は、特定の被験体細胞だけでなく、かかる細胞の子孫または潜在的な子孫を

10

20

30

40

50

指すことが理解される。特定の修飾は、変異または環境影響のいずれかのために後の世代で生じ得るために、実際に、かかる子孫は親細胞と同一ではあり得ないが、本明細書で使用される用語の範囲になお含まれる。

【0061】

宿主細胞は任意の原核または真核細胞であり得る。例えば、本発明の核酸分子は、細菌細胞（例えば、*E. coli*）、昆虫細胞、酵母、または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）もしくはCOS細胞、ヒト293T細胞、HeLa細胞、NIH3T3細胞、マウス赤白血病（MEL）細胞、LNCaP細胞、およびDU145細胞等）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0062】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核または真核細胞に導入され得る。本明細書で使用される場合、用語「感染」、「形質転換」および「トランスフェクション」は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、宿主細胞に外来の核酸分子（例えば、DNA）を導入するための様々な当該分野の技術を指すことを意図する。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする適切な方法は、Sambrookら（上掲）および他の実験説明書に見出され得る。

【0063】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについて、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、小部分の細胞のみがゲノムに外来DNAを組み込み得ることが公知である。これらの組込体（integrand）を同定および選択するために、選択可能なマーカーをコードする遺伝子（例えば、抗生素質に対する耐性のための）は一般に、目的の遺伝子と共に宿主細胞に導入される。好ましい選択可能なマーカーはG418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートのような薬物に耐性を付与するものが挙げられる。選択可能なマーカーをコードする核酸分子は本発明の核酸分子と同じベクターで宿主細胞に導入され得るか、または別々のベクターで導入され得る。導入される核酸分子を安定的にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を取り込んでいる細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【0064】

培養において原核生物または真核生物宿主細胞のような本発明の宿主細胞は、本発明のXMRVポリペプチドを生成（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を用いてXMRVポリペプチドを生成する方法をさらに提供する。1つの態様において、該方法は、XMRVポリペプチドが生成されるような適切な培地で（本発明のポリペプチドをコードする組換え発現ベクターが導入されている）本発明の宿主細胞を培養する工程を含む。別の態様において、方法は、培地または宿主細胞からポリペプチドを単離する工程をさらに含む。

【0065】

ポリペプチド

本発明は、単離または組換えXMRVポリペプチドおよびその断片、派生物、およびバリアント、ならびに本明細書に記載されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド（例えば、他のバリアント）を特徴とする。本明細書に使用される場合、用語「ポリペプチド」は、特定の長さではなく、アミノ酸のポリマーを指し、従って、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質がポリペプチドの定義に含まれる。

【0066】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドは、細胞性物質が実質的でない場合、組換え細胞もしくは非組換え細胞から単離される場合、または化学合成される場合に化学前駆体もしくは他の化学物質がない場合に、「単離」される、「実質的に純粋」であるまたは「実質的に純粋でかつ単離」されることをいう。さらに、ポリペプチドは細胞で正常に結合しない別のポリペプチドに連結され得（例えば、「融合タンパク質」において）、さらに「単離」されるか、「実質的に純粋」であるかあるいは「実質的に純粋でかつ単離」され

10

20

30

40

50

る。単離されるか、実質的に純粋であるか、あるいは実質的に純粋でかつ単離されるポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるアフィニティー精製技術および本明細書に記載され、かつ当業者に公知の他の技術を用いて得られることができる。

【0067】

「XMRVポリペプチド」とは、XMRVの生物学的活性、例えば、前立腺細胞に感染する能力を有するポリペプチドを意味する。XMRVポリペプチドはまた、その活性がXMRV阻害活性を有する分子によって阻害され得るポリペプチドである。XMRVポリペプチドの例は、BLASTプログラムおよび本明細書に記載されるパラメーターを用いて決定されるように、配列番号2を含有するか、あるいは配列番号2からなる実質的に純粋なポリペプチド、ならびに好ましくは配列番号2に対して少なくとも75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の態様において、XMRVポリペプチドの例は、BLASTプログラムおよび本明細書に記載されるパラメーターを用いて決定されるように、配列番号2を含有するか、あるいは配列番号2からなる実質的に純粋なポリペプチド、ならびに好ましくは配列番号2に対して少なくとも75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%配列類似性を有するポリペプチドを含む。

10

【0068】

本発明のポリペプチドは、均一に精製され得る。しかしながら、ポリペプチドが均一に精製されない調製物は有用であることが理解される。重大な特徴は、調製物が、かなりの量の他の成分の存在下でもポリペプチドの所望の機能を可能にするということである。従って、本発明は、種々の程度の純度を含む。1つの態様において、用語「細胞性物質が実質的でない」は、約30%未満（乾燥重量）の他のタンパク質（すなわち、汚染タンパク質）、約20%未満の他のタンパク質、約10%未満の他のタンパク質、約5%未満または約1%未満の他のタンパク質を有するポリペプチドの調製物を含む。

20

【0069】

ポリペプチドが組換え生成される場合、実質的に培地がなくてもよく、すなわち培地はポリペプチド調製物の約20体積%未満、約10体積%未満、または約5体積%未満を示す。用語「化学前駆体または他の化学物質が実質的でない」は、合成に関わる化学前駆体または他の化学物質から分離されるポリペプチド調製物を含む。1つの態様において、用語「化学前駆体または他の化学物質が実質的でない」は、約30%未満（乾燥重量）の化学前駆体または他の化学物質、約20%未満の化学前駆体または他の化学物質、約10%未満の化学前駆体または他の化学物質、あるいは約5%未満の化学前駆体または他の化学物質を有するポリペプチド調製物を含む。

30

【0070】

1つの態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号1の核酸分子、ならびにその相補物および部分によってコードされるアミノ酸配列を含む。本発明のポリペプチドはまた、断片および配列バリアント（例えば、対立遺伝子バリアント）を含む。バリアントはまた、他の生物由来のポリペプチドを含むが、配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびにその相補物および部分によってコードされるポリペプチドに実質的に相同性を有するか、あるいは配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチドに実質的に相同性を有するポリペプチドを含む。バリアントはまた、これらのポリペプチドに実質的に相同または同一なポリペプチドであるが別の生物由来、すなわちオルソログポリペプチドを含む。バリアントはまた、化学合成によって生成されるこれらのポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドを含む。バリアントはまた、組換え方法によって生成されるこれらのポリペプチドに実質的に相同または同一であるポリペプチドを含む。

40

【0071】

本明細書に使用される場合、2つのポリペプチド（またはポリペプチドの領域）は、アミノ酸配列が少なくとも約82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%相同または同一である場合に実質的に相同または同一である。本発明によって、実

50

質的に同一または相同なアミノ酸配列は本明細書により具体的に記載されるストリングエント条件下で配列番号1またはその部分にハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。

【0072】

2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性割合は、最適な比較目的のために配列を整列することによって決定され得る（例えば、ギャップが第一配列の配列に導入され得る）。対応する位置でのヌクレオチドまたはアミノ酸が次に、比較され、2つの配列間での同一性割合が配列によって共有される同一位置数の関数である（すなわち、%同一性 = 同一位置 / 全位置 × 100）。特定の態様において、比較目的のために整列されるXMRVアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の長さは、参照配列、例えば、図1および2に提供される配列の長さの、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%である。2つの配列の実際の比較は、周知の方法、例えば、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。かかる数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877(1993)に記載されている。かかるアルゴリズムは、Schafferら、Nucleic Acids Res., 29:2994-3005(2001)に記載されるようにBLASTNおよびBLASTXプログラム（バージョン2.2）に援用されている。BLASTおよびギャップ化BLASTプログラムを利用した場合、それぞれのプログラム（例えば、BLASTN）のデフォルトパラメーターが使用され得る。1つの態様において、検索されるデータベースは非冗長（NR）データベースであり、配列比較のためのパラメーターは、フィルターなし；期待値10；ワードサイズ3、マトリックスはBLOSUM62に設定され得、ギャップコストはイグジスタンス（Existence）11およびエクステンション1を有する。別の態様において、2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド間の同一性割合は目的のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの全長に対して決定され得る。

10

20

30

40

【0073】

配列比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、MyersおよびMillerのアルゴリズムCABIOS(1989)である。かかるアルゴリズムは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に援用され、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージ(Accelrys, San Diego, California)の一部である。アミノ酸配列を比較するALIGNプログラムを利用する場合、PAM120ウェイト残余テーブル、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4が使用され得る。配列解析用のさらなるアルゴリズムは当該分野で公知であり、Torellis and Robotti, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5(1994)に記載されるADVANCEおよびADAMならびにPearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85:2444-8(1988)に記載されるFASTAを含む。

50

【0074】

別の態様において、2つのアミノ酸配列間での同一性割合は、Blossom63マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに12、10、8、6、または4のギャップウェイトおよび2、3、または4の長さウェイトを用いたGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて達成され得る。なお別の態様において、2つの核酸配列間での同一性割合が、ギャップウェイト50および長さウェイト3を用いたGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて達成され得る。

【0075】

本発明はまた、本発明の核酸分子によってコードされるXMRVポリペプチドによって発揮される1つ以上の同じ機能を発揮するように、より低い程度の同一性を有するが十分な類似性を有するXMRVポリペプチドを含む。類似性は、保存されたアミノ酸置換によって決定される。かかる置換は、ポリペプチドの所定のアミノ酸を同様の特性の別のアミノ酸で置換するものである。保存的な置換は表現的にサイレントでありそうである。脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleの中で1つを別のものにする置換、ヒドロキシリル基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGln間での置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基PheおよびTyr間での置換が典型的に保存

50

的置換として見られる。アミノ酸変化が表現的にサイレントでありそうで関係のある手引きは、Bowieら、*Science* 247: 1306-1310(1990)に見出される。

【0076】

バリアントポリペプチドは、アミノ酸配列中に1つ以上の置換、欠失、挿入、逆位、融合、および切断またはこれらのいずれかの組み合わせで異なり得る。さらに、バリアントポリペプチドは、十分に機能的（例えば、細胞に感染する能力および子孫ウイルスを生成する能力）であり得るか、あるいは1つ以上の活性の機能（例えば、子孫ウイルスを生成する能力）を欠損し得る。十分に機能的なバリアントは典型的に、保存的なバリエーションまたは重要な残基もしくは重要でない領域におけるバリエーションのみを含む。機能性バリアントはまた、機能において変化のないまたは無意味な変化となる類似アミノ酸の置換を含み得る。あるいは、かかる置換は、ある程度、機能に正負に影響し得る。非機能性バリアントは典型的に、1つ以上の非保存的アミノ酸の置換、欠失、挿入、逆位、もしくは切断または重要な残基もしくは重要な領域における置換、挿入、逆位、もしくは欠失を含む。

10

【0077】

機能（例えば、感染）に不可欠であるアミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発(Cunninghamら、*Science*, 244:1081-1085(1989))のような当該分野で公知の方法で同定され得る。後者の手順は分子において残基のそれぞれに単一のアラニン変異を導入する（分子あたり1つの変異）。得られる変異分子は次にインピトロで生物学的活性を試験される。ポリペプチド活性に重要な部位はまた、結晶化、核磁気共鳴、またはフォトアフィニティー標識のような構造解析によって決定され得る(Smithら、*J. Mol. Biol.*, 224:899-904(1992); およびde Vosら *Science*, 255:306-312(1992)を参照)。

20

【0078】

本発明はまた、本発明のポリペプチドのXMRVポリペプチド断片を含む。断片は、配列番号2を含むポリペプチド、あるいは配列番号1もしくはその部分、その相補物、またはその他のバリアントを含む核酸分子によってコードされるポリペプチド由来であり得る。本発明はまた、本明細書に記載されるポリペプチドのバリアントの断片を含む。有用な断片は、ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性を保持するもの、およびポリペプチド特異的抗体を生じる免疫原として使用され得る断片を含む。特定の態様において、本発明のポリペプチドのXMRVポリペプチド断片は、gagポリペプチド（例えば、配列番号3）、pro-polポリペプチド（例えば、配列番号4）、envポリペプチド（例えば、配列番号4）およびその組み合わせを含む。

30

【0079】

生物学的に活性な断片は、例えば、6、9、12、15、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100以上のアミノ酸長であるペプチドを含む。

【0080】

断片は個別であり得るか（他のアミノ酸またはポリペプチドに融合されていない）、あるいはポリペプチドの1つ以上の構成物に融合され得る。さらに、いくつかの断片は、単一のより大きなポリペプチド内に含まれ得る。1つの態様において、宿主で発現を設計される断片は、ポリペプチド断片のアミノ末端に融合される異種由来のプレ-およびプロ-ポリペプチド領域ならびに断片のカルボキシル末端に融合されるさらなる領域を有し得る。

40

【0081】

ポリペプチド断片を作製する標準の分子生物方法は、当該分野で公知である。断片が一度生じると、これらは例えば、本明細書に記載される方法のいずれかを用いて生物学的活性を試験され得る。

【0082】

本発明は従って、キメラポリペプチドまたは融合ポリペプチドを提供する。これらは、ポリペプチドに実質的に相同でないアミノ酸配列を有する異種タンパク質またはポリペプチドに作動可能に連結された本発明のXMRVポリペプチドを含む。「作動可能に連結される

50

」は、ポリペプチドおよび異種タンパク質はフレーム中に融合されることを示す。異種タンパク質はポリペプチドのN-末端またはC-末端に融合され得る。1つの態様において、融合ポリペプチドは、本質的にポリペプチドの機能に影響しない。例えば、融合ポリペプチドは、ポリペプチド配列がGST配列のC-末端に融合されるGST融合ポリペプチドであり得る。他の型の融合ポリペプチドは、限定されないが、酵素的融合ポリペプチド、例えば、

- ガラクトシダーゼ融合物、酵母ツーハイブリッドGAL融合物、poly-His融合物、FLAG標識融合物およびIg融合物を含む。かかる融合ポリペプチドは、組換えポリペプチドの精製を容易にし得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ポリペプチドの発現および/または分泌は、異種シグナル配列を用いて増大され得る。それゆえに、別の態様において、融合ポリペプチドは、N-末端に異種シグナル配列を含む。

10

【0083】

EP-A0464533は、免疫グロブリン定常領域の様々な部分を含む融合タンパク質を開示する。Fcは治療および診断に有用であり、従って例えば、改善された薬物動力学特性となる（EP-A0232262）。薬物発見において、例えば、ヒトタンパク質はアンタゴニストを同定するハイスクループットスクリーニングアッセイの目的でFc部分と融合されている。（Bennettら、Journal of Molecular Recognition, 8:52-58(1995) およびJohansonら、The Journal of Biological Chemistry, 270, 16:9459-9471(1995)を参照）。従って、本発明はまた、本発明のポリペプチドおよび様々なサブクラス（IgG、IgM、IgA、IgE）の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の様々な部分を含む可溶性融合ポリペプチドを含む。

20

【0084】

キメラポリペプチドまたは融合ポリペプチドは、標準の組換えDNA技術によって生成され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は従来技術に従ってフレーム中で一緒にライゲートされる。別の態様において、融合遺伝子は自動化DNA合成機を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、核酸断片のPCR增幅は、キメラ核酸配列を生じるために次にアニーリングおよび再增幅され得る2つの連続的核酸断片の間で相補性突出を生じるアンカープライマーを用いて実施され得る（Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley & Sons, (1998)を参照、全教示は参照によって本明細書に援用される）。さらに、融合部分（例えば、GSTタンパク質）を既にコードする多くの発現ベクターが市販で入手可能である。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、融合部分がフレーム中でポリペプチドに結合されるようにかかる発現ベクターにクローニングされ得る。

30

【0085】

実質的に純粋なXMRVポリペプチド、単離されるXMRVポリペプチド、または実質的に純粋でかつ単離されるXMRVポリペプチドは、XMRVポリペプチドを天然に発現する細胞から精製され得るか、発現が変更されている（組換え）細胞から精製され得るか、あるいは公知のタンパク質合成方法を用いて合成され得る。1つの態様において、ポリペプチドは組換えDNA技術によって生成される。例えば、ポリペプチドをコードする核酸分子が発現ベクターにクローニングされ、発現ベクターが宿主細胞に導入され、ポリペプチドが宿主細胞で発現される。あるいは、細胞はXMRVウイルスを感染され得る。XMRVポリペプチドは次に、標準のタンパク質精製技術を用いて適切な精製計画によって細胞または細胞の上清から単離され得る。

40

【0086】

一般に、本発明のXMRVポリペプチドは、当該分野で公知の方法を用いてSDS-PAGEゲル上または分子篩ゲルろ過カラム上で分子量マーカーとして使用され得る。本発明のポリペプチドは抗体を惹起するためにまたは免疫応答を誘発するために使用され得る。ポリペプチドはまた、生物学的液体中のポリペプチドまたは結合する分子（例えば、レセプターまたはリガンド）のレベルを定量的に決定するアッセイにおいて試薬、例えば、標識試薬として使用され得る。ポリペプチドはまた、対応するポリペプチドが組織分化中に構成的にまたは疾患状態のいずれかで好ましくは発現される細胞または組織用マーカーとして使用され得る。ポリペプチドはまた、対応の結合剤を単離するために、およびペプチドまたは低

50

分子の、結合反応するアンタゴニストまたはアゴニストをスクリーニングするために使用され得る。本発明のポリペプチドはまた、治療剤として使用され得る。

【0087】

抗体

XMRVポリペプチド、そのホモログおよびバリエントの全部または一部に選択的に結合するポリクローナル抗体および／またはモノクローナル抗体もまた提供される。本発明は、例えば、配列番号2にコードされるアミノ酸配列またはその部分を有するか、あるいは配列番号1の全てもしくは部分を含む核酸分子、または別のバリエント、もしくはその部分にコードされるアミノ酸配列を有する本発明のXMRVポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体を提供する。

10

【0088】

本明細書に使用される場合、用語「精製抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち、抗原に選択的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。本発明のポリペプチドに選択的に結合する分子は、ポリペプチドまたはその断片に結合する分子であるが、試料、例えば、ポリペプチドを天然に含む生物学的試料中で他の分子に実質的に結合しない分子である。好ましくは、抗体は、タンパク質および天然で関連する天然有機分子がない状態で少なくとも60重量%である。より好ましくは、抗体調製物は、少なくとも75重量%または90重量%であり、最も好ましくは99重量%の抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分の例は、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって生じられ得るF(ab)およびF(ab')2断片を含む。

20

【0089】

本発明は、本発明のXMRVポリペプチドと選択的に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本発明のポリペプチドの特定のエピトープと免疫反応し得る1種の抗原結合部位のみを含む抗体分子の集団を指す。モノクローナル抗体組成物は従って典型的に、免疫反応する本発明の特定のポリペプチドに单一の結合親和性を示す。

20

【0090】

ポリクローナル抗体は、適切な被験体を所望の免疫原、例えば、本発明のXMRVポリペプチドまたはその断片で免疫化することによって上記のように調製され得る。免疫化された被験体における抗体価は、固定化されたポリペプチドを用いた酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等を用いるような標準の技術によって経時的にモニターされ得る。所望の場合、ポリペプチドに対して指向される抗体分子は哺乳動物(例えば、組織、血液から)から単離され得、IgGフラクションを得るためにプロテインAクロマトグラフィーのような周知の技術によってさらに精製され得る。

30

【0091】

免疫化後に適切な時点、例えば、抗体価が最も高い時に、抗体産生細胞は、被験体から得られることができ、Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975)に元々記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、Immunol. Today 4:72(1983))、EBVハイブリドーマ技術(Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96(1985))またはトリオーマ技術のような標準の技術によってモノクローナル抗体を調製するために使用され得る。ハイブリドーマ作製技術は周知である(一般にCurrent Protocols in Immunology, Coliganら、(編)John Wiley & Sons, Inc., New York, NY(1994)を参照)。要するに、不死細胞株(典型的にミエローマ)は、上記の免疫原で免疫化された哺乳動物からのリンパ球(典型的に脾臓細胞)に融合され、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清が本発明のポリペプチドと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定するためにスクリーニングされる。

40

【0092】

リンパ球および不死化細胞株を融合するために使用される多くの周知のプロトコールのいずれかが、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生じる目的に適用され

50

得る（例えば、Current Protocols in Immunology上掲；Galfreら、Nature, 266:55052(1977);R.H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies:A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York(1980);およびLerner, Yale J. Biol. Med.54:387-402(1981)を参照）。さらに、当業者は有用でもあるかかる方法の多くのバリエーションがあることを認める。

【0093】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するための1つの選択肢において、本発明のXMRVポリペプチドに対するモノクローナル抗体が、ポリペプチドと共に組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定および単離され、それによってポリペプチドを結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするキットは市販で入手可能である（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01;およびStratagene SurfZAPTMPhage Display Kit, カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの作製およびスクリーニングの使用に特に従う方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号；PCT公開公報WO92/18619；PCT公開公報WO91/17271；PCT公開公報WO92/20791；PCT公開公報WO92/15679；PCT公開公報WO93/01288；PCT公開公報WO92/01047；PCT公開公報WO92/09690；PCT公開公報WO90/02809；Fuchsら、Bio/Technology 9:1370-1372(1991)；Hayら、Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85(1992)；Huseら、Science 246:1275-1281(1989)；およびGriffithsら、EMBO J.12:725-734(1993)において見出され得る。10

【0094】

さらに、標準の組換えDNA技術を用いて行われ得るヒトおよび非ヒト部分を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体のような組換え抗体は本発明の範囲内である。かかるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は当該分野で公知の組換えDNA技術によって生成され得る。20

【0095】

一般に、本発明の抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降のような標準の技術によって本発明のXMRVポリペプチドを単離するために使用され得る。ポリペプチド特異的抗体は細胞由来の天然ポリペプチドおよび宿主細胞で発現される組換え生成ポリペプチドの精製を容易にし得る。さらに、本発明のXMRVポリペプチドに特異的な抗体はポリペプチドを検出するために使用され得る（例えば、細胞溶解物、細胞上清、血液試料、または組織試料において）。30

【0096】

本発明の抗体はまた、臨床試験手順の一部として組織のタンパク質レベルをモニターするために、例えば、所定の治療養生の効能を決定するために診断的に使用され得る。検出は検出可能な物質に抗体を結合させることによって容易になされ得る。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射性物質を含む。適切な酵素の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼを含む；適切な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを含む；適切な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン(umbelliferone)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド(dansyl chloride)およびフィコエリトリンを含む；発光物質の例はルミノールを含む；生体発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、緑色蛍光タンパク質、およびエクオリンを含む、ならびに適切な放射性物質の例は、例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³²Pおよび³Hを含む。40

【0097】

レトロウイルスベクター

本発明のXMRVはまた、部分が公知の方法を用いてXMRVに挿入されるか、あるいはXMRVに結合され、それによって組換えXMRVを生成する発現ベクターおよび／または標的ベクター

10

20

30

40

50

として使用され得る。

【0098】

1つの態様において、目的の部分はXMRVのゲノムに（例えば、相同組換えを用いて）導入され、それによって組換えXMRVを生成する核酸であり、組換えXMRVは目的の部分を発現し得る。さらに、組換えXMRVは、核酸が標的細胞で発現される条件下でXMRV（によって感染され得る）によって標的にされる細胞（例えば、前立腺癌細胞）に目的の部分を送達するために使用され得る。目的の核酸は、例えば、マーカー（例えば、ネオマイシン、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質）をコードする核酸および／または治療剤（例えば、インターフェロン、インターロイキン、アンチネオプラスチン、合成ペプチド）であり得、調節配列（例えば、プロモーター（構成性、誘導性）、エンハンサー）を含み得る。

10

【0099】

特定の態様において、XMRVは弱毒化される（例えば、無毒化）。弱毒化されたXMRVが公知の方法（例えば、連続継代）を用いて得られることができる。1つ以上または全てのウイルスタンパク質（例えば、gag、pol、env）をコードする遺伝子が目的の核酸に置換され、XMRVのゲノムが改変され、それによってXMRVベクタープラスミドを生成し得る。特定の態様において、1つ以上のXMRV遺伝子は置換され、それによって複製し得ない改変XMRVベクタープラスミドを生成する。ウイルスタンパク質を生成するが複製コンピテントウイルスを生成する能力を欠くパッケージング細胞株がレトロウイルス粒子に改変XMRVをパッケージするために使用され得る。目的の核酸を含むXMRVベクタープラスミドは、XMRVベクタープラスミドが転写され、改変レトロウイルス粒子（組換えレトロ粒子）にパッケージングされるパッケージング細胞株にトランスフェクトされ得る。改変レトロウイルス粒子は、XMRVによって標的化される細胞に感染するために使用され得、XMRVベクタープラスミドに存在する目的の核酸は次に、感染細胞で発現され得る。1つ以上のウイルスタンパク質が感染細胞に存在しないので、かかる改変レトロウイルス粒子に感染した細胞は、新しいウイルスを生成し得ない。しかしながら、目的の核酸は感染細胞のDNAに組み込まれ、次に感染細胞で発現され得る。

20

【0100】

診断アッセイおよびスクリーニングアッセイ

本発明はまた、本発明のXMRV発現の存在を評価するまたはXMRVポリペプチドの活性を評価する診断アッセイに関する。1つの態様において、アッセイは生物学的試料（例えば、血液、血清、細胞、組織）に関連して使用され、それによってXMRVが個体または個体由來の試料中に存在するかどうか、あるいは個体が癌（例えば、XMRVの伝染（例えば、性的伝染）によって発現し得る癌、前立腺、頸部または卵巣癌等）を発現する（疾病素質または罹病性を有する）リスクがあるかどうかを決定する。本発明はまた、個体が癌を発現しやすいかどうかを決定する診断（または予測）アッセイを提供する。例えば、個体におけるXMRVの存在は、個体が癌を発現する増加したリスクを有することを示し得る。かかるアッセイは、診断または予測目的に使用され、それによって癌と関連する症状の開始前に個体を予防処置し得る。

30

【0101】

本発明の別の局面は、核酸分子発現または本発明のポリペプチドの生物学的活性に対する薬剤、または候補化合物（例えば、薬物または他の薬剤）の影響をモニターするアッセイ、およびXMRVポリペプチドに結合する候補化合物を同定するアッセイに関する。これらならびに他のアッセイおよび薬剤は以下の項目でさらに詳細に記載される。

40

【0102】

診断アッセイ

XMRV核酸分子、プローブ、プライマー、ポリペプチド、およびXMRVポリペプチドに対する抗体は、癌への罹病性または癌を有する個体の可能性を診断する方法、ならびに癌への罹病性の診断に有用なキットにおいて使用され得る。

【0103】

50

1つの態様において、本発明は、サザン分析、ノザン分析、またはインサイチュハイブリダイゼーション(Ausubelら、上掲を参照)のようなハイブリダイゼーション方法を用いて癌(例えば、前立腺癌)を診断または検出する方法に関する。例えば、試験被験体由来のDNA(例えば、cDNA)またはRNAの生物学的試料(「試験試料」)は、癌を有すると疑われている個体、癌にかかりやすい個体または癌に疾患素質がある個体(「試験個体」)から得られる。試験試料は、血液試料または組織試料のようなXMRV核酸分子を含む任意の供給源由来であり得る。DNA、RNAまたはcDNA試料は次に、XMRV核酸分子が存在するかどうかを決定するために調べられる。XMRV核酸の存在は、RNAまたはcDNAの核酸プローブへのハイブリダイゼーションによって示され得る。本明細書で使用される場合、「核酸プローブ」は、DNAプローブまたはRNAプローブであり得る。プローブは、上記の核酸分子(例えば、全核酸分子、断片、遺伝子を含むベクター、プローブ、またはプライマー等)のいずれかであり得る。

10

【0104】

XMRV核酸を検出するために、ハイブリダイゼーション試料は、XMRV核酸を含んでいる疑いのある試験試料を少なくとも1つの核酸プローブと接触させることで形成される。好ましいプローブは、本明細書に記載されるXMRV核酸にハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、全長核酸分子または少なくとも15、30、50、100、250、または500ヌクレオチド長であり、ストリンジエント条件下で適切なmRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドのような、その部分であり得る。例えば、核酸プローブは、配列番号1の全てもしくは部分、または配列番号1の相補物であり得るか、あるいは配列番号2の全てまたは部分をコードする核酸分子であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは、上記されている。

20

【0105】

ハイブリダイゼーション試料は、核酸プローブのXMRV核酸へのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で維持される。1つより多くの核酸プローブはまた、本方法で同時に使用され得る。核酸プローブのいずれかのハイブリダイゼーションは、癌(例えば、前立腺癌)への罹病性または癌を有する個体の可能性を示す。

30

【0106】

ハイブリダイゼーションは、個体由来の標的核酸配列セグメントに相補的であるオリゴヌクレオチドプローブのサザンプロット分析、ノザンプロット分析、アレイを用いて検出され得る。例えば、1つの態様において、オリゴヌクレオチドアレイが使用され得る。オリゴヌクレオチドアレイは典型的に、種々の公知の位置で基質の表面に結合される複数の種々のオリゴヌクレオチドプローブを含む。オリゴヌクレオチドアレイは、「Virochip」および「GENECHIPSTM」を含む(米国特許第5,143,854号ならびにPCT公開公報WO90/15070および92/10092)。これらのアレイは機械的合成方法または光リソグラフィック方法および固相オリゴヌクレオチド合成方法の組み合わせを援用する光配向合成方法を用いて一般的に製造され得る。Fodorら、Science 251:767-777(1991)、米国特許第5,143,854号; PCT公開公報WO90/15070; PCT公開公報WO92/10092および米国特許第5,424,186号を参照、それぞれの全教示は参照によって本明細書に援用される。機械的合成方法を用いたこれらのアレイの合成技術は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載され、全教示は、参照によって本明細書に援用される。

40

【0107】

オリゴヌクレオチドアレイが一度調製されると、目的の核酸はアレイにハイブリダイズされ、標的の核酸分子をスキャンする。ハイブリダイゼーションおよびスキャンニングは一般に、本明細書に記載される方法によっておよび例えば、PCT公開公報WO92/10092およびWO95/11995、ならびに米国特許第5,424,186号でも実施され、全教示は参照によって本明細書に援用される。

【0108】

さらに、XMRV核酸レベルは、例えば、当業者に公知のインサイチュハイブリダイゼーシ

50

ヨン技術を用いて、または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンプロット、免疫沈降、免疫組織化学、および免疫蛍光法を含む様々な方法による、XMRVポリペプチドの発現、活性、および／または組成のレベルを調べることによって検出され得る。個体由来の試験試料はまた、XMRV核酸のレベルもしくは発現の変更および／またはXMRV核酸によってコードされるポリペプチドの組成の変更の存在を評価され得る。

【0109】

試料におけるXMRVの検出は、対照試料におけるXMRVの発現または組成と比較され得る。対照試料は試験試料と対応する試料であり（例えば、同型の細胞由来であり）、XMRVが存在しない個体由来である。

【0110】

分光測定、比色法、電気泳動、等電点電気泳動、および免疫プロットのような免疫アッセイを含む、XMRVポリペプチドの発現または組成を調べる様々な手段が使用され得る（Ausbelら、上掲；特に10章も参照）。例えば、1つの態様において、ポリペプチドに結合し得る抗体（例えば、上記のような）、好ましくは検出可能な標識を有する抗体が使用され得る。抗体はポリクローナル抗体、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはその断片（例えば、FabまたはF(ab')2）が使用され得る。抗体に関する用語「標識」は、検出可能な物質の抗体への結合（即ち、物理的な結合）による抗体の直接標識および直接標識される別の試薬と反応することによる抗体の間接標識を含むことを意図する。間接標識の例は、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の検出である。

10

20

【0111】

XMRVポリペプチドに特異的に結合する上記のような抗体を用いたウェスタンプロット分析は、試験試料中のXMRVポリペプチドの存在を同定するために使用され得る。

【0112】

本方法の1つの態様において、試験試料中のXMRVポリペプチドのレベルまたは量が、対照試料中のXMRVポリペプチドのレベルまたは量と比較される。差異が統計的に有意であるような、対照試料中のポリペプチドのレベルまたは量よりも高いまたは低い試験試料中のポリペプチドのレベルまたは量は、XMRVポリペプチドの発現の変更を示し、癌への罹病性を示し得る。

30

【0113】

診断方法に有用なキット（例えば、試薬キット）は、例えば、本明細書に記載されるようなハイブリダイゼーションプローブまたはプライマー（例えば、標識プローブまたはプライマー）、標識分子の検出用試薬、XMRVポリペプチドに結合する抗体、XMRVを含む核酸の増幅用手段、またはXMRVの核酸配列の分析用もしくはXMRVポリペプチドのアミノ酸配列の分析用の手段等を含む、本明細書に記載される方法のいずれかに有用な組込体を含む。

40

【0114】

スクリーニングアッセイおよび同定される薬剤

本発明は、本発明の核酸の存在を同定する方法および本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの存在を同定する方法（本明細書で「スクリーニングアッセイ」ともいう）を提供する。例えば、本発明は、例えば、かかる試料について受託されている（例えば、血液バンク；臓器バンク）組織、血液、血漿、および／または血小板のユニットにおけるXMRVの存在をスクリーニングおよびモニタリングする方法を提供する。

40

【0115】

1つの態様において、試料中の目的の核酸分子（例えば、XMRVの核酸に有意な相同性を有する核酸）の存在（または非存在）は、上記のようなストリンジエントな条件下で本発明の核酸（例えば、配列番号1の配列を有する核酸、またはその相補物、あるいは配列番号2の配列を有するアミノ酸をコードする核酸、またはかかる核酸の断片もしくはバリアント）を含む核酸と試料を接触させることによって評価され得、次にハイブリダイゼーションの存在（または非存在）について試料を評価する。好ましい態様において、高いストリンジエント条件が選択的なハイブリダイゼーションに適切な条件である。別の態様にお

50

いて、目的の核酸分子を含む試料は、目的の核酸分子（例えば、XMRV核酸）の部分に少なくとも部分的に相補的な連續ヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、上記のようなプライマーまたはプローブ）と接触され、接触試料はハイブリダイゼーションの存在または非存在を評価される。好ましい態様において、連續的なヌクレオチド配列を含む核酸は、XMRVの核酸分子の部分に完全に相補的である。

【0116】

上記の態様のいずれかにおいて、目的の核酸の全てまたは部分が、ハイブリダイゼーションを行う前に増幅に供され得る。

【0117】

別の態様において、試料における、本発明のポリペプチドまたはその断片もしくはバリアントのようなXMRVポリペプチドの存在（または非存在）は、XMRVポリペプチドに特異的に結合する抗体（例えば、上記のもののような抗体）と試料を接触させることにより評価され得、次に抗体のXMRVポリペプチドへの結合の存在（または非存在）について試料を評価する。

10

【0118】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドの活性を変更または調節（例えば、増大もしくは減少；増強もしくは阻害）するか、あるいは別 の方法で本明細書のポリペプチドと相互反応する、薬剤または化合物（例えば、融合タンパク質、ポリペプチド、ペプチド模倣物、プロドラッグ、レセプター、結合剤、抗体、低分子もしくは他の薬物、またはリボザイム）を同定する方法を提供する。例えば、かかる化合物は、本明細書に記載されるポリペプチドに結合する；例えば、本発明のポリペプチドの活性に対して刺激効果または阻害効果を有する；または本発明のポリペプチドが、XMRVポリペプチドが正常に相互反応する分子（XMRV結合剤）と相互反応する能力を変える（例えば、増強または阻害する）、化合物または薬剤であり得る。

20

【0119】

候補化合物は、ポリペプチドの活性の増加を生じ得る。例えば、ポリペプチドの活性は、対照に対して少なくとも1.5倍～2倍、少なくとも3倍、または少なくとも5倍に増加し得る。あるいは、ポリペプチド活性は、対照に対して、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、40%、50%、もしくは75%、または少なくとも90%減少であり得る。

30

【0120】

一態様において、本発明は、本明細書中に記載されるポリペプチド（またはその生物活性部分）に結合するかまたはその活性を調節する化合物を同定するための、候補化合物または試験剤のスクリーニングのためのアッセイ、ならびに該アッセイにより同定可能な薬剤を提供する。本明細書で使用する場合、「候補化合物」または「試験剤」は天然に存在するかまたは人工的に得られる化学分子であり、例えば、ペプチド、タンパク質、合成分子、例えば合成有機分子、天然に存在する分子、例えば天然に存在する有機分子、核酸分子、およびその成分を含む。

【0121】

一般的に、本発明に使用するための候補化合物は、当該分野に公知の方法に従って、天然産物もしくは合成（もしくは半合成）抽出物の大ライブラリー、または化学ライブラリーから同定され得る。薬物発見および薬物開発の当業者は、試験抽出物または化合物の正確な供給源は本発明の（1種類または複数種の）スクリーニング法に重要ではないということを理解しよう。従って、本明細書に記載された代表的な方法を用いて、実質的に任意の数の化学抽出物または化合物がスクリーニングされ得る。かかる抽出物または化合物の例としては、限定されないが、植物、菌類、原核生物または動物系の抽出物、発酵培地、および合成化合物ならびに現存する化合物の変形物が挙げられる。限定されないが、糖、脂質、ペプチドおよび核酸系化合物を含む任意の数の化合物のランダムまたは直接合成（例えば半合成または全合成）を生成するために、多くの方法がまた利用可能である。合成化合物ライブラリーは、例えばBrandon Associates (Merrimack, NH) およびAldrich Chemical (Milwaukee, WI) から市販されている。あるいは、細菌、菌、植物、および動物の

40

50

抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、Biotics (Sussex、UK)、Xenova (Slough、UK)、Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce、FL)、およびPharmaMar、U.S.A. (Cambridge、MA) を含む多くの供給源から市販されている。また、天然のライブラリーおよび合成により生成されるライブラリーは所望の場合、当該分野に公知の方法によって、例えば標準的な抽出法および分画法によって生成される。例えば、候補化合物は、生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な並行固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；および親和性クロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法を含む、当該分野に公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを用いて、得ることができる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されるが、他の四つのアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに応用可能である (Lam, Anticancer Drug Des. 12 : 145 (1997))。さらに、所望の場合、任意のライブラリーまたは化合物は、標準的な化学的、物理的、または生化学的方法を用いて容易に改変される。

10

【0122】

所望の場合、処置に有用な薬剤であると示される化合物は、当該分野に公知の方法によって化学的に改変される。治療価値があるものとして同定される化合物は、その後本発明の核酸またはポリペプチドの活性または発現を変更することが望ましい疾患の動物モデルを用いて分析され得る。

20

【0123】

XMRVポリペプチドの生物活性を変更する候補化合物を同定する一態様において、細胞、組織、細胞溶解物、組織溶解物、またはXMRVポリペプチド（例えば配列番号：2）を含有または発現する溶液を、細胞のXMRV感染に適した条件下で、試験される候補化合物と接触させ得る。ウイルスの感染力を評価する方法は、当該分野に公知である（例えば、逆転写酵素活性を有するレトロウイルス粒子を生じるXMRVの能力の評価）。

【0124】

あるいは、XMRV核酸分子またはポリペプチドを、試験される候補化合物に直接接觸させ得る。XMRV生物活性のレベル（量）を評価し（例えば直接的または間接的のいずれかで）、対照の生物活性のレベルと比較する。候補化合物の存在下で生物活性のレベルが、候補化合物の非存在下または候補化合物ビヒクルのみの存在下における生物活性のレベルと、統計的に有意な量で異なる場合、候補化合物は、XMRVポリペプチドの生物活性を変更する化合物である。例えば、対照に対するXMRV生物活性のレベルの増加は、候補化合物がXMRV活性を増強する化合物（のアゴニストである）であることを示す。同様に、対照に対するXMRV生物活性のレベルの減少は、候補化合物がXMRV活性を抑制する化合物（のアンタゴニストである）であることを示す。別の態様において、試験される候補化合物の存在下で、XMRVポリペプチドまたはその誘導体もしくはその断片の生物活性のレベルを、以前に確立された対照レベルと比較する。候補化合物の存在下で、統計的に有意な量で対照レベルと異なる生物活性のレベルは、該化合物がXMRV生物活性を変更することを示す。

30

【0125】

本発明はまた、核酸分子の発現（例えば転写または翻訳）を変更する（例えば増加または減少する）か、そうでなければ本明細書に記載される核酸分子と相互作用するXMRV核酸分子（例えばアンチセンス核酸、干渉RNA（例えばsiRNA、shRNA）、融合タンパク質、ポリペプチド、ペプチド模倣物、プロドラッグ、レセプター、結合剤、抗体、低分子もしくは他の薬物、またはリボザイム）の発現を変更する化合物を同定するアッセイ、ならびに該アッセイにより同定され得る化合物に関する。例えば、XMRVポリペプチドをコードする核酸を含有する溶液は、試験される候補化合物と接觸し得る。XMRV発現のレベルおよび/またはパターンを評価し、対照の発現のレベルおよび/またはパターンと比較する。候補化合物の存在下でのレベルおよび/またはパターンが、統計的に有意な量または様式で、候補化合物の非存在下または候補化合物ビヒクルのみの存在下でのレベルおよび/またはパターンと異なる場合、候補化合物はXMRVの発現を変更する化合物である。

40

50

【 0 1 2 6 】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規の化合物に関する。従って、適切な動物モデルにおいて、本明細書で記載されるような同定される化合物をさらに使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書で記載されるような同定される化合物（例えば抗体）を動物モデルに使用して、かかる化合物による処置の効果、毒性、または副作用を決定し得る。あるいは、本明細書で記載されるような同定される化合物を動物モデルで使用して、かかる化合物の作用機構を決定し得る。さらに、本発明は、上記のスクリーニングアッセイにより同定される、本明細書に記載されるような処置のための新規の化合物の使用に関する。また、本明細書で記載されるような同定される化合物を用いて、ポリペプチドまたは核酸分子を本明細書で記載されるような同定される化合物と接触させること（またはポリペプチドもしくは核酸分子を含む細胞を接触させること）により、XMRVポリペプチドの活性を変更、またはXMRVの発現を変更し得る。

10

【 0 1 2 7 】**医薬組成物**

本発明はまた、本明細書に記載される核酸、特に本明細書に記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む；本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、配列番号：2、および／またはそのバリエント）を含む；および／または本明細書に記載されるようにXMRV発現もしくはXMRVポリペプチド活性を変更する（例えば増加もしくは減少する）化合物を含む医薬組成物に関する。例えば、該組成物は、生理学的に許容され得る担体または賦形剤を配合されて、医薬組成物を調製し得る。担体および組成物は無菌であり得る。製剤は投与形態に適するはずである。

20

【 0 1 2 8 】

適切な、薬学的に許容され得る担体としては、限定されないが、水、塩溶液（例えばNaCl）、食塩水、緩衝化食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレン glycole、ゼラチン、ラクトース、アミロースもしくはデンプン等の炭水化物、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘着性パラフィン、芳香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等、ならびにそれらの組合せが挙げられる。医薬製剤は、所望の場合、活性化合物と不利に反応しない助剤、例えば潤滑剤、保存料、安定化剤、保湿剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、バッファ、色素、調味料および／または芳香物質等と混合され得る。

30

【 0 1 2 9 】

所望の場合、該組成物はまた、少量の保湿剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含み得る。組成物は溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性製剤または粉末であり得る。該組成物は、トリグリセリド等の従来の結合剤および担体とともに、坐剤として調製され得る。経口製剤としては、例えば医薬品等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリソナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含み得る。

30

【 0 1 3 0 】

これらの組成物の導入方法としては、限定されないが、皮内、筋内、腹腔内、眼内、静脈内、経皮、局所、経口および鼻腔内が挙げられる。他の適切な導入方法としてはまた、遺伝子治療（下記）、充電式または生物分解性装置、粒子加速装置（「遺伝子銃」）および徐放性多因子装置が挙げられ得る。本発明の医薬組成物は、他の化合物との組合せ治療の一部としても投与され得る。

40

【 0 1 3 1 】

該組成物は、ヒトへの投与に適用される医薬組成物として、常套的な手段によって調製され得る。例えば、静脈内投与用の組成物は、一般的に、滅菌等張水溶性バッファ中の溶液である。必要な場合、組成物は、可溶化剤および注射部位で痛みを和らげる局所麻酔も含み得る。一般的に、成分は、例えば活性化合物の単位量を示す、アンプルまたはサシェ等の密封された容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、単位用量形態中に別々ま

50

たは混合してのいずれかで供給される。組成物が注入により投与される場合、該組成物は滅菌の医薬等級水、塩類またはデキストロース／水を含有する注入ボトルが不要となり得る。組成物が注射により投与される場合、注射用の滅菌水または塩類のアンプルが提供され得るので、成分は投与前に混合され得る。

【0132】

局所適用のために、局所適用に適合性である担体を含み好ましくは水よりも大きな動的粘着性を有する非噴霧形態、粘性～半固体または固体形態が用いられ得る。適切な製剤としては、限定されないが、溶液、懸濁物、エマルジョン、クリーム、軟膏、粉末、浣腸剤、ローション、ゾル、リニメント、膏薬、エアゾール等が挙げられ、所望の場合、それらは滅菌されるか、例えば防腐剤、安定化剤、湿潤剤、バッファまたは浸透圧に影響を与えるための塩等の助剤と混合される。該化合物は化粧用製剤に組み込まれてもよい。局所適用には噴霧式エアゾール製剤も適しており、ここで、好ましくは固体または液体の不活性担体物質と組み合わせた活性成分は絞りだせる容器に詰められるか、または圧縮揮発性物質、通常気体の高圧ガス、例えば圧縮空気と混合して詰められる。

【0133】

本明細書中に記載される化合物は、中性または塩形態で調製され得る。薬学的に許容され得る塩としては、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来の遊離アミノ基により形成されるもの、および例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来の遊離カルボキシル基により形成されるものが挙げられる。

【0134】

化合物は治療有効量で投与される。特定の障害または状態の処置において治療的に有効である化合物の量は、障害または状態の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定され得る。また、インビトロまたはインビオッセイを任意に用いて、最適用量範囲の同定を補助し得る。製剤に用いられる正確な用量はまた、投与経路、および脈管形成疾患、脈管疾患、心臓疾患、または循環器疾患の症候の重症度に依存し、医師の判断、各々の患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インビトロまたは動物モデル試験系由来の用量反応曲線から推定され得る。

【0135】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の一つ以上の成分で満たされた一つ以上の容器を含む、医薬パックまたはキットを提供する。医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関に指定された形態の通知は、かかる（1つまたは複数の）容器と任意に関連し得、該通知は、ヒト投与に関する製造、使用または（of）販売の該機関の認可を表す。パックまたはキットには投与の様式、薬物投与の順序（例えば別々に、連続的にもしくは同時に）等に関する情報が貼られ得る。パックまたはキットは、患者に治療を受けさせることを気付かせる手段も含み得る。パックまたはキットは組合せ治療の単一単位用量であり得るか、または複数単位用量であり得る。特に、該化合物は、分離され得るか、任意の組合せで混合され得るか、単一のバイアルまたは錠剤中に存在し得る。プリスター・パック中または他の分配手段で集合された化合物が好ましい。本発明の目的について、単位用量とは、それぞれの化合物の個々の薬理動態学に依存し、標準的な時間経過でFDAに認可された用量で投与される用量を意味するものとする。

【0136】

治療方法

本発明はまた、XMRV治療化合物を用いた、XMRVに関する疾患の処置方法（予防的、診断的、および／または治療的）に関する。「XMRV治療化合物」は、本明細書に記載されるような、XMRVポリペプチド活性および／またはXMRV核酸分子発現を抑制する化合物（例えばアゴニストまたはアンタゴニスト）である。XMRV治療化合物は、種々の手段、例えばXMRVに対する免疫応答を誘導すること、XMRVポリペプチド活性を（例えばXMRVポリペプチドに結合することにより）阻害すること、またはXMRV核酸分子の発現をダウンレギュレートすること等により、XMRVポリペプチド活性または核酸分子発現を抑制し得る。一態様におい

10

20

30

40

50

て、XMRV治療化合物はワクチンである。代表的なXMRV治療化合物としては以下のもの、本明細書に記載される核酸またはその断片もしくは誘導体、本明細書に記載されるポリペプチド；ペプチド模倣物；融合タンパク質またはそのプロドラッグ；抗体；他の低分子；およびXMRV核酸発現またはポリペプチド活性を抑制する他の化合物、例えば本明細書に記載されるスクリーニング法において同定される化合物が挙げられる。特定の態様において、XMRVのインヒビターは逆転写酵素インヒビター（例えば、AZT、ジドブシン、レトロビル）およびプロテアーゼインヒビターである。所望の場合、一つより多いXMRV治療化合物が同時に用いられてもよい。

【0137】

核酸であるXMRV治療化合物は、XMRVに関連する疾患の処置に用いられる。一態様において、該疾患は、病因が個体におけるXMRVの存在に起因する癌である（例えば、前立腺癌、頸部癌、子宮癌）。本明細書で用いる場合、用語「処置」は、該疾患に関連する症候の改善のみならず、疾患に対する免疫応答を含む疾患の開始の予防または遅延をいい、疾患の症候の重症度または頻度の減少もいう。該治療は、個体におけるXMRVポリペプチドの活性を抑制またはダウンレギュレートするように設計される。例えば、XMRV治療化合物は、XMRV核酸分子またはそのバリエントの発現または有効性をダウンレギュレートまたは減少するように投与され得る。一態様において、本発明は、XMRVを抑制する有効量の薬剤を個体に投与することを含む、XMRVが存在する個体における癌（例えば前立腺癌）を処置する方法に関する。別の態様において、本発明は、個体におけるXMRVの存在を検出する工程を含む、XMRVが存在する個体における徵候のない（初期段階）癌の検出方法に関し、ここで個体におけるXMRVの存在が個体における初期段階の癌を示す。さらに別の態様において、本発明は、個体においてXMRVが存在するかどうかを決定する工程を含む、癌の発生の危険性について個体を同定する方法に関し、ここで個体においてXMRVが存在するならば該個体は癌を発生する危険がある。

10

20

30

40

【0138】

（1種類または複数種の）XMRV治療化合物は、治療有効量（すなわち、疾患に関連する症候を改善すること、疾患の開始を予防もしくは遅延すること、および／または疾患の症候の重症度もしくは頻度を少なくすること等によって、該疾患を処置するのに十分な量）で投与される。特定の個体の障害または状態の処置において治療的に有効な量は、疾患の症候および重症度に依存し、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インピトロまたはインピボアッセイを任意に用いて、最適用量範囲の同定を補助し得る。製剤に使用される正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重症度に依存し、医師の判断および各々の患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インピトロまたは動物モデル試験系由来の用量反応曲線から推定され得る。

【0139】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに記載される。

【実施例】

【0140】

実施例1 前立腺組織におけるガンマレトロウイルスの同定に使用される方法の一般的な概観

方法および結果

1. 遺伝子型の決定、前立腺組織の処理、およびRNAの単離

Cleveland Clinic Foundationで前立腺切除が行なわれる予定のヒトを、RNASELにおけるR462Q (1385G->A) 変異について、PBMCから単離されたDNAにおけるAmplification Refractory Mutation System (ARMS) アッセイを用いて、遺伝子型決定した。該分析には、RNASELにおけるホモ接合体野生型 (GG) 、ヘテロ接合体 (GA) 、またはホモ接合体変異型 (AA) の変異体を検出し得る対立遺伝子特異的フォワードプライマー配列を用いるPCR系アッセイを使用する (Casey G., et al., Nat Genet. 32(4):581-3, 2002)。前立腺切除の直後に、組織コアを、移行領域（良性前立腺肥大、BPHの部位）および辺縁領域（一般に癌が生じる場所）の両方から取り出し、ドライアイスで凍結して液体窒素中、または-70

50

で保管した(Cleveland Clinicの実験医学部で)。新しく取り出された前立腺からコアを取り除いた直後に、残りの前立腺組織を、固定のために10%の中性緩衝化ホルマリン中に置いた。固定された組織を、後の組織学的使用のために処理して、パラフィンに包埋した。ここまでで、1385GG(ホモ接合体野生型)の73人(48.7%)；1385GA(ヘテロ接合体)の62人(41.3%)；および1385AA(ホモ接合体変異型)の15人(10%)から構成される、前立腺切除が行なわれた150人の患者の遺伝子型を決定した。これらのヒトから血液生検も採取して血漿に加工し、-70°で凍結した。

【0141】

移行部および辺縁部のコアが液体窒素中に保管されていたCCF解剖病理研究室から直接、ドライアイス上にそれらを受け取った。一旦入手したら、組織をすぐにドライアイスからTRIzol試薬に移し、電動ホモジナイザーを用いて完全に均質化して、製造業者の指示書(Invitrogen)に従いRNA単離のために処理した。次いで、前立腺組織RNAをDNase I消化にかけた。DNase消化後、最大量のRNAを回収するために、抽出したフェノールを、RNaseが存在しないTEバッファで2回逆抽出を行なった。抽出したRNAを-20°、一晩で沈殿させた。製造業者の指示通りに、Oligotex(登録商標)mRNA Midi Kit(Qiagen)を用いて、DNase消化全RNAからpoly A⁺ RNAを単離した。次いで、RIBOGreen定量キット(Molecular Probes)を用いて、poly A+ RNAを測定した。Virochipマイクロアレイ分析のためにドライアイス上に載せる(ship)まで、試料を-70°で凍結させておいた。

【0142】

2. 前立腺RNA由来のcDNAを用いたVirochipの探査

簡潔に、前立腺組織全RNAおよびpoly A⁺ RNAを、一次鎖合成のためにオリゴdTプライマーを用いてcDNAに逆転写した。Cy5フルオロフォアを、標識されていないヌクレオチドの存在下で反応混合物に混合した。試料をCentricon-30マイクロコンセントレーター(Amicon)に通して遠心分離することにより、得られた標識cDNAを精製した。精製したプローブをVirochipマイクロアレイに添加して、少なくとも12時間ハイブリダイズさせた。次いで、ハイブリダイズしたマイクロアレイをストリンジェントな塩溶液を用いて洗浄し、結合していないかまたは非特異的な任意のプローブをアレイから除去した。次いで、スライドを、スキャナーを用いて2~3時間以内に分析して、プローブのアレイへのハイブリダイゼーションの蛍光シグナルを可視化した。アレイハイブリダイゼーションには、前立腺組織全RNA、poly A+ RNA、または水(対照)いずれか由来のCy5標識増幅プローブを用いた。マイクロアレイ上の各スポットに存在する单一の規定された70merのCy3標識逆方向相補鎖バージョンを用いて参照シグナルを生成した。陽性シグナルを対照に対するCy5強度で評価した。

【0143】

前立腺癌組織から単離した全RNAを用いた場合、ハイブリダイゼーション後に得られた結果は、RNase Lについてのホモ接合体変異型(1385AA)であると遺伝子型が決定された14人の患者のうちで9人が陽性シグナルであった。10人の試験されたヘテロ接合体(1385GA)組織のうち0人、および13人の試験されたホモ接合体野生型RNase L(1385GG)前立腺のうち2人で、ウイルスシグナルが検出され、これによりRNase Lがウイルスの複製を抑制するということが示された(表1)。CyS標識プローブは、マウス白血病ウイルス(MLV)DNAに結合した。

【0144】

3. 全長ウイルスcDNAの単離および配列解析

候補ウイルスの完全同一性を確立するために、ハイブリダイゼーション/選択により、ウイルスRNAを前立腺試料から回収した。次いで、この物質を増幅し、クローニングして配列決定した。まず、最大のクローナーはおよそ1.0kbに及び、この断片は3'UTRの保存されたモチーフを含む、ウイルスゲノムの最も3'側のコーディング領域まで及んだ。続いて、患者35由来の全体で8,188 ntのウイルスのゲノムRNA(配列番号:1)の完全クローニングを決定した(表2)。ウイルスゲノムは、gag、pro-polおよびenv遺伝子を有する規範的なガンマレトロウイルスのものである(図3)。全ての3つのオープンリードィング

10

20

30

40

50

フレーム（ORF）は完全なものであるので、感染性のウイルスを生じ得る。ガンマレトロウイルスは、C型の形態を有し、細胞膜で中心、左右対称、球形コアが集合し、マウス白血病ウイルス（MLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）およびテナガザル白血病ウイルス（GALV）を含む多くの公知のレトロウイルス科のメンバーを含有する（Goff, S., et al., Field's Virology, 第4版, (Knipe, D.M. および Howley, P.M., 編) Lippincott Williams & Wilkins. New York. 2001, pp. 1871-1939）。全長ウイルスゲノムデータベース中の最も有意に適合したものは、DG-75として公知の異種栄養性マウスC型レトロウイルス（GI 9628654）（ヌクレオチドレベルで93%同一）である（図4）。DG-75レトロウイルスは、同じ名前のEBV陰性Bリンパ芽球状細胞株の外因性汚染物であると説明された（Raisch KP., et al, Virology 250(1): 135-9, 1998; Raisch KP., et al, Virology 308(1):83-91, 2003）。DG-75細胞株（HAD亜系）の初期継代にはレトロウイルスが存在しないことが見出され、DG-75ウイルスの起源は不明である。DG-75ウイルスから新規に単離されたウイルス（本明細書中で、ヒト異種栄養性ウイルスについてHXV、または他に異種栄養性マウス白血病ウイルス（MLV）関連ウイルスについてXMRVという）の分岐は、二つのウイルスは異なるが関連するということを示す。gag、pro-polおよびenvの配列をコードするHXV₃₅およびDG-75の間の類似性指数は、それぞれ 96.3%、96.3% および 93.8% である（Lipman-Pearsonアライメント）（表3、4および5）。HXVおよびDG-75の分岐は、MHC関連様式でTおよびBリンパ腫を生じるMCF1233すなわちC57BL-由来MLVに最も密接に関連する（Sijts EJ, et al., Virus Res 34(3):339-49, 1994）。MCF1233は、5'領域に多種栄養性配列を伴ったエコトロピック主鎖を有する。次の最も密接に関連する分岐は、典型的なエコトロピックMLV系統、モロニー、ローシャーおよびフレンドを含む。関連するウイルスの別の二次分岐は、テナガザル白血球ウイルス（GALV）と集団を形成する、コアラから単離されたウイルスであるKoRVを含む（Hanger JJ, et al., J Virol 74(9):4264-72, 2000）。これらMLVファミリーのメンバーの全ては、Mus Dunnīの内在性MLVに関連する。

【0145】

HXV₃₅ゲノムは、その5' (nt 1~69) および3' (nt 8116~nt 8184) 末端に69-ntの繰り返し（R）領域を有する。5'R領域の下流は、プライマー結合部位（PBS）が続く76-nt U5領域である（表6）。HXV₃₅ PBSは、プロリンtRNAの最後の18-ntに相補的であり（Itin および Keshet, J. Virol. 54(1):236-239 (1985)）、従ってグルタミンまたはスレオニン（theonine）tRNAに相補的なDG-75 PBSとは異なる（Raisch KP., et al, Virology 308(1):83-91, 2003）。gag pro-pol領域は、gagとpro polを分け、ガンマ-およびイプシロン-レトロウイルスの両方に保存された特徴である单一のUAGストップコドン（ヌクレオチド2223で）により隔てられる（Goff, S., et al, Field's Virology, 第4版, (Knipe, D.M. および Howley, P.M., 編) Lippincott Williams & Wilkins. New York. 2001. pp. 1871-1939, 2001）。プロセッシングされてプロテアーゼ（PR）、逆転写酵素（RT）およびインテグラーゼ（IN）となるpro-polポリペプチドの合成に供される時間のうち5%~10%のストップコドンの読み過ごしがある。gag遺伝子は、プロセッシングされてマトリックス（M）、p12タンパク質、カプシド（CA）およびヌクレオカプシド（NC）タンパク質になる536アミノ酸ポリペプチドをコードする（表3）。スプライシングされたmRNAとして転写されるenvオープンリーディングフレームは、エンベロープ糖タンパク質、表面サブユニット（SU）および膜貫通サブユニット（TM）の645 aa前駆体をコードする（表5）。TMは、ウイルス膜および細胞膜の融合に働く、膜貫通および疎水性融合セグメントを含む。SUは、宿主範囲およびレセプター結合部位の主要な決定因子である。SUタンパク質中に宿主細胞表面レセプターへの選択的結合の原因である超可変配列がある。SUタンパク質中の可変領域Aはレセプター認識に働き、可変領域Bはウイルスをその特異的なレセプターで安定化する（Battini JL, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96(4): 1385-90, 1992; Fass D., et al., Science 277(5332): 1662-6, 1997）。HXV₃₅中のこれらの可変領域は異種栄養系統DG-75にほとんど同一であり、両栄養性およびエコトロピックMLV中のものとは異なる（表7）。異種栄養性MLV系統に対するヒト細胞表面レセプターは、複数回膜貫通型ドメインを含むXPR-1（異種栄養性および多種栄養性レセプター1）である（Battini JL, et al., 10 20 30 40 50

Proc Natl Acad Sci USA. 96(4):1385-90, 1992)。従って、XPR-1はHXVに対する推定上の細胞表面レセプターである。

【0146】

2-5Aシンテターゼは、ウイルスdsRNAによってか、または他の一本鎖RNAのステム構造(stem structures)によって活性化される。例えば、HIV-1 TAR RNAは、インビトロで2-5Aシンテターゼを活性化し得る(Maitra, RK, et al., Virology, 1994, 204(2):823-7)。さらに、RNase Lは効果的にHIV-1の複製を抑制し得る(Maitra, RK, et al., J Virol, 1998, 72(2):1146-52)。HXV₃₅ゲノムRNAのMFOLD推定二次構造を示す(図5)(Zuker M, et al., RNA, 1998, 4(6):669-79)。折りたたまれて二重鎖ステム構造の領域になる内部塩基対の広範囲な領域がある。HXV₃₅RNAを分析して、2-5Aシンテターゼを活性化するのに十分な二重鎖特性を有するか決定する。

10

【0147】

患者組織中のHXVの存在を確認するために、バイオハザードプラスチック容器中の凍結前立腺コア(Virochip分析およびRT-PCRの両方でウイルスについて陽性であると以前に示された患者VP35由来、表1)をCCF外科病理学研究室から入手し、分析のためにUCSFグループに直接送った。該前立腺組織(症例VP35)から単離したゲノムDNAでPCRを行ない、アガロースゲル電気泳動および配列決定によりHXV DNAの存在を確認した。これらの結果により、該ヒト前立腺癌組織中にHXVが存在したことが確認された。さらに、ネステッドRT-PCRパラメーターを開発して、初期レトロウイルス陽性組織の確認および残りのヒト前立腺癌組織中のレトロウイルスの存在のスクリーニングの両方に使用した。二種類のネステッドPCRの条件を設計した。最初の反応には該ウイルスのgag部分の領域(400bp)に特異的なプライマー

20

PCRV-GAG-外側フォワード、5' CGCGTCTGATTTGTTTGTT 3'(配列番号:34);

PCRV-GAG-外側リバース、5' CCGCCTCTTCATTGTTC 3'(配列番号:35);

PCRV-GAG-内側フォワード、5' TCTCGAGATCATGGGACAGA 3'(配列番号:36);

PCRV-GAG-内側リバース、5' AGAGGGTAAGGGCAGGGTAA 3'(配列番号:37)を用い、

二回目には完全ウイルスゲノムの7200bpを増幅するプライマー

(HEMI-ネステッド)

Env 7600外側フォワード、5' CGCTTGGTCCAGTTGTAAAA 3'(配列番号:38);

Env 227リバース、5' TGGGAACTTGAAACTGAGG 3'(配列番号:39);

Env 7200内側フォワード、5' CTAGTGGCACCAACAATTG 3'(配列番号:40)を用いる。

30

【0148】

7600外側フォワードおよび227リバースは、env-LTR領域におけるヘミネステッドPCRのための外側オリゴヌクレオチドプライマーである。7200外側フォワードは、ネステッドプライマーである。RNASELについてホモ接合体変異型(1385AA、R462Q)であると見出された、異なるVP患者からの3つのネステッドRT-PCRのゲル電気泳動により、gag領域を用いたネステッドRT-PCRは3人の患者のうち1人(VP10)でウイルスを検出し得、一方HEMI-ネステッドプライマーは非特異的産物を増幅したことが示される(図6)。PCR産物の配列決定分析により、ウイルスRNAがHXV由来であることが検証された。

40

【0149】

4. ヒト前立腺癌細胞株、LNCaPにおけるHXV関連ウイルスの同定

一般的なヒト前立腺癌細胞株(PC3、LNCaPおよびDU 145)または正常前立腺上皮細胞(PrEC、Clonetics Co.)がHXVまたは密接に関連するウイルスを含むかどうか決定するために、HXVの領域をコードするenvタンパク質内の保存された700bp領域に特異的なプライマーを用いて、これらの細胞由来のRNAでRT-PCRを行なった(図7)。ランダムヘキサマープライマー(Applied Biosystems)を用いてRTを行なった。続けて、HXVの保存された700bp領域に特異的なプライマー(ウイルスフォワード、5' GTT TAT GGC CAG TTT GGA AA 3'(配列番号:41);ウイルスリバース、5' GCC TTA TGG TGG GGT CTT TC 3'(配列番号:42))を用いて産生されたcDNAでPCRを行なった。陽性対照として、GAPDHエクソン8特異的プライマーを用いた。アガロースゲル電気泳動で分析した場合、結果は、LNCaP細胞(ウ

50

イルス700bp)のみからのHXV-関連env産物について、正しい大きさのバンドを示した。GA PDH DNA産物(391bp)は、全細胞株由来のRT-PCR反応物に存在した(図6)。興味深いことに、LNCaP細胞株は、RNase Lの不活性型欠損変異体についてヘテロ接合体(4710 AAAG)であり、R462Qについてヘテロ接合体である。対照的に、PC3、DU 145およびPrECは野生型RNase Lを有する(Xiang Y., et al., Cancer Res. 2003, 63(20):6795-801; Malathi K., et al., Cancer Res. 64(24):9144-51, 2004 et al., 2004)。従って、本明細書に記載された結果は、RNase LがHXV感染または複製を抑制することを示す。LNCaP由来のenv PCR断片を、pGEM(登録商標)-T Easy Vector(Promega)にクローニングして、シークエンスを行いヒト前立腺組織試料に見られたウイルス配列に対する配列類似性を決定した。BLASTを用いたLNCaPウイルスenv遺伝子の675 ntセグメントの配列アライメントの後、LNCaPウイルスは、ヌクレオチドレベルおよびアミノ酸レベルの両方で、基本型ウイルスHXV35に97%相同であることが見出された(表8)。精製したPCR断片を含有する同一のプラスミドをさらに3回配列決定して、DNA配列解析に誤りがあるかどうか決定した。それにより、LNCaP細胞由来のウイルスは、この特定の長さ700bpを通じておよそ3~4%異なることが確認された。この変異の結果であるRNase Lの不活性化によりHXV関連ウイルスがLNCaP細胞に感染し複製することが可能になると思われる。

【0150】

逆転写酵素活性を有するレトロウイルス粒子が、これらのウイルス感染LNCaP細胞の培地に放出されるかどうかを調べるために、感染LNCaP細胞の組織培地を、逆転写酵素活性について2、4および8日のインキュベーションでアッセイした。このアッセイには、鑄型として合成ホモポリマーポリリボアデニル酸[ポリ(rA)]、およびプライマーとしてオリゴデオキシチミジル酸[オリゴ(dT)]を用いる。組織培地をこのプライマー鑄型および⁻³²P-dTTPを用いてインキュベートし、得られたdTTP取り込みを、反応アリコートをDEAEペーパー上にスポットし、取り込まれなかったdTTPを洗い流すことでモニターした。希釈されないかまたは希釈されたLNCaP培地のアリコートを乾燥DEAEペーパー上にスポットし、赤外線灯の下で30分間乾燥させた。培地を含まない偽反応物を陰性対照として用いた。ペーパーを2X SSCで3回洗浄し、95% EtOHで2回、簡単にすすぎ、赤外線灯の下で乾燥させた。該ペーパーをプラスチックで包装し、70°で12時間、X線フィルム(Kodak)に暴露させた。結果は、LNCaP組織培地は活性な逆転写酵素を含むが、偽対照はバックグラウンドとして取り込まれなかった³²P-dTTPのみを示したことを示す(図8)。また、レトロウイルスに特異的なプライマーを用いたRT-PCR分析により示されるように、DU145細胞中に存在するウイルスの量は感染後のLNCaP中の量よりも少なかったが、感染LNCaP細胞由来の培地は、未感染LNCaPおよびDU145細胞の両方に感染し得ることも示された。DU145は、RNase Lについてホモ接合体野生型である(Xiang Y., et al., Cancer Res., 2003, 63(20):6795-801)。感染後のこれらの細胞に存在するウイルス量の差は、DU145細胞には存在せず、LNCaP細胞株中に見られるRNase Lの変異のためであり得る。LNCaP中のRNase L酵素欠損により、ウイルスがRNase Lの抗ウイルス効果から免れることができになり得るが、一方でDU145細胞のウイルス負荷は、完全に機能的なRNase Lを有するこれらの細胞のために減少する。

【0151】

5. 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)法による前立腺癌組織中のHXV核酸の同定

前立腺中のHXV DNAの存在を直接示すために、前立腺切除により採取し、続いてホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋したヒト前立腺組織でFISHを行なった。RT-PCRおよび配列解析によりウイルスの準種(quasispecies)を有することが確認されたLNCaP細胞株を、陽性対照として用い、ウイルスについて陰性であると見出されたPC3およびDU145を陰性対照として用いた。3種類の細胞株から細胞片(cytoblock)を調製した。およそ10⁹個の細胞を、フェノールレッドまたはCa⁺⁺およびMg⁺⁺を含まないハンクス平衡塩溶液(HBSS)(GIBCO)で洗浄し、10%中性緩衝化ホルマリンで、緩やかにではあるが完全に再懸濁した。次いで、細胞懸濁物を4°で一晩固定した。次いで、細胞を遠心分離し、HBSSで2回

10

20

30

40

50

洗浄した。上清を吸い取り、細胞を一滴のHBSSで再懸濁した。次いで、細胞懸濁物を細胞片カセットのウェルにピペットで移した。固定した細胞培養片を、24時時間以内に処理を行うために組織学研究室に送った。次いで、処理された細胞片をパラフィンブロックに包埋し、4~6 μmの厚さの切片にカットしてスルーパーフロストスライドガラスに並べ、60~65°で少なくとも4時間ベーキングして細胞のスライドガラスへの接着を確実にした。

【0152】

HXV_{VP35}FISHプローブを、pGEM(登録商標)-T Easy VectorにクローニングされたウイルスゲノムVirus 2345フォワード、5' ACC CCT AAG TGA CAA GTC TG 3' (配列番号:43) ; Virus 4495リバース、5' CTG GAC AGT GAA TTA TAC TA 3' (配列番号:44) の2.15kb断片を用いて作製した。EcoRIを用いて組換えベクターを制限酵素処理し、2.15kbウイルスcDNA断片を切り出し、FISHプローブ作製のために精製した(Qiagen)。精製2.15kbウイルスcDNA挿入部分を、蛍光標識プローブの生成の製造業者の指示書に記載の通りに、ニックトランスレーション反応(Vysis Inc.)に用いた。およそ250bpの大きさのプローブをアガロースゲルで測定した。プロッキング剤として、試料にヒトCOT1-DNA(Vysis Inc.)およびヒト胎盤DNA(Sigma)を添加した。次いで、プローブを沈殿させ、ヌクレアーゼが存在しない水に再懸濁した。取り込みを測定するために、沈殿工程由来の上清の蛍光放射を再懸濁プローブの蛍光放射と比較した。平均SpectrumGreen-dUTP取り込みを19%であると測定した。

【0153】

約4 μmの切片にカットし、新たにベーキングしたLNCaP、DU145およびPC3スライドガラスを、まず連続キシレン洗浄により脱パラフィンした。次いで、脱パラフィンしたスライドガラスを濃度低下エタノール系列に通して再水和した。再水和した組織を標的修復(target retrieval)にかけ、H₂Oですすいだ。プロティナーゼK(Dako)を、室温で10分間スライドガラスに直接付した。組織を再びH₂Oですすぎ、上昇エタノール濃度の溶液に通して脱水した。プローブの光漂白を最小限にするために、光量を下げて残りの工程を行なった。新たに乾燥させたスライドガラス上に、プローブ混合物[3 μlプローブ + 7 μlハイブリダイゼーションバッファ(Vysis Inc.)]を付した。脱気してラバーセメントで封入したスライドガラスにカバーガラスをかけた。プローブおよび標的DNAをVysis Hybrite(Vysis)を用いて共に変性した(codenatured)。湿潤で遮光性のチャンバー内で、37°で一晩、ハイブリダイゼーションを起こした。翌日、スライドガラスを2X SSCに浸漬してカバーガラスを外した。次いで、スライドガラスを3秒間激しく揺らし、57°で2X SSC洗浄液中で1分間インキュベートした。次いで、スライドガラスを、室温で2X SSCの後蒸留水で緩やかにすすぎ、風乾させた。DAPI含有Vectashield Mounting Medium(Vectashield Inc.)対比染色液を乾燥した組織にかけ、カバーガラスをかけた。

【0154】

結果は、陽性の蛍光緑色シグナルが、LNCaP細胞の細胞質および核の両方に見られ、DU145およびPC3細胞にはシグナルが観察されなかったことを示す(図9)。これらの結果は、ウイルスがLNCaP細胞に存在し、DU145またはPC3細胞株には存在しないことを示したRT-PCRのデータと相關する。細胞質内で観察された濃い染色は、いくらかのプローブがウイルスRNAおよびDNAに結合していることを示した。組織のRNase前処理を行った後、細胞質内のかなりの量の標識が減少し、RNAハイブリダイゼーションが確認され、細胞質内の標識が、RNAに結合するプローブおよび取り込まれなかつたウイルスDNAであり得ることが示された。RNase消化後のDNase消化により、細胞質および核の両方の蛍光シグナルが完全に消え、ウイルスDNAへのプローブのハイブリダイゼーションが特異化された(示さず)。続く実験では、ヒト前立腺組織のDNaseまたはRNase前処理を行なわなかつた。結果として、患者組織中でプローブが任意のウイルス配列(RNAまたはDNA)にハイブリダイズする可能性が維持された。

【0155】

ヒト前立腺癌組織マイクロアレイ(TMA)スライドを用いた最初の実験の結果(図10)は、HXV DNAプローブに特異的なハイブリダイゼーションを有する細胞のおよそ1%、およ

10

20

30

40

50

びこれらの陽性のものはUCSF群によるRT-PCRによって、ウイルスについて陽性であると見出された患者中に存在することを示す（表9）。スライドをマスク試験で検査し、FISH実験の調査を先入観のないものにした。任意のカットオフ値を、FISHの結果の定量に代入した。陽性のFISHの結果のモニタリングのガイドラインは、以下：
- < 1個の陽性細胞 / 500個の数えた細胞 = - ;
+ 1 ~ 2個の陽性細胞 / 500個の数えた細胞 = +/- ;
++ 3 ~ 4個の陽性細胞 / 500個の数えた細胞 = + ;
+++ 5 ~ 6個の陽性細胞 / 500個の数えた細胞 = ++、である。陽性のFISHの結果には、UCSF群によるRT-PCRの結果と相関があった。RT-PCRによりHXV陽性であると見出された患者由来の8種類の組織のうち、5種類で陽性ハイブリダイゼーションが見られたが、一つの組織（VP3 1）は、RT-PCRではウイルスについて陽性であるとはされずに、FISHについて「++」であると決定された。FISHを用いて8種類の陽性のうちの5種類のみが得られることの可能性のありそうな説明は、FISH法の検出限界より低いウイルス数を生じる、RT-PCR分析に用いられる組織のウイルスの頻度と比較した、分析される特異的な組織生検中のウイルスの頻度における差であり得る。あるいは、組織の回収および処理の間に、RNAまたはDNAの分解を生じる技術的な問題にも出くわし得る。

10

【0156】

6. アフィニティ精製された新規の抗HXVペプチド抗体によるHXVの検出。

感染した細胞および組織におけるHXV gagタンパク質を検出するため、新規抗体が生成された（Open Biosystems, Inc.）。HXV35 gagタンパク質からハイドロパシープロットを生成し、HXV35 gagタンパク質から以下のペプチド：

20

MA : DVKKRRWVTFCSE (配列番号：7) (抗体401)

CA : EAGKAVRGNDGRPTQL (配列番号：8) (抗体402)

NC : KDCPKKPRGPRGPR (配列番号：9) (抗体403)

を免疫原として選択した（図11）。

【0157】

ウサギで抗体を生成し、続いて固定化されたタンパク質に対する結合およびそれからの溶出により、アフィニティ精製した（Open Biosystems, Inc.で開発されたプロトコルに従って）。MA（401）およびNC（403）に対する抗体はHXV関連感染LNCaP_R細胞からのgagの検出に良好であった（図12）。

【0158】

結論

30

腫瘍性前立腺に存在する新規のガンマレトロウイルス、HXVの発見が本明細書に記載される。前立腺がHXVを含有している割合は、RNase Lについて野生型またはヘテロ接合体である患者（< 10%）よりも、RNase Lのホモ接合体R462Qバリエントを有する患者（HPC1）（60%）で有意に高い。従って、この疾患におけるHXVの潜在的な関係は、主に、RNase Lの遺伝子、候補前立腺癌感受性遺伝子（HPC1）におけるホモ接合体生殖系変異を有する患者の前立腺におけるHXVの高い発生率に基づく。この相関以外に、HXV感染が前立腺発癌に寄与するという証拠は以下の通りである。一つの群として、レトロウイルスは、免疫欠損、白血病および神経性疾患を含む、広範囲の異なる疾患の原因である（Goff, S., Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication, 「Field's Virology」, 第4版の57章. (Knipe, D.M. およびHowley, P.M., 編). Lippincott Williams & Wilkins. New York, pp. 1871-1939, 2001）。にもかかわらず、単純レトロウイルスの多くは比較的良性であり、さらに遺伝子治療のベクターの骨格として広く使用される。レンチウイルス、HIV-1、およびいくつかのトリレトロウイルス等の比較的少数のレトロウイルスが細胞障害性である。他のもの、すなわち急性トランストーミングレトロウイルスは、潜伏期間がない状態では攻撃的な腫瘍を生じる宿主遺伝子を含有する。しかし、ほとんどのレトロウイルスは、細胞障害性でなく、細胞の複製または生理学に最小の影響を有する。これらのレトロウイルスは、多くの他のウイルスとは違い、細胞の複製能のほんの小さな部分を使用する。インビオにおいて、低いレベルのウイルス血症はしばしば起こっており、動物の生涯にわたり永続的である。しかしながら、細胞障害性ではない場合であっても、レトロウイルスは、細胞分裂または細胞の生存の制御を変更する挿入突然変異によって疾患を引き起

40

50

こす。これらのDNA挿入事象は、内在性のプロトオンコジーンを活性化し得、発癌を引き起こし得る。疾患過程は、マウス乳癌ウイルス（MMTV）の場合のように非常に遅いものであり得る。HXVは、緩やかな成長および長い潜伏期間を特徴とする、単純な、複製能を有するレトロウイルスの後者の部類のメンバーであり得る。主に単純レトロウイルスは、目下HXV感染に関わるようなものではない、白血病またはリンパ腫の疾患に関係する。ホモ接合体RNase L (R462Q) の症例であったとしても、HXV感染前立腺細胞の数は低い（およそ1%）（表9）。HXVの癌への潜在的な寄与は、増殖性炎症性萎縮症、前立腺の上皮内新形成および上皮内癌の疑いのある前駆体を生じる遅い感染のためであり得る（Nelson WG, et al., N Engl J Med, 349(4):366-81, 2003）。感染した細胞は、数は少ないが、成長因子、サイトカインまたは細胞増殖に間接的に寄与する他の因子を産生し得る（Brightman BK, et al., J Virol., 1990 Sep;64(9):4582-4）。この機構に関わらず、HXVによって生じる任意の発癌は何年も経過して発生する多段階的なプロセスとして発生すると思われる。前立腺癌が通常65歳以降まで現れない老化の疾患であるという事実は、慢性または再発性炎症を引き起こすスローウイルスと一致する。

【0159】

実施例1に記載された一般的な概観は、以下の実施例2および3にさらに十分に詳述される。

【0160】

実施例2 R462Q RNASELバリエントについてホモ接合体である患者の前立腺腫瘍における特徴的なガンマレトロウイルスゲノムの同定

RNase Lは先天性の抗ウイルス応答の重要なエフェクターである。RNase Lの機能を欠損する変異またはバリエント、特に、R462Qは、前立腺癌の感受性因子であると提唱されている。本明細書で示すように、ウイルス感染は、R462Qバリエントを有する個体において前立腺癌に寄与する可能性がある。前立腺腫瘍由来のランダムに増幅したcDNAを、ウイルス配列の存在について、全ての公知のウイルスのほとんどの保存された配列に対応するオリゴヌクレオチドから構成されるDNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーションにより、アッセイした。レトロウイルス配列の存在が、11のR462Q-ホモ接合体（QQ）の患者のうちの7、および8のヘテロ接合体（RQ）およびホモ接合体野生型（RR）の患者のうちの1のマイクロアレイにより明らかにされた。二人のQQ患者の腫瘍組織由来の全長ウイルスゲノムをクローニングして配列決定した。該ウイルスは、異種栄養性マウス白血病ウイルス（MuLV）と密接に関連しているが、その配列は、このグループの全ての公知のメンバーとは明らかに違っている。回収された配列をもとに、特異的なRT-PCRアッセイを開発し、腫瘍組織の試験を全部で86症例にまで広げた。66のRQおよびRR症例のうち一つの試料（1.5%）のみと比較して、20のQQ症例のうち8（40%）が陽性であると見られた。異なる腫瘍単離物由来のgagおよびpol配列の比較により、全ての症例において同じウイルスの感染が示されたが、配列のバリエーションは独立して獲得された感染に一致していた。これらのデータは、異種栄養性MuLV関連ウイルスが確実なヒト感染を生じ得るということをまず説明し、RNase L活性をインビボにおける感染の予防または除去に強く関連付けさせる。これらの発見はまた、遺伝的に感染しやすい個体における外因性の感染と癌の発生との関係を説明する。

【0161】

材料および方法

患者の遺伝子型決定および前立腺組織の処理

本試験に使用した全てのヒト試料は、Cleveland Clinic's Institutional Review Boardに承認されたプロトコルに従って入手した。Cleveland Clinicで前立腺切除を行なうことが予定されたヒトを、末梢血单核細胞（PBMC）から単離したDNAに既製の（premade）TaqMAN遺伝子型決定アッセイ（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Assay c_935 391_1）を用いて、R462Q (1385G->A) RNASELバリエントについて遺伝子型決定した。5 ngのゲノムDNAを製造業者の指示書に従ってアッセイし、Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System機器で分析した。前立腺切除の直後に、組織コアを移行領域（良

10

20

30

40

50

性前立腺肥大、BPHの部位)および辺縁領域(一般に癌が生じる場所)の両方から取り出し、液体窒素ですばやく凍結し、次いで-80℃で保管した。残りの前立腺組織を、10%の中性緩衝化ホルマリンで固定し、後の組織学的分析のために処理して、パラフィンに包埋した。凍結した組織コアを、すぐにドライアイスからTRIZOL試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に移し、電動ホモジナイザーを用いて、または外科用メスその後注射器を用いて手動で均質化して、全RNAを、製造業者の指示書に従い単離した。次いで、前立腺組織RNAを37℃で30分間、RNaseが存在しないDNase I(Ambion, Austin, TX, USA)消化にかけた。次いで、試料をフェノールで抽出し、-20℃、一晩でイソプロパノールを用いてRNAを沈殿させ、4℃で12,000 g、30分間の遠心分離を続けた。Oligotex mRNA Midi Kit(Qia gen USA, Valencia, CA, USA)を用いて、製造業者の指示通りにDNase消化した全RNAからPoly-A RNAを単離した。RIBOGreen定量キット(Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて、poly-A RNA濃度を測定し、試料を-80℃に保管した。

10

20

30

40

50

【0162】

マイクロアレイスクリーニング

この試験に使用したVirochipマイクロアレイは、先に記載したものと同一のであった(Wang D, et al., 2002, Proc Natl Acad Sc. USA 99: 15687-15692; Wang D, et al., 2003, PLoS Biol 1:E2; Urisman A, et al., 2005, Genome Biol 6:R78)。前立腺腫瘍RNA試料は、改良Round A/BランダムPCR法を用いて増幅および標識し、先に報告したようにVirochipマイクロアレイにハイブリダイズさせた(Wang D, et al., 2003, PLoS Biol 1:E2)。マイクロアレイをAxon 4000Bスキャナー(Axon Instruments, Union City, CA, USA)で走査して、束ねられた(bundled)GenePix 3.0ソフトウェアを用いてグリッド化した(grid)。マイクロアレイのデータをNCBI GEOデータベースに寄託した(GSE3607)。先述のようにE予測(Predict)を用いてハイブリダイゼーションのパターンを解釈した(Urisman A, et al., 2005, Genome Biol 6:R78)(表12)。図22A~22Bを作製するために、全てのレトロウイルスオリゴヌクレオチド(205)のバックグラウンドを差し引いたハイブリダイゼーション強度を用いて、試料およびオリゴヌクレオチドをクラスター化した。Cluster(v. 2.0)を用いて、類似性測定基準としてピアソン相関(Pearson correlation)により平均連鎖階層的クラスタリング(Average linkage hierarchical clustering)を行なった(Eisen, MB., PNAS 95:14863-14868(1998))。Java TreeView(1.0.8版)を用いて、クラスターイメージを生成した(Saldanha, AJ., 2004, Bioinformatics 20: 3246-3248)。

【0163】

ゲノムクローニングおよび配列決定

VP35腫瘍試料由来の、増幅および標識したcDNAを、数種のレトロウイルスオリゴヌクレオチドを含有する、手動でスポットしたマイクロアレイにハイブリダイズさせると、最初のマイクロアレイスクリーニングの間にVirochip上で高いハイブリダイゼーション強度を有した。次いで、二つのオリゴヌクレオチド(MTCR: TTC GCT TTA TCT GAG TAC CAT CTG TTC TTG GCC CTG AGC CGG GGC CCA GGT GCT CGA CCA CAG ATA TCC T(配列番号:45)由来の9628654_317 rc; および脾限局巣形成ウイルス(Spleen focus-forming virus): TC G GAT GCA ATC AGC AAG AGG CTT TAT TGG GAA CAC GGG TAC CCG GGC GAC TCA GTC TGT CG G AGG ACT G(配列番号:46)由来の9626955_16 rc)にハイブリダイズする核酸を、個々にスポットの表面に溶出し、Round BプライマーでPCRにより増幅した。手動でスポットされるアレイの調製、ハイブリダイゼーション、プローブ回収、および回収した物質のPCR増幅を行なった。次いで、回収され、増幅されたDNA試料をpCR2.1-TOPO TAベクター(Invitrogen)にクローニングし、得られたライプラリーを、プローブとして、対応する上述のオリゴヌクレオチドを用いてコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。製造業者のプロトコルに従いRapid-Hybバッファ(Amersham, Piscataway, NJ, USA)を用いて、50℃、4時間で、ハイブリダイゼーションを行なった。8個の陽性クローンの配列決定を行ない、その二つ(各ライプラリーから一つずつ、図23AのクローンK1およびK2R1)はウイルス性であり、MTCRに対して94~95%のヌクレオチド同一性を有した。

【0164】

VP35ゲノムの残りおよびVP42腫瘍由来の全ゲノムの配列決定のために、ゲノムの断片を、オリジナルVirochipスクリーニングのために調製した増幅 (Round B) または非増幅 (Round A) cDNAのいずれかを用いてPCRにより増幅した。まず、MTCR (GenBank : NC 001702) の配列由来のプライマーおよび早期に回収したXMRVのクローンの組合せを用いてこれを完成させた；全プライマーは表11に列挙する。増幅した断片をpCR2.1 -TOPO TAベクター (Invitrogen) にクローニングし、M 13配列決定プライマーを用いて配列決定した。Linux用のCONSED 13.84版を用いてゲノムアセンブリを行なった (Gordon, D., et al., 1998, Genome Res 8: 195-202)。XMRV VP35およびVP42の集合化されたゲノムの配列をGenBankに寄託した (受託番号DQ241301およびDQ241302)。

10

【0165】

PCR

gagネステッドRT-PCRにより、腫瘍試料のスクリーニングを、プロトコルS3に従って行なった。全ての陽性症例のPCR断片を、QIAEX II ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲル精製し、pCR2.1-TOPOT TAベクター (Invitrogen) にクローニングし、M13配列決定プライマーを用いて配列決定した。鋳型として増幅したcDNA (Round B物質) を用いてPol PCRを行なった。増幅に使用したプライマー (2670F、3870R、3810Fおよび5190R) の配列を表11に列挙する。増幅産物を、QIAEX II ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲル精製し、精製した産物を直接配列決定に用いた。

20

【0166】

系統発生的分析

全長ゲノムの近隣結合系統樹 (neighbor joining tree) (図24) を以下のように作製した。まず、XMRV VP35 (GenBank : DQ241301) およびVP42 (GenBank : DQ241302) 、MTCR (GenBank : NC 001702) 、MuLV DG-75 (GenBank : AF221065) 、MuLV MCF1233 (GenBank : U13766) 、AKV MuLV (GenBank : J01998) 、フレンド MuLV (GenBank : NC 001362) 、Rauscher MuLV (GenBank : NC 001819) 、モロニー MuLV (GenBank : NC 001501) 、ネコ白血病ウイルス (GenBank : NC 001940) 、テナガザル白血病ウイルス (GenBank : NC 001885) 、およびコアラレトロウイルス (GenBank : AF151794) のゲノムを手作業で編集して全ゲノムを同じ長さにした、すなわちR対R。次いで、編集した配列を、デフォルト設定を用いて、Linux用ClustalX 1.82版により整列した (Thompson, JD., et al., 1997, Nucleic Acids Res 25: 4876-4882; Jeanmougin, F., et al., 1998, Trends Biochem Sci 23: 403-405)。ギャップがない位置に基づいた系統樹のみを作製し、複数塩基置換についてKimura補正 (correction) (Kimura, M., 1980, J Mol Evol 16: 111-120) およびN=1000のブートストラップも使用した。

30

【0167】

異なる患者由来のgagおよびpol断片の近隣結合系統樹 (図27A～27B) を上述のように作製し、ただのMuLVゲノム以外を含んだ。

【0168】

Gag-Pro-Pol (図29A) およびEnv (図29B) ポリプロテインの近隣連結系統樹は、上述の12ゲノムのGenBank記録から取り出したタンパク質配列のアライメントに基づき、上述のように作製し、gap以外を含み、Kimura補正是用いなかった。

40

【0169】

略語

2'-5Aは5'-リン酸化2'-5'オリゴアデニレート；CAT-Iは陽イオン性アミノ酸トランスポーター；FLVはネコ白血病ウイルス；GALVはテナガザル白血病ウイルス；GREはグルココルチコイド応答因子；HPCは遺伝性前立腺癌；IFNはインターフェロン；KoRVはコアラレトロウイルス；MCF1233はミンク細胞フォーカス誘導1233マウス白血病ウイルス；MuLVはマウス白血病ウイルス；MTCRはマウスC型レトロウイルス；NZB-9-1はニュージーランドブラック9-1異種栄養性ウイルス；OASは2'-5'オリゴアデニレートシンテターゼ；QQはRNASELホモ接合体R462Q；QRはRNASELヘテロ接合体R462Q；RNase LはリボヌクレアーゼL；RRはRNAS

50

ELホモ接合体野生型；SCLCはヒト小細胞肺癌；SYG 1は酵母gpa1の抑制因子；VRAは可変領域A；VRBは可変領域B；XMRVは異種栄養性MuLV関連ウイルス；XPR1は異種栄養性および多種栄養性レトロウイルスレセプターである。

【0170】

結果

マイクロアレイ系スクリーニングによるXMRVの検出

前立腺癌腫における潜在的ウイルスを探索するために、設計されたDNAマイクロアレイ系戦略を用いて、全ての公知のウイルス族由来のウイルスについてスクリーニングした (Wang D, et al., 2002, Proc Natl Acad Sci. USA 99: 15687-15692; Wang D, et al., 2003, PLoS Biol 1: E2)。腫瘍組織から抽出した全RNAまたはポリアデニル化RNAを、まず增幅し、配列非特異的な様式で蛍光標識した。次いで、宿主および潜在的ウイルス配列を含む増幅および標識された断片を、約950の完全に配列決定されたNCBI参照ウイルスゲノム（約11,000の70merオリゴヌクレオチド）の最も保存された配列を有するDNAマイクロアレイ (Virochip) にハイブリダイズさせた。10

【0171】

該Virochipを用いて、19の個体の前立腺腫瘍から単離したRNA試料をスクリーニングした（図22A）。ガンマレトロウイルスを示す陽性ハイブリダイゼーションシグナルは、R46 2Q RNASELバリエント（QQ）についてホモ接合体の患者由来の11の腫瘍のうち7つで検出された。対照的に、RQヘテロ接合体由来の3つの腫瘍ではウイルスは検出されず、RR個体由来の5つの腫瘍のうち1つだけが陽性であった。マイクロアレイオリゴヌクレオチド強度のクラスタリング（図22A）によると、全ての陽性の症例において同様のハイブリダイゼーションパターンが示された。さらに、E予測を用いたコンピューター解析は、近年、ウイルス種同定のためのアルゴリズムを説明し (Urisman, A., et al., 2005, Genome Biol 6: R78)、いくつかの密接な関係のある哺乳動物ガンマレトロウイルスに最も高い可能性を与え、同一または同様のウイルスが全ての陽性腫瘍中に存在したことが示された（表12）。従って、Virochipは、ほぼ半分のQQ腫瘍試料およびわずか一つの非QQ試料において可能性のあるガンマレトロウイルスの存在を検出した。20

【0172】

XMRVゲノムの特徴

ウイルスをさらに特徴付けるために、その全ゲノムを腫瘍の1つ（VP35）から回収した（図23A～23C）。ウイルスのクローンを得るために、前記した直接マイクロアレイ回収法を最初に使用した (Wang, D., et al., 2003, PLoS Biol 1:E2)。簡単に、ウイルスのマイクロアレイオリゴヌクレオチドにハイブリダイズした腫瘍組織からの増幅した核酸を、2つの特定のスポットから抽出した。抽出したDNAを再増幅し、この物質から構成されたプラスミドライブラーを、スポットオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。この場合に用いられたアレイオリゴヌクレオチドは、マウスC型レトロウイルス (MTCR; GenBank: NC_001702) のLTR領域および脾限局巣形成ウイルス (GenBank: NC_001500; (Clark, S.P., et al., 1983, Proc Natl Acad Sci USA 80: 5037-5041) 由来であった。回収された最大の断片は415ヌクレオチド長であり、MTCRすなわちマウス骨髄腫細胞株のゲノムにおいて同定されたMuLVのLTR領域に対して96%のヌクレオチドの同一性を有した (Heinemeyer T; 未発行)。これらの発見は、問題のウイルスが実際にガンマレトロウイルスであり、マウス白血病ウイルスの同系統の可能性があることを確立した。ウイルスのゲノムの残りをクローニングおよび配列決定するために、MTCR由来のプライマーを用いて重複する切片をPCR-増幅するために腫瘍cDNAを用いた；先に回収されたクローンからのプライマーを用いてギャップを閉じた（図23A～23C）。同様のストラテジーを用いて、第二の腫瘍VP42からのウイルスの全配列もまた決定した。2つのゲノムは全体で>98%のヌクレオチドの同一性、および予想したオープンリーディングフレーム (ORFs) に対し>99%のアミノ酸 (aa) の同一性を共有するので、同一のウイルスを表す。30

【0173】

40

50

ウイルスの全ゲノム（図23A～23Cおよび28）は8185ヌクレオチド長であり、MuLVの全ての公知の分離物と異なる。ゲノムは、ヒトB-リンパ芽球様細胞株からクローニングしたMuLV DG-75 (GenBank: AF221065, (Raisch, KP., et al., 2003, *Virology* 308: 83-91) のゲノム、およびMTCRのゲノムに最も類似し、それぞれ94および93%全ヌクレオチド配列の同一性を共有する。入手可能な哺乳類のC型レトロウイルスのゲノムを用いて作成した系統樹（図24および29A～29B）は、新規に同定されたウイルスがエコトロピックゲノムよりも異種栄養性および多種栄養性ゲノムに類似することを示した。これらの発見に基づいて、この外的病原因子に対する仮の名前「異種栄養性MuLV-関連ウイルス」（またはXMRV）が提案された。

【0174】

10

ORFファインダー(Finder)を用いたXMRVゲノム配列の翻訳(Wheeler, DL., et al., 2003, *Nucleic Acids Res* 31: 28-33)は、完全長Gag-Pro-PolおよびEnvポリタンパク質をコードする2つの重複するORFを同定した。ウイルスの腫瘍遺伝子など、外因性コード配列はXMRVゲノムにおいて検出できなかった。予想されたGag-Pro-Polポリタンパク質は1733 aa長であり、MuLV DG-75と最も高いaaの同一性(95%)を有する（図29A）。アンバー(UA G)終止コドンは、完全長Gag-Pro-Polポリタンパク質を生成するために翻訳の読み過し(read-through)が必要である他のMuLVに相同する536 aa Gagおよび1197 aa Pro-Pol ORFに分離する(Wills, NM., et al., 1991, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6991-6995を参照）。

【0175】

20

他のMuLVと同様(Clark, SP., et al., (1983), *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5037-5041; Raisch, KP., et al., (2003), *Virology* 308: 83-91; Herr, W., 1984, *J Virol* 49: 471-478; O'Neill, RR., et al., (1985), *J Virol* 53: 100-106; Perryman, S., 1991, *Nucleic Acids Res* 19: 6950; Shinnick, TM., et al., (1981), *Nature* 293: 543-548; Sjts, EJ., et al., (1994), *Virus Res* 34: 339-349)、XMRVのEnvポリタンパク質はGag-Pro-Polと比較して異なるリーディングフレーム中に存在する。Envタンパク質配列は645 aa長であり、ヒト小細胞肺癌(SCLC)株NCI-417 (GenBank: AAC97875; (Antoine, M., et al., (1998), *Virus Genes* 17: 157-168))より単離された感染性MuLVおよびMuLV NZB-9-1 (GenBank: K02730; (O'Neill, RR., Buckler et al., (1985), *J Virol* 53: 100-106))のEnvタンパク質とそれぞれ95%および94%の最も高いアミノ酸の同一性を有する。envサブゲノムRNA(Coffin, JM., et al., (1997), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press)の生成に関する保存的スライスドナー(AGGTAA G(配列番号:47)、204位)およびアクセプター(CACTTACAG(配列番号:48)、5479位)の部位を、他のMuLVゲノムと同一の関連位置に見出した。XMRV Envの多数の配列アライメントおよび他のガンマレトロウイルスの対応するタンパク質配列(図25)は、細胞指向性(Battini, JL., et al., (1992), *J Virol* 66: 1468-1475; Tailor, CS., et al., (2003), *Curr Top Microbiol Immunol* 281: 29-106)にとって重要であることが公知の2つの大きな可変領域(VRAおよびVRB)内において、XMRVがMuLV DG-75およびMuLV NZB-9-1異種栄養性エンベロープと高いaaの同一性(VRAに対して87%、VRBに対して78%)を共有することを示した。この発見に基づいて、XMRVに対する細胞受容体は、異種栄養性および多種栄養性MuLVに対して最近同定された受容体であるXPR1(SYGI)(Battini, JL., et al., (1999), *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1385-1390; Tailor CS, et al., (1999), *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 927-932; Yang, YL, et al., (1999), *Nat Genet* 21: 216-219)であることが予想された。

30

【0176】

40

XMRVの長い末端反復LTRは535ヌクレオチド長であり、MTCRのLTR(96%)およびMuLV NZB-9-1のLTR(94%)と最も高いヌクレオチドの同一性を有する。XMRVのLTRは、他のMuLVのLTRを代表する公知の構造エレメントおよび調節エレメントを含む(Coffin, JM, et al., (1997), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Temin, HM, (1981), *Cell* 27: 1-3) (図28)。特に、CCAAT(配列番号:49)ボック

50

ス、TATAAAA(配列番号:50)ボックス、およびAATAAA(配列番号:51)ポリアデニル化シグナル配列を、U3において期待される位置で見出した。U3はまた、グルココルチコイド応答配列(GRE)AGA ACA GAT GGT CCT(配列番号:52)を含む。本質的に同一な配列が他のMuLVのゲノムに存在する。これらのエレメントは、アンドロゲンを含む種々のステロイドに反応して、インビトロでのLTR指向(directed)転写およびウイルス複製を活性化することを示した(Celander, D, et al, (1988), J Virol 62: 1314-1322; Speck, NA, et al, (1987), Mol Cell Biol 7: 1101-1110; DeFranco, D, et al, (1986), Mol Cell Biol 6: 993-1001; Miksicek, R, et al, (1986), Cell 46: 283-290)。さらに、そのままのGREの存在は、雌のNMRIマウスと比較して雄のFIS-2 MuLV感染に対するより高い感受性の決定因子と考えられる(Bruland, T, et al, (2003), J Gen Virol 84: 907-916; Bruland, T, et al, (2001), J Gen Virol 82: 1821-1827)。

10

20

30

40

50

【0177】

U5の末端からgagのATG開始コドンまで伸長する配列として定義された、XMRVの5' gagリーダーは、プロリンtRNAプライマー結合部位ならびにウイルスのパッケージングおよび翻訳の開始に必要な配列(Adam, MA., et al, (1988), J Virol 62: 3802-3806; Fisher, J., et al, (1998), Virology 244: 133-145)を含む、約200ヌクレオチドの保存的非コード領域からなる(Berlioz, C, et al, (1995), J Virol 69: 2214-2222; Wagner, S, et al, (1995), J Biol Chem 270: 20376-20383)。非コード領域の後に、gagの保存的CTG代替(alternative)開始コドンから伸長する約270のヌクレオチド領域が続く。この領域は、他のMuLVと比較して、ゲノムの最も異なる切片を表す(図26および23B)。エコトロピックMuLVとは異なり、このコドンからの翻訳がGagタンパク質の残りにインフレームの約90のaaのN-末端リーダーペプチドを附加する場合、かくしてGagのグリコシル化形態(Pratts, AC, et al, (1989), J Mol Biol 205: 363-372)を生成するので、代替的開始から下流でXMRVは終止コドン53 aa残基を有する。興味深いことに、両MuLV DG-75およびMTCR gagリーダー配列もまた終止コドンによって阻害され、したがって全長グリコ-Gagが生成されないと思われる。さらに、特徴的な24ヌクレオチドの欠失がXMRVゲノムのこの領域に存在したが、それは配列決定されたマウスゲノムにおける任意の公知の外因性MuLV単離物または内因性レトロウイルスのエレメントに見出せない。細胞培養において、そのままのグリコ-Gagの発現はウイルスの複製に必要不可欠ではない(Fan, H., et al, (1983), Proc Natl Acad Sci USA 80: 5965-5969; Schwartzberg, P., et al, (1983), J Virol 46: 538-546)。しかしながら、この領域の病変(lesion)は、インビオの病原特性における興味深いバリエーションと関連している(Chun, R., et al, (1994), J Biomed Sci 1: 218-223; Corbin, A., et al, (1994), J Virol 68: 3857-3867; Fujisawa, R., et al, (1997), J Virol 71: 5355-5360; Munk, C, et al, (2003), Virology 313: 44-55; Portis, JL., et al, (1996), Virology 226: 384-392)。例えば、グリコ-GagのN-末端ペプチドの5残基に作用する10ヌクレオチドの改変が、CasFrKPおよびCasFrKR41 MuLV株に観察される神経侵襲の頻度において100倍の差異の原因であることが分かった(Fujisawa, R., et al, (1998), J Virol 72: 5619-5625)。さらに、CUG開始コドンの下流に終止コドンをもたらすオクタヌクレオチドの挿入が、フレンドMuLVに感染したマウスにおける重篤な初期溶血性貧血および赤白血病の長期潜伏を予防した(Corbin, A., et al, (1994), J Virol 68: 3857-3867)。XMRV グリコ-Gagにおける病変の病理学的重要性は知られていないが、高い配列相違の程度は、この領域が正の選択圧の下であり、したがってヒト宿主内の感染の確立に関連がありそうであることを示す。

【0178】

XMRV感染およびR462Q RNASEL遺伝子型の関連

ウイルスの存在およびR462Q(1385G->A)RNASEL遺伝子型の間の関連をさらに調べるために、腫瘍試料の1つ(VP35、上記参照)から回収したウイルス配列に基づく特異的ネストドRT-PCRアッセイを開発した。このアッセイにおけるプライマー(図28A~28B)は、異なる5'リーダーおよびgagのN-末端からの380ヌクレオチド断片を增幅する。ホモ接合体(QQ)個体からの20個の検査した腫瘍のうち8個(40%)においてRT-PCRは陽性だった。

さらに、ホモ接合体野生型（RR）患者からの1つの腫瘍は、検査した52RR～14RQ腫瘍間で陽性であった（図22Bおよび表10）。興味深いことに、この症例は全XMRV陽性の症例の中で最高の腫瘍悪性度分類（tumor grade）と関連した（Molinaro et al, 2005の表11）。マウスGAPDH遺伝子に特異的なPCRは全試料において陰性であったが、腫瘍試料がマウスの核酸によって汚染されたという可能性に対して強く反対を主張する。まとめると、これらのデータは、ホモ接合体（QQ）R462Q RNASEL遺伝子型と腫瘍組織におけるウイルスの存在との間の強い関連を証明する（両側フィッシャー精密試験による $p < 0.00002$ ）。

【0179】

種々の患者からの試料におけるXMRV配列の変化

種々の患者におけるXMRV配列の変化の程度を調べるために、ネステッドgag RT-PCRで陽性である全9個の試料からの増幅した断片を配列決定した。増幅したgag断片は、お互いに>98%ヌクレオチドおよび>98% aaの同一性で大いに類似した（図27A）。対照的に、断片はMuLV DG-75の最も関連する配列と<89%ヌクレオチドおよび<95% aaの同一性を有した。gag遺伝子に加えて、同一患者の試料をまた、pol遺伝子の配列バリエーションに対して検査した。pol遺伝子における2500ヌクレオチド伸長を標的とする一連のプライマーで得られたPCR断片を配列決定した（sequences）（図28A～28B）。gag断片と同様、増幅したpol断片は大いに類似しており（図27B）、お互いに>97%ヌクレオチドおよび>97% aaの同一性を有した。対照的に、断片はMuLV DG-75の最も関連する配列と<94%ヌクレオチドおよび<95% aaの同一性を有した。

【0180】

配列決定されたgagおよびpol断片のクラスタリング（図27A～27B）は、全てのマイクロアレイおよびRT-PCRの陽性のケースが同一のウイルスによる感染を表すことを示す。一方、検査された断片における配列のバリエーションの程度は、PCR増幅および配列決定の際に導入されたエラーから予測されたものよりも高い。Taqポリメラーゼによるヌクレオチドミスインコーポレイションの頻度は、gagおよびpol断片における2%までの観察された割合と比較して、 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ として評価される（Bracho, MA., et al, (1998), J Gen Virol 79 (Pt 12): 2921-2928）および本明細書中の引例）。これらの発見は、観察されたXMRV配列のバリエーションが自然な配列変化の結果であり、罹患した患者が独立して有するウイルスと一致することを示すので、XMRVの可能性のある原因としての実験汚染に対して反対を主張する。

【0181】

考察

ここに示される結果は、VirochipマイクロアレイへのハイブリダイゼーションおよびXMRV特異的プライマーによるRT-PCRの両方によって判断されるように、RNase LのR462Qバリアント（QQ）に対してホモ接合体である、前立腺癌を有する患者のおよそ半分からの前立腺組織におけるXMRV感染を同定する。野生型（RP）およびヘテロ接合体（RQ）患者からの前立腺腫瘍の平行RT-PCR研究は、66試料のうち1つのみのXMRVの証拠を明らかにし、ヒトXMRV感染がRNase L活性の減少と強く関連することをはっきりと確認した。この結果は、R462Q RNase Lバリアントが先天（IFN-依存）抗ウイルス免疫におけるわずかな欠陥を導くという見解を支持する。

【0182】

その名前が示すように、XMRVは異種栄養性マウス白血病ウイルス（MuLV）と密接な関係がある。規範的なモロニー-MuLVなど、培養のげっ歯動物細胞中でのみ成長するエコトロピックMuLVとは異なって、異種栄養性MuLVは培養の非げっ歯動物細胞中で成長し得るが、げっ歯動物細胞株中では成長し得ない。異種栄養性MuLVは、感受性のあるマウス株を感染させる外因性エコトロピックウイルスおよびマウスゲノムに存在する多数の内因性MuLV様配列の間のインビオ組換え事象に起因すると考えられる。これらの内因性エレメントは、マウス生殖細胞系中の祖先レトロウイルスの組込み事象の残存物であり、大部分が進化の時間にわたって不活性な欠失および他の再配列を欠点として有した。しかしいくつかは完全長であり、ある特定のマウスのバックグラウンドにおいて発現される（Levy, JA, (1973)

10

20

30

40

50

, Science 182: 1151-1153; Levy, JA, (1978), Curr Top Microbiol Immunol 79: 111-2 13)。組換えは、成熟SUグリコタンパク質のN-末端領域をコードするenv遺伝子の5'末端の置換を常に含む((Evan, LH., et al, (2003), J Virol 77: 10327-10338)およびその明細書中の参考文献)。この領域はSUグリコタンパク質の受容体選択性を特定化し、かくして組換えウイルスの宿主範囲を決定する(Battini, JL., et al, (1992), J Virol 66: 1468-1475; Ott, D., et al, (1992), J Virol 66: 4632-4638)。マウスおよびラット種に特異的な受容体(CAT-1)のみを認識し得るエコトロピックMuLV(Albritton, LM., et al, (1989), Cell 57: 659-666; Kim, JW., et al, (1991), Nature 352: 725-728; Wang, H., et al, (1991), Nature 352: 729-731)とは異なって、異種栄養性株は、XPR1またはSYGIとして公知のタンパク質を認識する。XPR1はマウスを含む全てのより高等な脊椎動物において発現されるが、マウス遺伝子の多形物は、XPR1が異種栄養性MuLVの侵入を媒介することを不可能にする(Battini, JL., et al, (1999), Proc Natl Acad Sci USA 96: 1385-1390; Tailor CS, et al, (1999), Proc Natl Acad Sci USA 96: 927-932; Yang, YL., et al, (1999), Nat Genet 21: 216-219)。かくして、異種栄養性MuLVは、ヒトを含む幅広い種々の哺乳類種を感染させる可能性を有する。

【0183】

異種栄養性MuLVを、培養ヒト細胞株において時折検出した。例えば、MuLV DG-75はヒトB-リンパ芽球状細胞株からクローニングし(Raisch, KP., et al, (2003), Virology 308: 83-91)、感染性異種栄養性MuLVをヒト小細胞肺癌(SCLC)株NCI-417において検出した(Antoine, M., et al, (1998), Virus Genes 17: 157-168)。実験室汚染は、ヌードマウスの細胞株の培養においてまたは継代の際のいずれかで、これらのケースの可能な原因として排除し得ないが、かかる汚染は出願人らの成果を説明することができない。これに対する証拠は以下の通りである：(i) XMRVを一次ヒト組織において検出した；(ii)どのマウス配列(例えばGAPDH)も出願人らの物質においてPCRによって検出され得なかつた；および(iii)感染は、主としてQQ RNASEL遺伝子型を有するヒト試料に限定された；(iv)これらの個体によるウイルスの独立的な取得と一致する種々の患者から回収したXMRVのクローラン中に、多型を見出した。最終的に、ウイルスの転写産物および抗原が、インビオ感染に対してさらなる証拠を提供する蛍光インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学それぞれによって、感染したQQ前立腺組織中に検出され得ることが実施例3(Molinaro et al, 2005)において示される。ひとまとめにして考えると、上記証拠は、分析された試料のXMRV感染の原因としてウイルスまたはクローラン化DNA物質による実験室汚染に対し強く反対を主張する。本明細書に記載される発見は、異種栄養性MuLV様外的病原因子によるヒトの確実な感染の例である。

【0184】

XMRV配列は(配列データバンクに示されるような)ヒトゲノムDNA中に見出されず、これは、それが陽性被験体の感染によって外因的に得られたに相違ないことを示す。いかなる保有宿主(reservoir)から、およびいかなる経路によってかかる感染が得られたかは未知である。げっ歯動物の曝露がRNASEL遺伝子型にしたがって変化すると考える理由がないので、野生のマウスとの直接的な接触が、出願人らのコホートの観察された感染分布を説明するとは考えられない。もっともらしく思えるように、特に野生型RNase Lを有する個体がQQ遺伝子型を有する個体よりも迅速に感染を取り除く場合、感染は現在の研究によって示されるよりも広がることが可能である。しかしそうである場合、XMRV感染の異種間移動モデルは、出願人自身のような高度に発展した社会に対して高レベルのげっ歯動物の曝露を必要とする可能性が低い。かくしてウイルスの配列は、XMRVの本源的な保有宿主が恐らくげっ歯動物であることを示唆するが、感染の近源はマウスまたはラットでないようと思われる。

【0185】

XMRVがgag、polおよびenv配列のみから構成される単純なレトロウイルスであるため、本明細書に記載されるデータは、著しく作用する腫瘍遺伝子をコードすることによってXMRVが機能しないこと、およびそのゲノムにおいて、得られた宿主由来の配列を有さないこ

10

20

30

40

50

とを実際に示す。さらに実施例3の単細胞分析は、ウイルスのゲノムは癌細胞それ自体に存在しないが、正体がまだ調査中である間質細胞を標的にすると思われることを示す。これはありそうにない別のモデルのレトロウイルス腫瘍形成、すなわち前立腺上皮細胞のクローンの拡大の近因として、これらの細胞の細胞ゲノムの中への挿入による宿主腫瘍遺伝子の活性化を作り出す。

【0186】

実施例3 RNASEL/HPC1変異を有する前立腺癌からの組織および細胞株におけるXMRV感染

RNase Lは5'-リン酸化2'-5'-オリゴアデニレートによって活性化される特異的な抗ウイルス性タンパク質である。実施例2は、RNase L (R462Q) の減少した活性バリアントに対してホモ接合体である前立腺癌のケースにおいて、異種栄養性MuLV関連ウイルス (XMRV) と名付けられた新規のガンマレトロウイルスのゲノムの同定を記載する。XMRV核酸およびタンパク質が、XMRVに感染し、かつRNase Lバリアントに対してホモ接合体であるケースからの前立腺組織において、細胞の約1%に検出され得ることが、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学によって本明細書に示される。感染した細胞は、癌腫に隣接する領域における前立腺間質細胞、主として線維芽細胞および造血成分である。前立腺癌由来の細胞株のスクリーニングは、RNase Lにおいて変異も有するLNCaP細胞の單一クローンが、インビボの腫瘍中に見出されるものと密接に関連するXMRV-様ゲノムを有する (harbor) ことを明らかにした。このクローンはゲノムおよびサブゲノムウイルスの転写産物を発現し、培地中に感染性粒子を放出する；これらの粒子は、マウス起源ではなくヒトのいくつかの細胞株において連続的に伝播し得る。複製成分XMRVの有効性は、ウイルス複製の研究、RNase Lバリアントに対するその関連、ならびに前立腺疾患および他の疾患に対するその関係を促進する。

【0187】

材料および方法

患者の遺伝子型決定および前立腺組織処理

Cleveland Clinicにて治療目的で前立腺切除を受ける予定である男性を、末梢血液単核細胞から単離されたDNAに既製のTAQMAN遺伝子型決定アッセイ (Applied Biosystems, assay c_935391_1) を用いて、R462Q (1385G->A) RNASELバリアントと遺伝子型決定した。根治前立腺切除の直後、組織コアを（多くの癌が発症する）末梢域から取り出し、液体窒素中で凍結した後RNA単離した (Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens)。組織学的分析のために、新しく切除した前立腺組織を10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン中で処理および包埋した。いくつかの実験に対して組織マイクロアレイを用いた（図31への説明を参照）。全てのこれらの研究を、Cleveland Clinic協会の審査委員会認証プロトコルの下で行った。

【0188】

抗体

SFFV Gagタンパク質に対するモノクローナル抗体を、10%超低IgG FBS (Invitrogen) のDMEM (Media Core, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH) 中でコンフルエントになるまで成長させたR187細胞 (ATCC; CRL-1912) から產生した。3日ごとに条件培地をコンフルエント培養物から採取した。1つの調製物につき5mlの条件培地を4にて5分間168 X gで遠心分離にかけた。上澄み液を0.22 μmシリンドリカルターユニット (Millipore Corp.) で濾過し、100kDa分子量遮断膜 (Millipore Corp.) を有するAmicon 限外濾過ユニット中で16倍に濃縮した。アジドナトリウムを添加して最終濃度を0.02%とした。スカシガイヘモシアニンと結合した、保存的MuLV NCペプチド配列 : KDCPKKPRGPRGPR (配列番号:53)に対するウサギポリクローナル抗体を、Open Biosystems, Inc., Huntsville, AL より調製した。抗体を、ペプチドのセファロースへの結合 (linking) 工程、結合 (binding) 工程次いでカラムからの抗体を抽出する工程を含むプロトコルによりアフィニティー精製した。同時XMRV FISH/サイトケラチン免疫蛍光検査法を、上皮起源の正常細胞および腫瘍性細胞が認識可能なマウス抗サイトケラチンAE1/AE3 (20:1混合) モノクローナル抗体 (Chemicon) を用いて行った。

10

20

30

40

50

【0189】

細胞培養

細胞株LNCaP-R (W. Heston, Cleveland)、LNCaP-FGC (ATCC Cat番号CRL-1740), DU145 (ATCC Cat番号HTB-81) およびPC3 (ATCC Cat番号CRL-1435) を、RPMI 1640培地中2mM L-グルタミン、10%胎児ウシ血清；200単位のペニシリンGおよび200 μg/mlのストレプトマイシンで成長させた。正常な前立腺上皮細胞(PrEC)をClonetics Corporation (San Diego, CA)から入手し、種々の成長因子の混合物(SingleQuots)(Clonetics)；10%胎児ウシ血清を補充したPrEGM中で維持した。

【0190】

サイトブロック(cytoblock)調製

およそ 10^9 個の細胞(LNCaP-R、LNCaP-FGC、DU145およびPC3)を、フェノールレッド、Ca++またはMg++(Invitrogen)無しのハンクス平衡化塩溶液(HBSS)で洗浄し、10%中性緩衝ホルマリンで徐々にだが完全に再懸濁した。細胞懸濁液を4にて一晩固定し、遠心分離にかけてHBSSで2回洗浄した。上澄み液を吸引し、細胞を1滴のHBSS中で再懸濁した。ピペットで細胞懸濁液をサイトブロックカセット(Thermo Electron Corp.)中に移した。固定された細胞培養サイトブロックを処理し、パラフィンブロック中に24時間以内に包埋した。包埋したサイトブロックを約4 μm厚切片に切断して帯電した(charged)スライド上に配置し、免疫蛍光検査法のために少なくとも4時間60~65で焼き固めた。

【0191】

RNA単離およびRT-PCR

TRIzol試薬(Invitrogen)を用いて、細胞から全RNAを単離した。RNAをDNase I(RNaseを含まない)(Ambion)で処理し、酸性フェノール：クロロホルムで抽出し、RC-PCR分析のために沈殿させた。1 μgのRNAおよびランダムな六量体プライマーをTaqMan(登録商標)逆転写試薬キット(Applied biosystem)と共に用いて第一鎖cDNA合成を行った。XMRV-35の700bp env領域；フォワードプライマー-7050、5' GTT TAT GGC CAG TTT GGA AA 3'(配列番号:41)、およびリバースプライマー-7750、5' GCC TTA TGG TGG GGT CTT TC 3'(配列番号:42)に対して特異的なプライマーを用いて、第一鎖cDNA上でPCRを行った。GAPDHエクソン8特定プライマーを陽性対照；フォワードプライマー、5' TGC CAT CAC TGC CAC CC A GA 3'(配列番号:54)およびリバースプライマー、5' CTT GAC AAA GTG GTC GTT GA 3'(配列番号:55)として用いた。

【0192】

FISH

両方をpGEM(登録商標)-T(Promega)中でクローニングしたフォワードプライマー-2345、5' ACC CCT AAG TGA CAA GTC TG 3'(配列番号:43)、リバースプライマー-4495、5' CT G GAC AGT GAA TTA TAC TA 3'(配列番号:44)、およびフォワードプライマー-4915、5' AA A TTG GGG CAG GGG TGC GA 3'(配列番号:56)、リバースプライマー-6755、5' TTG GAG TA A GTA CCT AGG AC 3'(配列番号:57)を用いるPCRによって得られたウイルスのゲノムの2.15kbおよび1.84kb切片の両方を用いてXMRV-35 FISHプローブカクテルを生成した。ウイルス性cDNA断片を放出するため組換えベクターをEcoRIで消化し、それらをゲル電気泳動(Qiagen)後に精製した。精製されたウイルス性cDNA挿入物をニックトランスレーション反応法に用いて、製造者の使用説明書(Vysis Inc.)に従ってSpectrumGreen™ dUTP蛍光標識プローブを生成した。前立腺組織または約4 μm厚の組織切片を用いる組織マイクロアレイ配列の新たに焼き固めたスライドを脱パラフィン化、再水和化し、95°で40分間標的修復(target retrieval)(Dako)に供した。スライドを室温まで冷却しH2O中ですすいだ。pH7.4のTris-HCl中1:5000でプロティナーゼK(Dako)を室温で10分間スライドに直接適用した。隣接する組織切片もまた、組織が完全にFISHに接近可能であることを確実にするために、陰性対照としてSpectrumGreen™dUTP蛍光標識KSHV-8 DNA(nts 85820-92789)、または陽性対照としてヒト染色体1の異なる腕に特異的である、陽性対照としてSpectrumGreen™およびSpectrumOrange™標識TelVysion™DNAプローブカクテル(Vysis Inc.)でプローブした。FISHスライドを、Retiga EX CCDカメラ(Q-Imaging, Vancouver, British Columbia, Canada)で撮影した。

10

20

30

40

50

Columbia, Canada)を装備したLeica DMR顕微鏡(Leica Micro-Systems, Heidelberg, Germany)を用いて検査した。FISHイメージを、63倍の油浸対物レンズ開口数(N.A.) 1.4を有するLeica TCS SP2レーザー走査共焦点顕微鏡(Leica Micro-Systems, Heidelberg, Germany)を用いて取り込んだ。XMRV核酸を、488nmアルゴンレーザー(500～550nmにて発光)を使用することで得られた光学スライスの最大強度プロジェクションを用いて視覚化した。Te IVisionTMDNAプローブを、488nmアルゴンレーザー(500～550nmにて発光)および568nmクリプトン-アルゴンレーザー(575～680nmにて発光)を使用することで得られた光学スライスの最大強度プロジェクション(projection)を用いて視覚化した。DAPIを、364nm UVレーザー(400～500nmにて発光)を使用することで得られた光学スライスの最大強度プロジェクションを用いて視覚化した。その後スライドを2倍のSSC [0.3 M塩化ナトリウムおよび0.03 Mクエン酸ナトリウム(pH 7.0)]中で洗浄してカバーグラスを取り除き、形態学的評価のためにH&E染色した。

10

【0193】

IHC

Benchmark Ventana自動染色機(Ventana Inc.)上でヒト組織におけるIHCを行った。未染色でホルマリン固定されたパラフィン包埋前立腺切片を静電気的に充電されたスライド上に配置し、その後Cell Conditioner #2 (Ventana Inc.)の使用で達成された弱細胞調節によって脱パラフィン化した。SFFV p30 Gagに対する濃縮化R187モノクローナル抗体 (Ventana Inc.)を、1mlにつき10 μgにて手動で切片上に分配し、37℃にて32分間インキュベートさせた。内因性ビオチンブロックキット (Ventana Inc.)を用いて、内因性ビオチンを切片中でブロックした。切片を洗浄し、ビオチン化免疫純正ヤギ抗-ラットIgG (Pierce)を4.8 μg/mlの濃縮物に8分間適用した。Gagタンパク質の局在化を得るために、Ventana増強アルカリホスファターゼレッド検出キット (Ventana Inc.)を用いた。切片を蒸留水中で簡単に洗浄し、ヘマトキシリンII (Ventana Inc.)でおよそ6分間対比染色した。切片を洗浄し、等級化アルコール中で脱水し、キシレン中で5分間インキュベートしてサイトシール (Microm Int.) のカバーグラスをかけた。R187モノクローナル抗体を添加しなかったことを除いては、陰性对照を上記のように行った。

20

【0194】

患者VP62由来の前立腺組織のスライド上で、同時XMRV FISH/サイトケラチンIHCを行った。第一に、プロテアーゼII (Ventana Inc.)を室温で3分間使用し、ヤギ抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ (Molecular Probes)を添加したことを除いては、正確に以下に記載するように、切片をAlexa Fluor 594 チラミドシグナル增幅キット (Molecular Probes)を用いてサイトケラチンAE1/AE3に対して免疫染色した。スライドを標的修復溶液 (Dako)中に95℃で40分間配置した。プロテイナーゼK処置がなかったことを除いては、XMRVに対するFISHを上記のように行った。FISH後、DAPIを加えた封入剤 (Vectashield Inc.)でスライドをマウントし、蛍光顕微鏡検査法を用いて検査した。Retiga EX CC Dカメラ (QImaging, Vancouver, British Columbia, Canada)を装備したLeica DMR顕微鏡 (Leica Micro-Systems, Heidelberg, Germany)を有するTexasレッドフィルターを用いて、免疫蛍光イメージを取り込んだ。

30

【0195】

LNCaP-R、LNCaP-FGC、DU145およびPC3サイトブロック切片の免疫蛍光検査法を、Alexa Fluor 594 Tyramideシグナル增幅キット (Molecular Probes)を用いて手動で行った。簡単に、約4 μmに切断した未染色でホルマリン固定されたパラフィン包埋サイトブロック切片を、静電気的に帯電させたスライド上に配置し、少なくとも4時間65℃で焼き固め、キシレン中で脱パラフィン化し、減少するアルコール濃縮物によって再水和化した。スライドを室温で3分間プロテアーゼIII (Ventana Inc.)中でインキュベートし、室温にて60分間1%ブロック試薬 (PBS中10mg/ml BSA)でインキュベートしたペルオキシダーゼクエンチング緩衝液 (PBS + 3% H₂O₂)のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)中で室温にて60分間洗浄した。室温で60分間、1%ブロック試薬中で希釈された濃度が0.25 μg/mlのXMRV-35NC (Gag) ペプチド (Open Biosystems)に対する抗体を用いてスライドをインキュベートし、PBS中で

40

50

3回すすいだ。ヤギ抗ウサギIgG-ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Molecular Probes) を添加し、室温にて60分間インキュベートした。スライドをPBS中で3回すすいだ。チラミド溶液を室温にて10分間スライドに添加し、スライドをPBS中で3回すすいだ。スライドを、DAPI (Vectashield Inc.) を加えた封入剤でマウントし、蛍光顕微鏡検査法を用いて検査した。

【0196】

ウイルス感染およびRTアッセイ

LNCaP-FGC細胞を20%コンフルエンシーで平板培養し、PBSで洗浄した。3000gで15分間遠心分離にかけ、0.22 μm濾過器で2回濾過した、FBSまたは抗生素質無しの8 μg/mlポリブレン (Sigma) でRPMI中1:2に希釀された500 μlのLNCaP-R上澄み液を細胞に3時間添加した。ウイルスを除去し、細胞を90% RPMI ; 10%胎児ウシ血清；200単位のペニシリン／ストレプトマイシンで満たした。(Telesnitsky, A., et al, (1995), Methods Enzymol 262: 347-362) に記載されるように、37 ℃にて1時間インキュベートした後RT活性を測定した。全ての反応を ^{-32}P -dTTPを用いて行い、感染後に組織培地のアリコートを毎日採取し、RT活性を試験した。定量は、Storm Scanner 840 (GE Healthcare) およびソフトウェアImageQuant V5.2 (Molecular Dynamics) を用いたリン光体イメージ (phosphorimage) 解析によるものであった。RTアッセイにおいてPBSを陰性対照として用い、0.4単位のMLV-RT (In vitro) を陽性対照として用いた。

【0197】

ノザンプロット

製造者の使用説明書にしたがって、RNAを1%アガロースホルムアルデヒドゲル上で分離し、次いでターボプロットキット (SchleicherおよびSchuell) を用いてナイロン膜へ移した。移された膜を2X SSC中ですすぎ、自己架橋 (autocrosslink) (UV Stratalinker 2400; Stratagene) させた。プロットをUltrahyb (Ambion) 中で予めハイブリダイズし、次いで ^{32}P 標識プローブでハイブリダイズした。製造者の使用説明書にしたがって、RediPrimer (Amersham Biosciences) を用いてDNAプローブを生成した。

【0198】

サザンハイブリダイゼーション

75cm²フラスコ中で成長した細胞をトリプシン処理し、55 ℃にて1時間1mlにつき100 μg のプロテイナーゼKを含有する硫酸ドデシルナトリウム緩衝液 (100mM Tris、150mM NaCl、10mM EDTA、0.1%硫酸ドデシルナトリウム) 中に溶解した後、37 ℃にて30分間RNaseA処理した。DNAをフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、PstIで消化した。各試料の20 μgのDNAをアガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜 (アルカリ移動) へ移し、2X SSCで中和し、架橋して7780～7991位置に対応する放射性標識XMRV VP35 U3 LTRプローブへハイブリダイズした。膜を洗浄し1～12時間Kodak XAR5フィルムに曝露した。

【0199】

ゲノムクローニングおよび配列決定

ゲノムクローニングおよびXMRV-LNCaP RVの配列決定を、(Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens) に記載されるように行った。

【0200】

系統発生的分析

全長ゲノムの近隣結合系統樹を以下のように作製した。XMRV LNCaP-R (Genebank: DQ272467)、VP35 (GenBank: DQ241301) およびVP42 (GenBank: DQ241302)、MTCR (GenBank: NC_001702)、MuLV DG-75 (GenBank: AF221065)、MuLV MCF1233 (GenBank: U13766)、AKV MuLV (GenBank: J01998)、フレンドMuLV (GenBank: NC_001362)、ローシャーMuLV (GenBank: NC_001819)、モロニーMuLV (GenBank: NC_001501)、ネコ白血病ウイルス (GenBank: NC_001940)、テナガザル白血病ウイルス (GenBank: NC_001885)、ならびにコアラレトロウイルス (GenBank: AF151794) のゲノムが、デフォルト設定を用いてClustalXバージョン1.83で配列された。系統樹をUrisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogensに記載されるよ

10

20

30

40

50

うに作製した。Gag-Pro-PolおよびEnv ポリタンパク質の近隣結合系統樹は、上記12ゲノムのGenBank記録から抽出されたタンパク質シーケンスの配列に基づくものであり、Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogensに記載されるように作製した。

【0201】

組込み部位のクローニングおよびマッピング

20マイクログラムのゲノムDNAをPst Iで消化し、フェノール：クロロホルム(1:1, v/v)で抽出した後、エタノール沈殿した。Pst Iは、ウイルスゲノムのヌクレオチド位置7,150にて一度切断し、ライトLTRおよび隣接細胞DNAを含むDNA断片を生成するために用いた。消化されたDNAを、ヌクレオチド位置7,151～7,171に相補的であり、ライトLTRの約600bp上流である0.1 μmのビオチン化プライマーB-7151F (5' Bio-TEGGAGTTGGAACAGGGACTACA (配列番号:58); オペロン)でアニーリングした。次いで、10単位のPfu Ultra DNAポリメラーゼおよび希釈無しのPfu Ultra 緩衝液(Stratagene)中の0.2mM dNTPを用いて、アニール化プライマーを最終用量の300 μm中で伸長させた。反応混合物を5分間94℃に加熱し、5分間56℃に冷却し、次いで20分間72℃で維持した。鎖延長後、遊離ビオチン化プライマーを大腸菌エキソヌクレオチド消化で除去し、試料をフェノール：クロロホルム抽出およびエタノール沈殿で処理した。ビオチン化DNAを、製造者によって記載されるようにDynabeadsキロベースバインダーキット(DYNAL Biotech)を用いて単離した。単離したDNAをNspIで消化し、800 μl緩衝液A(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1M NaCl, 1 mM EDTA, 200 μg/mlウシ血清アルブミン)で2回および800 μl、希釈無しのT4 DNAライゲーション緩衝液で2回洗浄した。次いで、隨時タッピングすることにより、16℃にて3時間T4 DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いてDNAをNsp-リンクーにライゲートした。Nsp-リンクーは20 μMリンクー-A(5' CGGATCCCGCATCATCTCCAGGTGTGACAGTTT (配列番号:59))を20 μMリンクー-Nsp-S(5' AACCTGGAGATATGATGCGGGATCCGCATG (配列番号:60))でアニーリングすることにより調製した。Dynabeadsを800 μl緩衝液Aで2回の後に800 μl緩衝液B(5 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1 mM EDTA)で2回洗浄することにより、過剰なNsp-リンクーを除去した。フォワードおよびリバースプライマーとしてそれぞれ0.5 μMのU38F(5'-CGTGTCCAATAAGCCTT (配列番号:61))およびNspL-R(5'-TAACCTGGAGATATGATGCGGG (配列番号:62))を用いるPCRにより、プロウイルスのDNA接合部を増幅した。PfuウルトラDNAポリメラーゼ、0.2mMのdNTPおよび希釈無しのPfuウルトラ緩衝液を含む反応混合物を2分間94℃に加熱し、次いで94℃で30秒間、56℃で40秒間および72℃で8分間27回サイクルした後、72℃で15分間最終伸長した。増幅したDNAを、ゼロプラントPCRクローニングキット(Invitrogen)を用いてクローニングし、配列決定した。ウイルスのLTRに隣接する染色体配列を、Human May 2004 AssemblyでのUCSCゲノムプラウザを用いてヒトゲノム上にマッピングした。

【0202】

略語

FISH - 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション；H&E - ヘマトキシリンおよびエオシン；HPC - 遺伝性前立腺癌；IFN - インターフェロン；IHC - 免疫組織化学；FLV - ネコ白血病ウイルス；GALV - テナガザル白血病ウイルス；KoRV - コアラレトロウイルス；MCF1233 - ミンク細胞病巣誘導1233マウス白血病ウイルス；MuLV - マウス白血病ウイルス；MTCR - マウスC型レトロウイルス；N.A. - 開口数；OAS - 2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ；PBS - リン酸緩衝生理食塩水；PCR - ポリメラーゼ連鎖反応；PIA - 増殖性炎症性萎縮；PIN - 前立腺上皮内腫瘍；2'-5A - 5' - ホスホリル化2' - 5'オリゴアデニレート；QQ - RNASE Lホモ接合体R462Q；QR - RNASELヘテロ接合体R462Q；Rnase L - リボヌクレオチド；RT - 逆転写酵素；RR - RNASELホモ接合体野生型462R；SNP - 単一ヌクレオチド多型；VRA - 可変領域A；VRB - 可変領域B；XMRV - 異種栄養性MuLV関連ウイルス

【0203】

結果

XMRV核酸は、腫瘍を有する前立腺組織に存在する

ヒト前立腺組織内にXMRVを局所化し、感染した細胞の頻度を測定するために、インサイチュ分子技術を用いた。ホルマリンで固定した前立腺組織上に蛍光インサイチュハイブリ

10

20

30

40

50

ダイゼーション(FISH)を用いてXMRV核酸を可視化した。患者VP35からクローニングしたXMRV単離物由来のcDNAを用いて、全てのウイルスの遺伝子に及ぶスペクトルグリーン蛍光標識FISHプローブカクテルを調製した(材料および方法)。RT-PCRにより、XMRVに対して陽性である腫瘍(例えばVP62およびVP88)中で明確なFISH陽性細胞を観察した(図30)。陽性FISHシグナルと関連する細胞型を同定するために、その後同一の切片をヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。多くのFISH陽性細胞は間質線維芽細胞であったが、時々感染した造血細胞もまた見られた。XMRV核酸は、組込みプロウイルスのDNAを示す核内に通常存在したが、いくつかの細胞は、核に隣接する細胞質の染色を示し、非分割細胞における前組込み複合体を示唆した(図31、パネルA)。XMRV感染白血病の例を、上皮細胞に特異的なサイトケラチンAE1/AE3マウスマノクローナル抗体カクテル(Wernert, N., et al, (1987), 5 Pathol Res Tract 182: 617-626)で(赤く)染色された前立腺に隣接して示す(図31、パネルEおよびF)。間質中の感染した細胞は、その非上皮起源を確認するサイトケラチンAE1/AE3に対して陰性である。インデント核(indent nucleus)および濃く(dark)濃縮されたクロマチンは、間質造血細胞と一致する。

10

【0204】

XMRV感染前立腺細胞の頻度

FISHを用いてXMRV感染前立腺細胞の頻度の最小評価を得た。XMRV FISHプローブを、染色体1のpおよびq腕のサブテロメア領域に特異的な2つのFISHプローブ(スペクトルグリーンおよびスペクトルオレンジでそれぞれ標識した)と比較した(図32)。2つのXMRV/FISH陽性細胞をVP88前立腺細胞の領域で観察した(図32の緑のシグナル、パネルA)が、実質的にあらゆる細胞が隣接する切片において染色体1特異的プローブで標識された(図32の赤および緑のシグナル、パネルB)。XMRV陽性細胞の低頻度のために、カポージ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)DNA(nt 85820-92789)を標的とする、前立腺標本VP88およびVP51の任意の細胞を標識しなかったプローブを用いて陰性対照を行ったが、このプローブはKSHV DNAでトランسفェクトされた293T細胞を実際効率的に標識した。14の異なる前立腺癌組織標本の複製を含む組織マイクロアレイ上で、さらなるXMRV FISH実験を行った(表13)。5つのホモ接合体RNase L 462Q(QQ)症例(VP29, 31, 42, 62および88)は、各々5~10XMRV/FISH陽性細胞(観察された前立腺細胞の約1%)を示した。またQQ症例である患者試料のVP79も2つの陽性細胞(検査した全細胞の0.4%)を含んだ。観察された全てのXMRV FISH陽性細胞は、間質細胞であった。対照的に、3つのRR組織試料および2つのRQ組織試料は、1以下(<0.15%)のFISH陽性細胞を示した。gag RT-PCR(Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens)により陽性である2つのQQ症例、VP35およびVP90は、各々1つのFISH陽性細胞のみを示した(表13)。逆に1つの症例であるVP31はFISH陽性であるが、gag RT-PCRは陰性であった。これらの結果は、試料となった前立腺の特定領域間のウイルスコピー数における不均一性によるものであり得た。

20

【0205】

免疫組織化学により測定される場合の前立腺組織におけるXMRVの存在

XMRVタンパク質を発現する細胞を同定するために、脾限局巣形成ウイルス(SFFV)に対するモノクローナル抗体を用いてGagタンパク質の存在を調査した;この抗体は、幅広い範囲の種々のエコトロピック、両種性および異種栄養性MuLV株からのGagタンパク質に対して反応的であった(Chesebro, B., et al, (1983), Virology 127:134-148)。この抗体を用いて、両方ともQQであるXMRV陽性症例VP62およびVP88の前立腺組織中のIHCによる陽性シグナルを観察した(図33)。向上したアルカリホスファターゼレッド検出方法は、蛍光顕微鏡検査法(図33、パネルA、B、EとF)および明視野顕微鏡検査法(図33、パネルC、D、GとH)の両方を用いて、同一細胞でのGag検出を可能とした。FISHによって検出されたものと同様の分布および頻度を有する前立腺間質細胞において、Gag発現細胞を観察した(図33)。対照的に、RR遺伝子型であるVP51前立腺組織においてGag陽性細胞は観察されなかった(図33、パネルIとJ)。

30

【0206】

前立腺癌細胞株における関連ガンマレトロウイルス

40

50

長年にわたって、いくつかの細胞株はヒト前立腺癌由来であった。そのうちの2つ、PC3およびDU145はRNASELに関して野生型であるが、幅広く研究されたLNCaP株は、RNASELの不活性化欠失変異（471 AAAG）およびR462Qバリエントの両方に対してヘテロ接合体である（Rennert, H., et al, (2002), Am J Hum Genet 71: 981-984; Xiang, Y., et al, (2003), Cancer Res 63: 6795-6801）。XMRV感染およびRNASEL変異間の関係が一度確立したら（Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）、XMRV様外的病原因子による感染の証拠をこれらの細胞株において調査した；さらに、正常な前立腺上皮細胞（PrEC）の株を調査した。LNCaPの2つのクローンを研究し、そのうちの1つであるLNCaP-FGCをこの目的のためにATCC貯蔵所から新しく得た；もう一方（LNCaP-R）を研究室で連続的に継代した。[LNCaP-Rは、ATCCから（LNCaP-FGCとして）本来得られ、Cleveland Clinic講義室の癌生物学科（W. Hestonの研究室）で維持された単離物に対する名前である]。XMRV V35の領域をコードするenvタンパク質内の保存された700bp領域に特異的なプライマーを用いて、これらの細胞株からのRNAでRT-PCRを行った（図34、パネルA）。野生型RNASELを有する全てのものを含むPCR産物が、ほとんどの細胞株において検出されなかった。しかしながら特に、LNCaPの2つの試験したクローンの1つ（LNCaP-R）は予想した大きさのバンド（band）に対して陽性であるが、もう一方（LNCaP-FGC）は陰性であった。各細胞株からのRT-PCR反応後、陽性対照GAPDHアンプリマー（391bp）が同様のレベルで存在した。

10

20

30

40

50

【0207】

LNCaP-Rレトロウイルスのゲノム

重複するcDNA断片を前立腺腫瘍試料からのXMRVゲノムを回収するために用いられた同一のRT-PCRストラテジーに適用することで、LNCaP-R細胞からの全レトロウイルスのゲノムを回収した（図31、パネルAおよびUrisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）。簡単に、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドを用いてLNCaP-Rクローンからの全RNAを逆転写した後、XMRV特異的PCRプライマーを用いてPCRした（Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）。次いで増幅したPCR断片をクローニングし、配列決定した。

【0208】

推定LNCaP-Rレトロウイルスゲノム（GenBank: DQ272467）は8185nt長であり、前立腺腫瘍由来の2つのXMRVゲノム（XMRV VP35およびXMRV VP42）に最も類似しており（Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）、94%のヌクレオチド同一性を共有する（図34、パネルB [系統樹および類似プロット]）。回収されたゲノムもまた、2つの他の異種栄養性MuLVゲノム：マウスC型レトロウイルス（GenBank: NC_001702, Heinemeyer T., 非公開）およびMuLV DG-75（GenBank: AF221065, (Raisch, KP., et al, (2003), Virology 308: 83-91)）と高いヌクレオチド同一性（92%）を共有する。これらの発見に基づいて、出願人らは該ウイルスに仮の名前のXMRV LNCaP-Rを割り当てた。

【0209】

XMRV LNCaP-Rのゲノムは、全長Gag-Pro-PolおよびEnvポリタンパク質をコードする2つの重複するORFを含む（図35A）。腫瘍由来の同系統物に類似しているので、XMRV LNCaP-Rは、付属（accessory）ウイルス調節遺伝子または宿主由来の腫瘍遺伝子配列を欠く標準的な（canonical）単純レトロウイルスである。Gagタンパク質は536 aa長であり、XMRV V P35と最も高いaa同一性（98%）を共有する（図34、パネルD）。gag AUGの上流は5' gagリーダーとして公知のca. 300 nt領域であり、多くのエコトロピックMuLVにおいて代替的CU G開始コドンから発現されたGagの小数のグリコシル化形態（グリコ-Gag）をコードする（Prats, AC, et al, (1989), JMol Biol 205: 363-372）。5' gagリーダーは、他のMuLVと比較して腫瘍由来のXMRVゲノムにおいて最も分岐した領域であることが分かった（Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）。XMRV VP35およびVP42のように、この領域はグリコ-GagのCUG開始コドンから下流の終止コドン53 aaで阻害され、XMRVの特徴である特性（signature）24-nt欠失を有し（図34、パネルC）、任意の他の公知のガンマレトロウイルスのゲノム中に見出せない。（注意：グリコ-gagタンパク質はレトロウイルスの複製に重要でないので（Fan, H., et al, (1983), Proc Natl Acad Sd USA 80: 5965-5969; Schwartzberg P, et al, (1983), J Virol 46: 538-546）、これらの病変はXMRV感

染性を阻害しないと予想される；下記参照）。同様に、腫瘍由来のXMRVゲノムに存在する全ての調節配列もまた、XMRV LNCaP-Rのゲノムの同一の位置において見出された。これらは、ウイルスの複製の際に逆転写のプライマーとして機能するプロリル-tRNAへの結合部位（Adam, MA., et al, (1988), J Virol 62: 3802- 3806; Fisher, J., et al, (1998), Virology 244: 133-145; Berlioz, C, et al, (1995), J Virol 69: 2214-2222; Wagner, S., et al, (1995), J Biol Chem 270:20376-20383）；envサブゲノムRNAの生成を伴うスプライスドナー部位およびアクセプター部位（下記参照）；転写開始を伴うTATAAA（配列番号：50）およびCCAAT（配列番号：49）ボックス（Temin, HM, (1981), Cell 27: 1-3; Coffin, JM., et al, (eds.) (1997) Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press）；グルココルチコイド応答配列（GRE）；ならびにAATAAA（配列番号：51）ポリアデニル化シグナルを含む。

10

【0210】

しかしながら、特徴のあるXMRVに対するその全般的な類似性にも関わらず、LNCaP-R単離物は、それでもなおこれら腫瘍由来の単離物とは異なる。全ゲノムのレベルにて、単離物は、互いに密接に関連するXMRV VP35配列およびVP42配列ほど、XMRV VP35配列およびVP42配列と密接に関連しない。予想されたpro-pol領域（プロテアーゼ、逆転写酵素およびインテグラーゼ活性をコードする1844 aa）に対し、腫瘍由来のXMRVとのaa同一性は、他の領域におけるよりも低く（92%）、MuLV DG-75またはMTCRで見られるものに類似する。さらに、env領域の一部は特徴のあるXMRVからの有意な分岐を示す（図34参照、XMRV35とXMRV LNCaP Rとを比較する類似プロットのためのパネルD）。それでもなお、env領域は、ウイルスがヒト細胞を含む宿主の範囲を明示することを示す異種栄養性／多種栄養性ガンマレトロウイルスに最も類似する（下記参照）。

20

【0211】

XMRV LNCaP-Rにおけるウイルス遺伝子発現

上記したように、envサブゲノムRNAの生成に関する保存されたスプライスドナー（AG GTAAG（配列番号：47），204位）部位、およびアクセプター（CACTTACAG（配列番号：48），5479位）部位は、XMRVの同じ位置で見出された（Urisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens）。gagおよびpro-polをコードする完全に非スプライスされた8.2kb転写産物、ならびにスプライスされたenv転写産物（3.2kb）の両方に対する転写産物を、両伝達暗号を検出するLTRプローブ（ヌクレオチド位置7780～7991）を用いたノザン解析によって、LNCaP-R中に確認した（図35B）。予測したように、gag特異的プローブ（ヌクレオチド位置603～957）は全長ゲノムRNAのみを検出する（図35B）；gag配列がスプライシングによって除去されるのでenv mRNAはこのプローブで検出され得ない。これらの転写産物の発現と一致して、LNCaP-R細胞の大部分は抗-Gag抗体で明確に染色されるが、LNCaP-FGC細胞は染色されなかつた（図35C）。

30

【0212】

LNCaP-R細胞は感染性XMRVを生成する

ゲノムおよびサブゲノムmRNAの存在は、LNCaP-R細胞中の組み込まれたプロウイルスDNAの存在を強く示唆した。これを直接検索するために、制限酵素PstIで切断されたゲノムDNA（env領域内で一度切断される）を抽出して検査した。得られる断片を、U3領域（位置7780～7991）に対応するプローブを用いたサザンプロットによって検査した。図36Aに示されるように、複数の挿入部位を示唆する複合体アレイのバンドはLNCaP-R中で観察されたが、ウイルス陰性株中では観察されなかつた。いくつかの宿主-ウイルス接合部のPCRに基づいたクローニングは、種々のヒト染色体上の複数の明確な組込み部位がLNCaP-R DNAの中に存在することを確認した（図36C）。

40

【0213】

LNCaP-Rにおけるウイルス組込体のパターンは、感染性ウイルスの產生を示す新たに複数の感染がこの亜系内に起こったことを意味した。これを直接示すために、LNCaP-Rからの上澄み液が他の株を感染させるかどうか決定した。LNCaP-R細胞からの上澄み液をLNCaP-FGC細胞に移し、2時間インキュベートした；このあと、細胞を洗浄し、新鮮な培地を加

50

えて次の1週間毎日上澄み液を採取した。図37Aは、この期間の培養容器における逆転写酵素活性の進行的な上昇を示し、ウイルス複製および蔓延を示す。

【0214】

XMRV-LNCaP Rの宿主範囲を調べるため、ヒト(DU145、LNCaP-FGCおよび293T)またはマウス(3T3)細胞にLNCaP-R上澄み液を接種した; 24または36時間後、RNAおよびDNAを調製し、プロット-ハイブリダイゼーションで検査した。感染したヒト(LNCaP-FGCおよび293T)およびマウス3T3細胞のノザンプロットは、ヒトの株におけるゲノムおよびサブゲノム転写産物を示したが、3T3細胞中にはXMRV mRNAは見られない(図37B)。レシピエントヒト細胞(LNCaP-FGCおよびDU145)におけるウイルスDNAのサザンプロット解析(図37C)は、未接種でなく接種されたヒトの株において、複数の独立した組込みを示す広汎性スミアのバンドを示した。(ここでマウス3T3細胞を、陽性ハイブリダイゼーションコントロールとしてのみ使用し、内因性マウスレトロウイルス由来の複数の組込み部位を明らかにした; この高いバックグラウンドは、この株におけるXMRVプロウイルスに対するサザンプロットティングの効果的な使用を妨げる)。マウスでなくヒトの細胞が感染に対して攻撃されやすいという発見は、ウイルスエンベロープタンパク質の配列から予想される異種栄養性と一致する。

10

【0215】

考察

XMRVは、前立腺癌を有する患者の前立腺組織で最初に検出された、新規のガンマレトロウイルスであり、RNASELにおけるゲノム変異である(Uriisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens)。XMRVはヒト組織の異種栄養性レトロウイルス感染の最初の例であり、RNASEL病変との疫学的関連は、感染の調節においてRNase Lに対し重要な役割を強く意味する。これらの所見は、本明細書に記載される前立腺組織のインサイチュ分析によって支持され、感染がR462Q RNase Lバリアントに対してホモ接合体である被験体において主として見出されることを強化する。重要なことに、出願人らは目下、感染が癌細胞自体に存在せず、むしろ間質細胞の部分集合、特に線維芽細胞および血液成分に存在することを示す。これらの所見は、XMRVによって提起される2つの大きな疑問:(i)どのようにしてRNase L活性はXMRV感染に影響するか?および(ii)もしあれば、XMRV感染と前立腺癌との関係は何か?を出願人らが作り上げることが可能な範囲内の境界線の条件を提供する。

20

【0216】

RNase L作用およびXMRV感染

本明細書に提供されるデータおよびUriismanと同僚のデータ(Uriisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens)は、RNASELの下方変異がインビボでのXMRV感染の獲得または生存において重要であるという強い経験的な証拠を提供する(Uriisman, A., et al, (2005), PLOS Pathogens)。動物研究および細胞培養から、RNase Lが重要な抗ウイルスタンパク質であるという考慮すべき証拠が存在するが、多くの研究は、ピコルナウイルス(Zhou, A., et al, (1997), Embo J 16: 6355-6363; Flodstrom-Tullberg, M., et al, (2005), J Immunol 174: 1171-1177)、パラミクソウイルス(Behera, AK., et al, (2002), J Biol Chem 277: 25601-25608)、アルファウイルス(Ryman, KD., et al, (2002), Viral Immunol 15: 53-76)またはレトロウイルス(Smith, JA., et al, (2005), J Virol 79: 2240-2250)を含む、RNAに基づいた複製サイクルを有するウイルスに焦点を当てていた。比較的ほとんどの研究がレトロウイルス感染における2-5 A/RNase L系の役割に焦点を当てなかつた。I型インターフェロンは明らかにレトロウイルスの複製を阻害するが、これらのサイトカインはRNase Lに加えて多くの下流エフェクターを活性化し、逆転写、翻訳、ウイルスの集合および放出を含むレトロウイルスの複製の多くの段階でブロックを形成し得る(Pitha, PM., (1994) Antiviral Res 24: 205-219; Poli, G., et al., (1994), Antiviral Res 24: 221-233; Friedman, RM., et al, (1974) Proc Natl Acad Sci USA 71: 3542-3544)。それにもかかわらず、培養細胞におけるOAS(Schroder, HC, et al, (1992), Int J Biochem 24: 55-63)またはRNase L(Maitra, RK., et al, (1998), J Virol 72: 1146-1152)の実験的過剰発現はHIV複製を妨げ、RNase Lインヒビターの過剰発現に

30

40

50

よるRNase L活性の抑制はまた、培養におけるHIV成長を適度に大きくする（Martinand, C., et al, (1999), J Virol 73: 290-296）。HIV感染において、OASは5'UTRおよびTAR内の構造RNA領域により活性化され得る；かくして、OASはHIVに対する1つの細胞「センサ」として考えられ得る（Maitra, RK., et al, (1994), Virology 204: 823-827）。OASによって検出されるXMRV RNAの領域、またはどのようにしてRNase L活性化がXMRV複製に影響を及ぼすかははっきりしていないが、LNCaP-R細胞からの感染性XMRVファミリーメンバーの採取は、実験的研究に対する両方の疑問に開かれる。RNase Lによって提起されるXMRV感染への遮断は、相対的であり絶対的ではない；RNASELにおいて病変がないDU145は、インビトロの高い感染の多重度（MOI）の条件下でXMRVによって感染され得る（図37A～37C）。これは全く驚くべきことではなく、それはMuLVのFv-1制限ならびにHIVおよびSIVのより最近同定されたリストリクター（restrictor）のようなレトロウイルス複製に対する他の公知の制限因子を有するので、その全ては高MOIにより克服され得る（Goff, SP., (2004), Mol Cell 16: 849-859; Bieniasz, PD., (2003), Trends Microbiol 11: 286-291）。多くのインビオ感染は、最初は低MOI条件で確立されるので、ウイルスの進化の間に恐らく選択されるのは、このMOIレベルでの制限である。

10

【0217】

本明細書に記載されるヒト前立腺癌細胞株を検査する結果から、いくつかの結論が引き出され得る。第一に、多くのヒト細胞のゲノムDNAにおけるウイルスDNAの非存在は、XMRVが内因性のレトロウイルスではなく、外因的に得られた病原因子であることを示す。第二にLNCaP細胞は、伝えるところによればクローニング性腫瘍から樹立されたが、組込み部位はクローニングではないようと思われる。これは、細胞株の感染がクローニング株の樹立後であることを示す；多数の構成物は、株内での感染の水平的蔓延を恐らく反映する。この解釈はまた、LNCaP-FGCクローニングが感染に対して陰性であるという事実と一致する。前立腺腫瘍のインサイチュ分析（図30～33）は、癌細胞がインビオで感染されないことを示すので、この感染はインビトロで起こったに相違ない。したがって、かかる感染に対する2つの可能性のあるシナリオ：(i)元来の腫瘍の説明の際、少数の腫瘍細胞が間質細胞からの蔓延によって感染したかもしれない；または(ii)感染は、株の連続継代間に実験室で起こったかもしれない。LNCaP-FGC細胞がATCCにて堆積するより前にクローニング的に精製された場合、可能性(ii)がよりあり得る。

20

【0218】

30

XMRV感染および前立腺癌

XMRV感染が癌細胞にではなく間質細胞に対して標的化されるという、本明細書に記載される所見は、XMRV感染の前立腺癌との関係を考慮するための主な重要性（implication）を有する。この所見、およびXMRVゲノムが宿主由来の癌遺伝子を有さないという事実は、レトロウイルスの癌遺伝子に対する2つの古典的なモデル：著しく作用する癌遺伝子の直接導入およびかかる遺伝子の挿入活性化を除外する。本明細書に記載される疫学は、XMRV感染をRNASEL遺伝子型と関連付けるが、前立腺癌に対する任意の病因論的関連を強要しないことを強調する。癌細胞からのその排除がXMRVによる直接的な腫瘍形成をあり得ないとするが、腫瘍に対するウイルスのより間接的な寄与は、確かに想像し得る。前立腺癌は長期の自然な生長を有する疾患であり、明白な悪性腫瘍を併発する前に多くの組織学的变化が腺に起こる。最近の研究は、前立腺癌がきわめて一般的に慢性前立腺炎症の徴候を伴うこと、および増殖炎症性萎縮（PIA）とよばれる障害が疾患の悪性腫瘍段階前においてしばしば見出されることを強調する（Nelson, WG., et al, (2003), N Engl J Med 349:366-381）。この炎症の副生成物（例えばフリーラジカルおよび酸化的損傷）が前立腺上皮の傷害および再生の引き金となり得ることが推測される。この増強された増殖は、複製エラーの機会が変異を発生させることを可能とする；次いで成長を規制しないものが選択的利点を有する。PIAは高グレード前立腺上皮内新形成（HGPIN）または早期癌に隣接してしばしば見出され、増大する証拠がPIA、HGPINおよび癌の間の遺伝学的に同一と見なし得る経路を示唆する（Nelson, WG., et al, (2003), N Engl J Med 349:366-381）。感染／炎症仮定の支持において、観察結果は先天免疫（TLRファミリー）、炎症反応の制御（MSR1お

40

50

よびMIC-1)、抗酸化活性(PON1およびGSTP1)、または酸化ストレスに反応するDNA修復(OGG1、CHEK2およびBRCA2)と関連する他の遺伝子のバリエントまたは後成的な事象がまた、人を前立腺癌に罹患しやすくすると報告されていることである(Zheng, SL., et al, (2004), Cancer Res 64: 2918-2922; Xu, J., et al, (2002), Nat Genet 32: 321-325; Lindmark, F., et al., (2004), J Natl Cancer Inst 96: 1248-1254; Marchesani, M., et al, (2003), J Natl Cancer Inst 95: 812-818; Xu, J., et al, (2002), Cancer Res (52):2253-2257; Dong, X., et al, (2003), Am J Hum Genet 72: 270-280; Edwards, S M., et al, (2003), Am J Hum Genet 72: 1-12)。PIAの炎症の原因は未知であるが、感染は明白な可能性のある引き金であり、間質に制限された持続性ウイルス感染は、かかるプロセスに寄与するために良い場所(well-positioned)となる。この考えにおいて、RNA SEL変異と前立腺癌とが関連する理由の1つは、RNase L-不完全先天免疫系が間質のXMRV感染を終わらすことが不可能であることである;次いで得られる持続性感染は、最終結果がPIAであり得る慢性炎症状態に寄与する(本発明者らは、XMRVが、かかるシナリオにおける単独の感染性沈殿剤(infectious precipitant)である必要がないことに注目する)。

【0219】

XMRVが主として間質細胞に影響を及ぼすという所見は、前立腺の新形成に寄与するためのさらに別の可能性のある機構を提起する。最近の研究では、間質細胞が、増殖性シグナルとしての機能を果たす種々のサイトカインおよび成長因子を生成することにより、隣接する上皮細胞の腫瘍形成の促進において活性的な役割を果たすことが示されている(TIstry, TD., et al, (2001), Curr Opin Genet Dev 11: 54-59)。特に、癌関連の線維芽細胞はヒト前立腺上皮細胞の成長を刺激し、インビボでのその組織構造を改変する(Olumi, A F., et al, (1999), Cancer Res 59: 5002-5011)。XMRV感染前立腺間質細胞は、周囲上皮の細胞増殖を刺激する成長因子、サイトカインまたは他の因子を産生および分泌することができたことが想像可能である。かかるパラクリン機構は、障害を特徴付ける比較的少数のXMRV感染細胞でもってでさえ、全く効率的になお機能することができた。

【0220】

最後に、XMRVのような外因性感染の同定は、全ての遺伝子研究がRNase Lを前立腺癌罹患性因子として一貫して同定したとは限らない理由を説明する助けになり得たことに留意されたい。しかしながら間接的に、かかる感染が前立腺癌のリスクと関連付けられ、感染の有病率が種々の母集団において均一でない場合、低XMRV有病率を有する母集団は、RNASEL病変が前立腺癌に対して関連性がないことを示すと予想され得る。

【0221】

10

20

30

表 1. 前立腺における HXV の検出(マスター!スト)

説明：MR = マウスレトロウイルス

				MR	5-177	MR		陰性	陽性	陰性	陽性	性
VP35	3-03-0530A	AA	X	5-172								陽性
VP42	3-03-0647A/B	AA	X	5-173		5-178	MR		陽性			陽性
VP62	3-03-1040A/B	AA	X						陽性			陽性
VP79	3-04-0116A1	AA	X						陽性			陰性
VP88	3-04-0381A/B	AA	X						陽性			
VP90	3-04-0430A/B	AA	X									
VP94	3-04-0286A/B	AA										
VP104	標示なし	AG										
VP33	3-03-0518A	AG										
VP37	3-03-0556A	AG										
VP40	3-03-0629A/D	AG										
VP41	3-03-0631A	AG										

VP44	3-03-03702B/D	AG									
VP45	3-03-0707	AG	X	5-190	陰性			5-195	陰性	陰性	陰性
VP46	3-03-0742A/B	AG	X	5-191	陰性			5-196	陰性	陰性	陰性
VP49	3-03-0791A1	AG	X	5-192	陰性			5-197	陰性	陰性	陰性
VP55	3-03-0898C/D	AG									
VP81	3-04-0149A1	AG									
VP82	3-04-0210A/B	AG									
VP83	3-04-0237A/B	AG									
VP89	3-04-0428A/B	AG									
VP92	?	AG									
VP04	J3	3-03-0237	GA	X	6-112	陰性		6-103	陰性		
VP05	J4	3-03-0244A/D	GA	X	6-113	陰性		6-104	陰性		

VP07	J6	3-03-00252A/D	GA	X	6-115	陰 性	6-106	陰 性
VP08	J7	3-03-0262A/D	GA	X	6-150	陰 性	6-107	陰 性
VP09		3-03-0271A/D	GA					
VP100		3-04-0495A/B	GA					
VP108		3-04-0704A/B	GA					
VP11		3-03-0307A/D	GA					
VP111		3-04-0755A/B	GA					
VP112		3-04-0759A/B	GA					
VP115		3-04-0780A/B	GA					
VP14		3-03-0329A	GA					
VP15		3-03-0330A1	GA					
VP18		3-03-0367C/D	GA					

VP22	3-03-0444A/D	GA							
VP23	3-03-0432B/D	GA							
VP56	3-03-0907A1	GA							
VP57	3-03-0934C/D	GA							
VP61	3-03-1011D1	GA							
VP63	3-03-1057A/C	GA							
VP64	3-03-1060A1	GA							
VP65	3-03-1074A/B	GA							
VP68	3-03-10192A/B	GA							
VP70	3-03-1114A/B	GA	X						
VP71	3-04-0014A1	GA							
VP73	3-04-0018A/B	GA							

10

20

30

VP74	3-04- 0041A/B	GA	X					陰性	陰性			陰性	陰性
VP77	3-04- 0051A/B	GA	X					陰性	陰性			陰性	陰性
VP78	標示なし	GA											
VP97	3-04- 0460A/B	GA											
VP01		GG											
VP02	J1	3-03- 0217A	GG	X	6-110	陰性	6-101	陰性					
VP03	J2	3-03- 0235	GG	X	6-111	陰性	6-102	陰性					
VP06	J5	3-03- 0248A/D	GG	X	6-114	陰性	6-105	陰性					
VP101		3-04- 0497A/B	GG										
VP102		3-04- 0522A/B	GG										
VP103		3-04- 0570A/B	GG										
VP105		標示なし	GG										
VP106		3-04- 0660A/B	GG										
VP109		3-04- 0705A/B	GG										

VP110	3-04-0718A/B	GG
VP113	3-04-0770A/B	GG
VP114	3-04-0776A/B	GG
VP116	3-04-0791A/B	GG
VP117	3-04-0795A/B	GG
VP118	3-04-0803A/B	GG
VP119	3-04-0806A/B	GG
VP12	3-03-0312A/D	GG
VP13	3-03-0324A/D	GG
VP16	3-03-0357B/C	GG
VP17	3-03-0358A/D	GG
VP19	3-03-0362C/D	GG
VP20	3-03-0378A/D	GG

VP21	3-03-0389A/D	GG									
VP25	3-03-0443A/D	GG									
VP26	3-03-0455A/D	GG									
VP28	3-03-0459A/D	GG									
VP30	3-03-0487A/D	GG	X	5-170	陰性	5-175	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
VP32	3-03-0497A/D	GG									
VP34	3-03-0526A	GG									
VP36	3-03-0528A	GG									
VP38	3-03-0587A/D	GG									
VP39	3-03-0589A/D	GG									
VP43	3-03-0662A/D	GG									
VP47	標示なし	GG	?								
VP48	3-03-0765A-D	GG									

VP50	3-030817A/C	GG	X	5-193	陰性	5-198	陰性						
VP51	3-03-0820A/B	GG	X	5-194	陰性	5-199	陰性						
VP52	3-03-0834B/D	GG											
VP53	3-03-0835B/D	GG											
VP54	3-03-0837C/D	GG											
VP58	3-03-0959C/D	GG											
VP59	3-03-0960C/D	GG											
VP60	3-03-0994A/B	GG											
VP66	3-03-1078A/B	GG	X										
VP67	3-03-1090A/B	GG											
VP69	3-03-1105A1	GG											
VP72	3-04-0007A/B	GG	X										

【 0 2 2 2 】

Table 2. HXV₃₅ の配列

>HXV₃₅: PCRV_complete_genome_from_RdB (Edit1, 06-30-2004;
Edit 2, 02-28-05)

GGCCAGTCATCCGATAGACTGAGTCGCCCGGTACCCGTGTTCCAATAAGCCTTT
GCTGTTGCATCCGAAGCGTGGCTCGCTGTTCTGGGAGGGTCTCTCAGAGTGATT
GACTACCCAGCTCGGGGTCTTCATTTGGGGCTCGTCCGGGATTGGAGACCCCCGC
CCAGGGACCACCGACCCACCGTCGGGAGGTAAGCCGGCCGGCATGTTGCTTTGT
CTCTGTCCTTGTGCGTGTGTGTCGGCATCTAATCTCGCGCTGCGTCTGAAT
CTGTACTAGTTAGCTAAGTGTATCTGGCGGTTCCCGGAAGAAACTGACGAGTT
CGTATTCCCGGCCGAGGGAGACGTCCAGCGGCCCTGGGGCCCGTTGTGG
CCCATCTGTATCAGTAACCTACCCGAGTCGGACTCTTGGAGTGGCTTGTGGGG
ACGAGAGACAGAGACACTTCCCACCCGTCGAATTGGCTTACGCCA
AACCGCGCCGCGCTGATTGTTGTTCTGTTCTCGTAGTTCTCT
GTCTTTAAGTGTCTCGAGATCATGGACAGACCGTAACCTACCCCTGAGTCTAACCT
TGCAGCACTGGGAGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTCAGTGATCTAACAG
AGGCGCTGGTTACCTCTGTTCCGCGAATGCCAACCTCAATGTAGGATGCCCTCA
GGATGGTACTTTAATTAGGTGTTCTCAGGTCAAGTCTAGAGTGTGCTGCT
GTCCCCACGGACACCCGGATCAGGCTCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTAT
GACCCCCCTCCGTGGGTCAAACCGTTGTCCTCTAAACCCCTCCTTACCGACAGC
TCCCCTCCTCCGCCGGTCTCTGCGAACCTCCGTCATGCCCTTACCTG
CCCTTACCTCTCTATAAGTCCAAACCTCTAACGCCCCAGGTTCTCCCTGATAGCGGC
GGACCTCTCATTGACCTCTCACAGAGGATCCCCCGCCGTACGGAGTACAACCTTCCTC
CTCTGCCAGGGAGAACATGAAGAAGAGGGGCCACACCTCCGAGGTTCCCCCTT
CTCCCATGGGTCTCGACTGCCGGAGAGACCCCTCCGCAAGCGGACTCCACCA
TCCCAGGCATTCCCACCGCATGGGGGAGATGGCAGCTCAGTACTGCCGTTTC
CTCCTCTGATTATATAATTGGAAAAATAAAACCCCTCTTCTGAAGATCCAGGTA
AATTGACGGCTTGAGTCCGCTCATCACCCACCGCCACCTGGGACGACTGT
CAGCAGTTGTTGGGACCTGCTGACCGGAGAAGAAAAGCAGCGGGTGCCTAGAGGC
TGGAAAGGCACTCCGGGCAATGATGGACGCCCACTCAGTGTGCTAATGAAGTCAATG
CTGCTTTCCCTTGAGGCCCGATTGGGATTACACCACTACAGAAGGTAGGAACAC
CTAGTCCTCTACCGCCAGTTGCTCTAGCGGGTCTCCAAACCGGGCAGGAGCCCCAC
CAATTGGCCAAGGTAAGGATAACCCAGGACCTAATGAGTCTCCCTCAGCCTTT
TAGAGAGACTCAAGGGCCATCCAGGTACACTCTTATGACCTCGAGGACCCAGGG
CAAGAACCAATGTGCCATTCATCTGGCAGTCTGCCCTGGATATGGCGAAA
GTTAGAGCGGTTAGAAGATTAAAGAGCAAGACCTTAGGAGACTTAGTGAGGGAGCTG
AAAAGATCTTAATAAGCAGAACCCGGAAAGAAAGAGAGGAACGTATCAGGAGAGAA
ATAGAGGAAAAGAAGAACGCCGTAGGGCAGAGGATGAGCAGAGAGAGAGAACAGGG
CCGCAGAACAGACATAGAGAGATGAGCAAGCTCTGCCACTGTAGTTATTGGTCAGAGAC
AGGATAGACAGGGGGAGAGCGGAGGGAGGCCACTTGATAAGGACCAATGCCCTAC
TGCAAAGAAAAGGACACTGGCTAAGGACTGCCAAAGAACGCCACGAGGGCCCCGAGG
ACCGAGGCCAGACCTCCCTGACCTTAGGTGACTAGGGAGGTCAAGGTCAAGGAGC
CCCCCTGAAACCAGATAACCTCAAAGTCGGGGGCAACCCGTACCTCTGGTA
GATACTGGGCCAACACTCCGTGTCAGCCAAAATCTGGACCCCTAAGTGACAAGTC
TGCCTGGGTCCAAGGGCTACTGGAGGAAAGCGGTATGCTGGACCAACGGATCGCAAAG
TACATCTGGCTACCGTAAGGTACCCACTCTTCCCATGTACCAAGACTGCCCTAT
CCTCTGCTAGGAAGAGACTTGCTGACTAAACTAAAAGCCAAATCCACTTCGAGGGATC

10

20

30

AGGAGCTCAGGTTGTGGGACCGATGGGACAGCCCCTGCAAGTGCTGACCCCTAACATAG
 AAAATAAGTATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTCTCTAGGGTCACA
 TGGCTTCTGATTTCCTCCCAGGCCCTGGCGGAAACCGGGGGCATGGGACTGGCAGTTCG
 CCAAGCTCCTCTGATCATACTCTGAAGGCAACCTCTACCCCCGTGTCCTATAAAACAAT
 ACCCCATGTCACAAGAAGCCAGACTGGGATCAAGCCCCACATACAGAGGCTGTTGGAC
 CAGGGAAATACTGGTACCCCTGGCAGTCCCCCTGGAACACGCCCCCTGCTACCCGTTAAGAA
 ACCAGGGACTAATGATTATAGGCCCTGTCAGGATCTGAGAGAAGTCACAAGCGGGTGG
 AAGACATCCACCCCACCGTGCCCACTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCACCGTCC
 CACCACTGGTACACTGTGCTGATTAAAGGATGCTCTTCTGCCTGAGACTCCACCC
 CACCACTGAGCTCTCTCGCCTTGAGTGGAGAGATCAGAGATGGAATCTCAGGAC
 AACTGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTCAAAAACAGTCCCACCCCTGTTGATGAG
 GCACTGACAGAGACCTAGCAGATTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACA
 GTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCCGCACTTCTGAGCAAGACTGCAACGAGGTACTC
 GGGCCCTATTACAAACCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCTCGGCCAAGAAAGCCAA
 ATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGTATCTCCTAAAGAGGGACAGAGATGGCT
 GACTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCCACCTCGAAGACCCCTGACAAC
 TAAGGGAGTTCTAGGGACGGCAGGGCTCTGCGCTCTGGATCCCTGGTTGAGAA
 ATGGCAGCCCCCTGTACCCCTTACAAAACGGGGACTCTGTTTAATTGGGCCCCAGA
 CCAGCAAAGGCCTATCAAGAAATCAAACAGGCTCTTCAACTGCCCCGCCCTGGGAT
 TGCCAGATTGACTAAGCCCTTGTAACTCTTGTGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAA
 GGCGTCCTAACGCAAAACTGGACCTTGGCGCTGGCTACCTGTCCAAAAAA
 GCTAGACCCAGTGGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCGCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCG
 TTCTGACAAAGGATGCAAGCTAACTATGGACAGCCGCTAGTCATTCTGGCCCCC
 CATGCGGTAGAACGACTGGTCAAACAACCCCCCTGACCGTTGGCTATCCAATGCCGCAT
 GACCCCACTATCAGGCAATGCTCTGGATAACAGACCGGGTTCACTGGGCTACGCC
 CCCCTCAACCCGCCACCTCTGCTCCCCCTACCGGAAAAGGAAGGCCCCCATGACTGCC
 GAGATCTTGGCTGAGACCCACGGAACCCAGACCGGACCTCACGGACCAGCCCATTCCAGA
 CGCTGATTACACTTGGTACACAGATGGAAGCAGCTTCTACAAGAAGAACGGAGAG
 CTGGAGCAGCGGTGACTACTGAGACGGAGGTAATCTGGCGAGGGCTCTGCCGGCTGGA
 ACATCCGCCAACGAGCCAACTGATAGCACTCACCAAGCTTAAAGATGGCAGAAGG
 TAAGAAGCTAAATGTTACACTGATAGCGCTATGCCACGGCCATGTCCATG
 GAGAAATATAGGAGGCAGGGTTGCTGACCTCAGAAGGAGAGAAATTAAAAACAAG
 AACGAGATCTTGGCCTGCTAAAGCTCTTTCTGCCAACGACTTAGTATAATTCA
 CTGTCAGGACATCAAAAGGAAACAGTGTGAGGCCAGAGGAACCGTATGGCAGATC
 AAGCAGCCCGAGAGGCAGCCATGAAGGCAGTTCTAGAAACCTCTACACTCTCATAGAG
 GACTCAACCCGTATACGCCCTCCCATTCCATTACACGGAAACAGATCTAAAGACT
 ACGGGAACTGGGAGCCACCTACAATCAGACAAAAGGATATTGGGTCTACAAGGCAAAC
 CTGTGATGCCGATCGTCCGTGTTGAACGTTAGACTCCCTACACAGACTCACCCAT
 CCGAGCCCTCAAAAGATGAAGGCACTCTCGACAGAGAAGAAAGCCCTACTACATGTT
 AAACCGGGACAGAACTATCCAGTATGTGACTGAGACCTGCACCGCCCTGTGCCAAGTAA
 ATGCCAGCAAAGCCAAATTGGGCAGGGGTGCGAGTACGCCGACATGCCAGGCACC
 CATTGGGAAGTTGATTTCACGGAAGTAAAGCCAGGACTGTATGGGTACAAGTACCTCCT
 AGTGGTTGTTGAGACACCTCTGCGCTGGTAGAGGGCATTCCCGACCAAGCGGGAAACTG
 CCAAGGTGCGTGTCCAAAAGCTGTTAGAAGACATTTCGAGGATTGAAATGCGCAG
 GTATTGGGATCTGATAACGGGCTGCGCTCCAGGTAAGTCAGTCAGTGCGCGA
 TTTACTGGGAATGATGGAAGTTACATTGTGCTTATAAAACCCAGAGGTTAGGACAGG
 TAGAAAGAATAAAATAAAACAATTAAAGGAGACTTTAACCAAATTAAACGCTTGCATCTGGC
 ACTAAAGACTGGGTACTCCTACTCCCCCTAGCCCTACCGAGCCCGAATACTCCGGG

10

20

30

CCCCCACGGACTGACTCCGTATGAAATTCTGTATGGGGCACCCCCGCCCTGTCAATT
 TTCATAATCTGAAATGTCAGTAAAGTAACTAATAGTCCTCTCTCAAGCTCACTTACAG
 GCCCTCCAAGCAGTACAACAAGAGGTCTGGAAGCCGCTGCCGCTGTTATCAGGACCA
 GCTAGATCAGCCAGTGATACCACACCCCTCCGTGCGGTGACGCCGTGGTACGCC
 GGCACCAAGACTAAGAACCTAGAACCTCGTGAAAGGACCTACACCGCTCTGCTGACA
 ACCCCCCACCGCTCTCAAAGTAGACGGCATCTCGTGTTGATAACAGCCGCTCACGTAAA
 GGCGCGACAACACTCCCGGCCGAAAGCATGGAAAGTCCAGCGTTCTCAAACCCCT
 TAAAGATAAGATTAACCCGTGGGGCCCTGATAATTATGGGATCTTGGTGAGGGCAG
 GAGCCTCAGTACAACGTGACAGCCCTACCAGGTCTTAATGTCACTTGGAAAATTACC
 AACCTAATGACAGGACAAACAGCTAATGCTACCTCCCTCTGGGACGATGACAGACAC
 TTTCCCTAAACTATATTTGACTTGTGATTAGTTGAGACAACTGGGATGACCCGG
 AACCCGATATTGGAGATGGTTGCCGCTCTCCCGGGAAAGAAAAAGGACAAGACTATAT
 GATTTCTATGTTGCCCGGTCAACTGTGATTAAACAGGGTGTGGAGGGCGAGAGGGG
 CTACTGTGGCAAATGGGGATGTCAGGACACTGGACAGGCATACTGGAAAGCCATCATCAT
 CATGGGACCTAATTCCCTTAAGCGAGGAAACACTCCTAAGGGTCAGGGCCCTGTTT
 GATTCCCTAGTGGGCTCCGGTAGCATCCAGGGGCCACACCGGGGGGTCGATGCAACCC
 CCTAGTCCTAGAATTCACTGACGCCGGTAAAGGGCCAGCTGGGATGCCCTAAACAT
 GGGGACTAAGACTGTATCGATCCACTGGGCCGACCGGGTGAACCTGTTCTCTGACC
 CGCCAGGTCTCAATGTAGGGCCCCCGTCCCCATTGGGCTAATCCGTGATCACTGA
 ACAGCTACCCCCCTCCCAACCGTGCAGATCATGCTCCCCAGGCCCTCGTCCCTCCTC
 CTTCAAGGCGCCCTCTATGGTGCCTGGGCTCCCCGCCTCTCAACAACCTGGGACG
 GGAGACAGGCTGCTAAACCTGGTAGAAGGAGCCTACCAAGCCCTCAACCTCACAGTCC
 CGACAAAACCAAGAGTGTGGCTGTGTTAGTATCAGGACCCCCCTACTACGAAGGGG
 TGGCGTCTAGGTACTTACTCCAACCATACCTCTGCCCGCTAAGTGTCCCGTGCACC
 TCCCAACACAAGCTGACCCGTCCGAAGTGACCGGGCAGGGACTCTGCATAGGAGCAGT
 TCCCAAAACCCATCAGGCCCTGTGTAATACCACCCAGAACAGACGAGCAGGGCTACT
 ATTTGGCCTCTCCGCCGGGACCATTGGGCTGCAAGCAGGGCTCACTCCCTGTCTA
 TCTACTACTGTGCTTAACCTAACCAACTGATTACTGTGTCCTGGTGAACCTGCCC
 GGTAACCTACCCTCCCTAAATTATGTTATGCCAGTTGGAAAGAAAACAAATATA
 AAAGAGAGCCGGTGTCTTAACCTGACCCCTGCTGTTGGAGGACTTACTATGGCGGC
 ATAGCTGCAGGAGTTGAAACAGGGACTACAGCCTAGTGGCCACCAAACAATTGAGCA
 GCTCCAGGCAGCCATACACAGACCTTGGGCTTAGAAAATCAGTCAGTGCCTAG
 AAAAGTCTCTGACCTCGTTGCTGAGGTGGTCTACAGAACCGGAGGGATTAGATCTA
 CTGTTCTCTAAAGAAGGAGGATTATGTGCTGCCCTAAAAAAAAGAATGCTGTTTACGC
 GGACCCACACTGGCGTAGTAAGAGATAGCATGCCAAAGCTAAGAGAAAGGTTAAACAGA
 GACAAAAATGTTGAAATCAGGACAAAGGGTGGTTGAGGGACTGTTAACAGGCCCCA
 TGTTTACGACCCCTGATATCCACCATATTGGGCCCTGATAGTACTTTATTAAATCCT
 ACTCTCGGACCCCTGTATTCTCAACCGCTTGGTCCAGTTGTTAAAGACAGAACATTG
 TAGTGCAGGCCCTGGTCTGACCCAAAGCTACCAACTCAAATAGATCCAGAA
 GAAGTGGAAATCAGTGAATAAGATTATTCAAGTTCAGGCTAGCTACAGTAACGCC
 AGAAGCCCCACCCATAAGGCTTAGCAGCTAGCTACAGTAACGCCATTGCAAGGC
 AAAGTACCAAGAGCTGAGTTCTCAAAAGTTACAAGGAAGGTTAATTAAAGAATAAGG
 CTTGAAATAACACTGGGACAGGGCCAAACAGGATATCTGTAGTCAGGCACCTGG
 CAGGGCCAAGAACAGATGGTCTCAGATAAACGAAACTAACACAGTTCTGGAAAGT
 CCCACCTCAGTTCAAGTCCCAAAAGACCGGGAAATACCCCAAGCCTTATTAAACT
 AACCAATCAGCTCGCTCTCGCTTGTACCCGCGCTTTGCTCCCCAGTCCTAGCCC
 TATAAAAAGGGGTAAGAACCTCCACACTCGGCGGCCAGTCATCGATAGACTGAGTC
 CCCGGGTACCCGTGTTCCAATAAGCCTTTGCTGTTGCAAAAA

10

20

30

Table 3. Hxv35 および DG-75 Gag ポリペプチド のアライメント

Lipman-Pearson タンパク質アライメント Ktuple: 2; ギャップペナルティ: 4; 配列 1 (1>536) Hxv35 gag (1>536) (1>536)	類似性 DG75 gag (1>536) (1>536)	ギャップ 数 0 0	ギャップ 長 536 536	コセンサス 長
v10	v20	v30	v40	v50
MGQTVTTPLSLTIQHWGDVQRIASNOVSVDVKRRTWTECSAEWPTENVGWPQDGTFENLGTISQVKSRVFCPGPHGHDQVPPYIIVTWEALAXDPPPWVKPF			v60	v70
MGQTVTTPLSLTI: HWGDVQRIASNOVSVDVKRRTWTECSAEWPTENVGWPQDGTFENL:I QVKS:VF. PGPHGHDQVPPYIIVTWEALAXDPPPWVKPF				
MGQTVTTPLSLTLEHWGDVQRIASNOVSVDVKRRTWTECSAEWPTEDVGWPQDGTFENL:IIQVKSKVFSPGPHGHDQVPPYIIVTWEALAXDPPPWVKPF				
~10	~20	~30	~40	~50
V110	v120	v130	v140	v150
VSPKPPPLPAPVLLPPGSAQPPSSRLSALKPAITLSSKSKPKPQVLPDGGGPLIDLILTEDPPYGVQPSASSARENNNEEAAFTSEVSPPSPMVSRLGRGR			v160	v170
VSPKPPPLPAPVLLPPGSAQPPSSRLSALKPAITLSSKSKPKPQVLPDGGGPLIDLILTEDPPYGVQPSASSARENNNEEAAFTSEVSPPSPMVSRLGRGR				
VSPKPPPLPAPVLLPPGSAQPPSSRLSALKPAITLSSKSKPKPQVLPDGGGPLIDLILTEDPPYGAQPSASSARGNDDEEEAAATSEVSPPSPMVSRLGRGR				
~110	~120	~130	~140	~150
v170	v180	v190	v200	v210
DPPAADSTTQAFFPLRMGGDQLOYWPPFSSSDLYNWKNNNPSEDPGKLTALIESVLTITHQOPTWDDCQOLLGLTGEEEKCORVILEAGKAVRGNDGRPT			v220	v230
DPPAADST: QAFFPLRMGGDQLOYWPPFSSSDLYNWKNNNPSEDPGKLTALIESVLTITHQOPTWDDCQOLLGLTGEEEKCORVILEA KAVRGNDGRPT				
DPPAADSTSSQAFFPLRMGGDQLOYWPPFSSSDLYNWKNNNPSEDPGKLTALIESVLTITHQOPTWDDCQOLLGLTGEEEKCORVILEA KAVRGNDGRPT				
~210	~220	~230	~240	~250

v310 v320 v330 v340 v350 v360 v370 v380 v390 v400
 QLPNEVNAAFPLERPDWDTTEGRNHLVLTROLLLAGLONAGRSPTNLAKVKGTIQGPNEPSAFLERLKAEYRRTPDIDEDQETNVSMSFIWOSA
 QLPNEVNAAFPLERPDWDTTEGRNHLVLTROLLLAGLONAGRSPTNLAKVKGTIQGPNEPSAFLERLKAEYRRTPDIDEDQETNVSMSFIWOSA
 QLPNEVNAAFPLERPDWDTTEGRNHLVLTROLLLAGLONAGRSPTNLAKVKGTIQGPNEPSAFLERLKAEYRRTPDIDEDQETNVSMSFIWOSA
 ^310 ^320 ^330 ^340 ^350 ^360 ^370 ^380 ^390 ^400

v410 v420 v430 v440 v450 v460 v470 v480 v490 v500
 EDIGRKLERLEDLSKTKLGDLVREAELNKRETEPEERERIRE.EEKEERRRAADEORE:ERDR:RHEMSSKILLATVVGQRDROGGERRQLDKD
 EDIGRKLERLEDLSKTKLGDLVREAELNKRETEPEERERIRE.EEKEERRRAADEORE:ERDR:RHEMSSKILLATVVGQRDROGGERRQLDKD
 EDIGRKLERLEDLSKTKLGDLVREAELNKRETEPEERERIRE.EEKEERRRAADEORE:ERDR:RHEMSSKILLATVVGQRDROGGERRQLDKD
 ^410 ^420 ^430 ^440 ^450 ^460 ^470 ^480 ^490 ^500

v510 v520 v530 (配列番号 : 3)
 QCAYCKEKGHWA KDCPKKKPRGPGRPQTSLLTLD (配列番号 : 63)
 QCAYCKEKGHWA KDCPKKKPRGPGRPQTSLLTLD (配列番号 : 64)
 QCAYCKEKGHWA KDCPKKKPRGPGRPQTSLLTLD (配列番号 : 53)
 ^510 ^520 ^530

【 0 2 2 4 】

Table 4. HXV35 および DG-75 PRO-POL ポリペプチドのアライメント

Lipman-Pearson Ktuple: 2; 配列1 (1>1196) HXV35 pro-pol (1>1196)	タンパク質アライメント ギャップベナルティ: 4; 配列2 (1>1.197) DG75 pro-pol (2>1197)	ギャップ長ベナルティ: 12 インデックス 96.5 96.5	ギャップ 数 0 0	ギャップ 長 1196 1196	コンセンサス
v10	v20	v30	v40	v50	v60
GGGQEPPEPRITLKVGGLPVTFLVDTGQHSVLTONPGPLSDKSAAWQGATGGKRYRWTIDRKVHLATGKVTHSFLHVDCPYPLIGRDLITKLKAQIHF	GGGQEPPEPRITLKVGGLPVTFLVDTGQHSVLTONPGPLSDKSAAWQGATGGKRYRWTIDRKVHLATGKVTHSFLHVDCPYPLIGRDLITKLKAQIHF	GGGQEPPEPRITLKVGGLPVTFLVDTGQHSVLTONPGPLSDKSAAWQGATGGKRYRWTIDRKVHLATGKVTHSFLHVDCPYPLIGRDLITKLKAQIHF	GGGQEPPEPRITLKVGGLPVTFLVDTGQHSVLTONPGPLSDKSAAWQGATGGKRYRWTIDRKVHLATGKVTHSFLHVDCPYPLIGRDLITKLKAQIHF	v70	v80
^10	^20	^30	^40	^50	^60
EGSGAQVVGGMQPLQVLTINENKYRLHETSKEPDVPLSDFPQWAETGGMGLAVROAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLD	EGSGAQVVGGMQPLQVLTINENKYRLHETSKEPDVPLSDFPQWAETGGMGLAVROAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLD	EGSGAQVVGGMQPLQVLTINENKYRLHETSKEPDVPLSDFPQWAETGGMGLAVROAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLD	EGSGAQVVGGMQPLQVLTINENKYRLHETSKEPDVPLSDFPQWAETGGMGLAVROAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLD	v70	v80
^110	^120	^130	^140	^150	^160
v110	v120	v130	v140	v150	v160
QGILVPCQSPWNTPLPVKRPGTNDYRPPDILREVNKRVEDIHPTVPNPYNNLLSGLPPSHOWYTVDLDAFFCLRLHPSOPLFAFEWRDEMGISGQL	QGILVPCQSEWNTPLPVKRPGTNDYRPPDILREVNKRVEDIHPTVPNPYNNLLSGLPPSHOWYTVDLDAFFCLRLHPSOPLFAFEWRDEMGISGQL	QGILVPCQSWNTPLPVKRPGTNDYRPPDILREVNKRVEDIHPTVPNPYNNLLSGLPPSHOWYTVDLDAFFCLRLHPSOPLFAFEWRDEMGISGQL	QGILVPCQSWNTPLPVKRPGTNDYRPPDILREVNKRVEDIHPTVPNPYNNLLSGLPPSHOWYTVDLDAFFCLRLHPSOPLFAFEWRDEMGISGQL	v170	v180
^110	^120	^130	^140	^150	^160
v210	v220	v230	v240	v250	v260
TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAOICOKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	v270	v280
^210	^220	^230	^240	^250	^260
v310	v320	v330	v340	v350	v360
TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAOICOKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	TWTRLPOQFKNSPTLFDALHRDLADFRQHPDILQLQYDDLLIAATESEQDCQRGTRALLQTGNYGRASAKKAO: COKQVKYLGYLLKEGORWLTEA	v370	v380
^310	^320	^330	^340	^350	^360

V410 v420 v430 v440 v450 v460 v470 v480 v490 v500
 RKE^TVMGQOPTPKTPRQLRE^LFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGT^LFNWGPDQOKAYQEIKOALLTAPALGLPDLTKEFELVDEKQGYAKGVLTQ
 RKETVMGQOPTPKTPRQLRE^LFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGT^LFNWGPDQOKAYQEIKOALLTAPALGLPDLTKEFELVDEKQGYAKGVLTQ
 RKETVMGQOPTPKTPRQLRE^LFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGT^LFNWGPDQOKAYQEIKOALLTAPALGLPDLTKEFELVDEKQGYAKGVLTQ
 ^410 ^420 ^430 ^440 ^450 ^460 ^470 ^480 ^490 ^500

 V510 v520 v530 v540 v550 v560 v570 v580 v590 v600
 KLGPWRRPVAYLSKKLDEVAAGWP^CLRMVAIAVLTKDAGKLTMQPIVTLAPHAVEALVKOPPDWLNSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPATL
 KLGPWRRPVAYLSKKLDEVAAPC^CLRMVAIAVLTKDAGKLTMQPIVTLAPHAVEALVKOPPDWLNSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPATL
 KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAARWP^CLRMVAIAVLTKDAGKLTMQPIVTLAPHAVEALVKOPPDWLNSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPATL
 ^510 ^520 ^530 ^540 ^550 ^560 ^570 ^580 ^590 ^600

 V610 v620 v630 v640 v650 v660 v670 v680 v690 v700
 LPLPEKEAPHDCLEI^IAETHGTRPDLTDQPIPDA^DTYWT^IDGSSEFLQEGQRRAAVTTTEVIW^IARALPAGTSQA^RE^ALIA^LTOALKMAEGKKLNVTID
 LPLPEK[.]APHDCLEI^IAETHGTRPDLTDQPIPDA^DTYWT^IDGSSEFLQEGQRRAAVTTTEVIW^IARALPAGTSQA^RE^ALIA^LTOALKMAEGKKLNVTID
 LPLPEKGAPHDCLEI^IAETHGTRPDLTDQPIPDA^DTYWT^IDGSSEFLQEGQRRAAVTTTEVIW^IARALPAGTSQA^RE^ALIA^LTOALKMAEGKKLNVTID
 ^610 ^620 ^630 ^640 ^650 ^660 ^670 ^680 ^690 ^700

 V710 v720 v730 v740 v750 v760 v770 v780 v790 v800
 SRYAFATAHVGEIYRRGLLTSEGREGIKNKNEILALIKAI^LFLPKR^LSTIHC^PGHQ^GKNSA^AERGNRMADQ^AAREAA^MAKVLETSTLLIEDSTP^TYP^{PH}
 SRYAFATAHVGEIYRRGLLTSEGREGIKNK:ELIA^LFLPKR^LSTIHC^PGHQ^GKNSA^AERGNRMADQ^AAREAA^M:^IF^E
 SRYAFATAHVGEIYRRGLLTSEGREGIKNKSEILLALIKAI^LFLPKR^LSTIHC^PGHQ^GKNSA^AERGNRMADQ^AAREAA^MARTSPETSTLLIEDSTP^TYP^{SH}
 ^710 ^720 ^730 ^740 ^750 ^760 ^770 ^780 ^790 ^800

 V810 v820 v830 v840 v850 v860 v870 v880 v890 v900
 HYTEDLKLRE^LFLGTATYNQTKGYWVLQGKPVMPDQSVE^LFLLDLSIHLRLTHPS^LSPORMKALLDDREES^LSYM^LNRDR^LIQV^LY^LCTACAOVNASKAKIGAGV
 HYTEDLKLRE^LFLGTATYNQTKGYWVLQGKPVMPDQ^LV^LSPORMKALLDDREES^LSYM^LNRDR^L:QY^V:E:CTACAOVNASKAKIGAGV
 HYTEDLKLRE^LFLGTATYNQTKGYWVLQGKPVMPDQ^LV^LSPORMKALLDDREES^LSYM^LNRDR^LIQV^LY^LCTACAOVNASKAKIGAGV
 ^810 ^820 ^830 ^840 ^850 ^860 ^870 ^880 ^890 ^900

RVRGHRPGTHWEVDETEVKPGGLYGYKLLVFDYDTESGWEEAFTPKEVSKILLEDIEPRFEMPOVILGSNDGPAFASQVSQSVADELLGIDWKLHCAY
 R:RGHRPGTHWEVDETEVKPGGLYGYKLLVFDYDTESGWEEAFTPKEVSKILLEDIEPRFEMPOVILGSNDGPAF.SQVS:SVADLLGIDWKLHCAY
 RIRGHRPGTHWEVDETEVKPGGLYGYKLLVFDYDTESGWEEAFTPKEVSKILLEDIEPRFEMPOVILGSNDGPAFVSQVSHSVADLLGIDWKLHCAY
 ^910 ^920 ^930 ^940 ^950 ^960 ^970 ^980 ^990 ^1000
 R:RGHRPGTHWEVDETEVKPGGLYGYKLLVFDYDTESGWEEAFTPKEVSKILLE:IFPRE.MPQVLGSNDGPAF.SQVS:SVADLLGIDWKLHCAY
 RIRGHRPGTHWEVDETEVKPGGLYGYKLLVFDYDTESGWEEAFTPKEVSKILLE:IFPRE.FGMQPQVLGSNDGPAFVSQVSHSVADLLGIDWKLHCAY
 ^910 ^920 ^930 ^940 ^950 ^960 ^970 ^980 ^990 ^1000
 KPOSSGQVERINKTITKLTITKLTLASGTKDWLILLPLALYRARNTPGPHGLTPYELLYGAPPPLVNHNPEMSKLTNPSLQAHLOAQAVQEVWRPLA
 :POSSGQVER:N:TIKETLTKLTLA:GT:DWILLPLALYRARNTPGPHGLTPYELLYGAPPPLVNHNPEMSKLTNPSLQAHLOAQAVQEVWRPLA
 RPQSSGQVERMNRITKETLTKLTLAAGTRDWILLPLALYRARNTPGPHGLTPYELLYGAPPPLVNHNPEMSKLTNPSLQAHLOAQAVQEVWRPLA
 ^1010 ^1020 ^1030 ^1040 ^1050 ^1060 ^1070 ^1080 ^1090 ^1100
 AAYQDQLDQPVIPHPFRYGDAAVWVRRHOTKNNLEPRWKGBYTVLLPTALKVUDGSAWIHAAHVKAATTTPAGTAWKVQRSONPLKIRLTRGAP
 AAYQDQLDQPVIPHPFRYGDAAVWVRRHOTKNNLEPRWKGBYTVLLPTALKVUDGSAWIHAAHVKAATTTPAGTAWKVQRSONPLKIRLTRGAP
 AAYQDQLDQPVIPHPFRYGDAAVWVRRHOTKNNLEPRWKGBYTVLLPTALKVUDGSAWIHAAHVKAATTTPAGTAWKVQRSONPLKIRLTRGAP
 ^1110 ^1120 ^1130 ^1140 ^1150 ^1160 ^1170 ^1180 ^1190 ^1200
 AAYQDQLDQPVIPHPFRYGDAAVWVRRHOTKNNLEPRWKGBYTVLLPTALKVUDGSAWIHAAHVKAATTTPAGTAWKVQRSONPLKIRLTRGAP
 AAYQDQLDQPVIPHPFRYGDAAVWVRRHOTKNNLEPRWKGBYTVLLPTALKVUDGSAWIHAAHVKAATTTPAGTAWKVQRSONPLKIRLTRGAP
 ^1110 ^1120 ^1130 ^1140 ^1150 ^1160 ^1170 ^1180 ^1190 ^1200

【 0 2 2 5 】

表 5. HXV35 および DG-75 ENV ポリペプチドのアライメント。

Lipman-Pearson ナンバク質アライメント

Ktuple:	2; ギャップ長さペナルティー	4; ギャップ長さペナルティー	12;	類似性指數	ギャップ数	ギャップ長さ	コンセンサス 長さ
配列1 (1>645)	配列2 (1>644)						
HXV35 env	DG75 env						
(1>645)	(1>644)						
(1>645)	(1>644)						

MESPAFSKPLKDKINPGLIIMGILVRAGASVORDSPHOVENTWKLTNMTGOTANATSLLGTMIDTFPKLYEDLCDLVGDNWDDPEPDIGCRSPG
 ME:PAFSKPLKDKINPGLI:MGILVRAGASVORDSPHO:ENVTW:;TNIMTIGOTANATSLLGTMIDTFPKLYEDLCDLVGD WDDPEPDIGDSCR:PG
 MEGPAFSKPLKDKINPGLIIMGILVRAGASVORDSPHQIENVTRVRLMGTQANATSLLGTMIDTFPKLYEDLCDLVGDYWDDEPDIDGCRTPG
 ^10 ^20 ^30 ^40 ^50 ^60 ^70 ^80 ^90 ^100
 GRKRTRLTIDEXVCPGHTVLTGGGGPRECGYCGRKGCETTGQAYWKPSSSNWDLISLKRGNTPK:QGPC:DSSV:SG :QGATPGERCNPLVLEFTDAGRKAS
 GR:RTRLTIDEXVCPGHTV .GCGGP EGYCGRKGCETTGQAYWKPSSSNWDLISLKRGNTPK:QGPC:DSSV:SG :QGATPGERCNPLVLEFTDAGRKAS
 GRKRTRLTIDEXVCPGHTVPIGCGGGGEGYCGRKGCETTGQAYWKPSSSNWDLISLKRGNTPK:QGPC:DSSV:SG :QGATPGERCNPLVLEFTDAGRKAS
 ^110 ^120 ^130 ^140 ^150 ^160 ^170 ^180 ^190
 WDAPKTYWGLRYRSTGADPTVLSLTRYQVINVGPVPVIGPNPVITEQLPPSQPVQIMLPRPRPPSGAAAMVPGAPPSSQOPGTGDRLLNVEGAYQAL
 WDAPK .WGRLYRSTGADPTVLSLTRYQVINVGP:PIGPNPVIT:QLPSSQPVQIMLPRPRPP:PPPS::: .SMVPGAPPSSQOPGTGDRLLNVEGAYQAL
 WDAPKTYWGLRYRSTGADPTVLSLTRYQVINVGPPIRGPNPVITDOLPSSQPVQIMLPRPRPPSDIVSMVPGAPPSSQOPGTGDRLLNVEGAYQAL
 ^200 ^210 ^220 ^230 ^240 ^250 ^260 ^270 ^280 ^290
 NLTSQDKTQECWLCLIVSGPPIYEGVAVLGYTSNHTSAPANC SVQHKLILSEVTGQGICIGAVPKTHQALCNTTQKTSQDSXYLASPAGTIVACSTGLI
 NLTSQDKTQECWLCLIVSGPPIYEGVAVLGYTSNHTSAPANC SV:SQHKLILSEVTGQGLIC:GAVPKTHQALCNTTQKTSQDSXYLA:PAGTIVAC:TGLI
 NLTSQDKTQECWLCLIVSGPPIYEGVAVLGYTSNHTSAPANC SVASOHLKLILSEVTGQGLLCVGAVPKTHQALCNTTQKTSQDSXYLA:PAGTIVACNTGTLI
 ^300 ^310 ^320 ^330 ^340 ^350 ^360 ^370 ^380 ^390

(73)

JP 2008-538494 A 2008.10.30

v410 v420. v430 v440 v450 v460 v470 v480 v490
 PCLSTTVLNLTIDCVLVEWPKVTYHSPNIVIGQFGKKTKYKREPVSLTALLGGLTGGIAGYGTTGTTALVATKQFEQLQAAIHTDICALESKVSA
 PCLSTTVLNLTIDCVLVEWPKVTYHSP. IVIGQF. : KTKYKREPVSLTALLGGLTGGIAGYGTTGTTALVATKQFEQLQAAI . LCALESKVSA
 ^400 ^410 ^420 ^430 ^440 ^450 ^460 ^470 ^480 ^490
 v510 v520 v530 v540 v550 v560 v570 v580 v590
 LEKSLTSLEVVLONRRLGLDLFLKEGGICCAALKKECCFYADHTGVVRDMSMALKRERLNGRQLFESGQGMTEGLFNRSPWETTLISTIMGPLIVLLIL
 LEKSLTSLEVVLONRRLGLDLFLKEGGICCAALK. ECCCFYADHTGVVRDMSMALKRERLNGRQLFESGQGMTEGLFNRSPWETTLISTIMGPLIVLLIL
 ^500 ^510 ^520 ^530 ^540 ^550 ^560 ^570 ^580 ^590
 v610 v620 v630 v640
 LFGPCILINRLVQFVKDRISVQALVLTQOYHQLKSIDPEVESRE (配列番号 5)
 LFGPCILINRLVQFVK: RISTVQALVLTQOYHQLKSIDPE. VESRE (配列番号 6 7)
 LFGPCILINRLVQFVKGRISVQALVLTQOYHQLKSIDPEAVESRE (配列番号 6 8)
 ^600 ^610 ^620 ^630 ^640

【 0 2 2 6 】

表 6. HXV₃₅ および DG-75 のプライマー結合部位
 0 2 2 7]

HXV35 PBS : T G G G G C T C G T C C C G G A T (配列番号 6 9)
 プロリン tRNA

DG-75 PBS (1) : T G G A G G T C C C A C C G A G A T (配列番号 7 0)
 スレオニン tRNA

DG-75 PBS (2) : T G G A G G C C C A G C G A G A T (配列番号 7 1)

表 7. 異なるアレトロウイルスのSUTANパク質の可変領域AおよびB

可変領域 A :

HXV35	(異種栄養性)	DnWDDpepdiqd (配列番号 7 2)	[...]GCrTPggrR (配列番号 7 3)
DG-75	(異種栄養性)	DyWDDpepdiqd (配列番号 7 4)	[...]GCrTPgggrR (配列番号 7 5)
MCF247	(多種栄養性)	DdWDEtg1 (配列番号 7 6)	[...]GCrTPgggrR (配列番号 7 7)
MKVENVVA MLV	(両栄養性)	EeWDPsdqepyvgy (配列番号 7 8)	[...]GCrTPgggrQ (配列番号 7 9)
M-MLV	(エコトロビック)	SYWGLEYqspfssppgppocsgsspgcsrdceepltsltpRCntAwnRLK (配列番号 8 0)	

可変領域 B :

HXV35	(異種栄養性)	trlyd (配列番号 8 1)	[...]FYVCPGhvtvlG (配列番号 8 2)
DG-75	(異種栄養性)	trlyd (配列番号 8 3)	[...]FYVCPGhvtvpIG (配列番号 8 4)
MCF247	(多種栄養性)	artfd (配列番号 8 5)	[...]FYVCPGhvtvpTG (配列番号 8 6)
MKVENVVA MLV	(両栄養性)	trtfd (配列番号 8 7)	[...]FYVCPGhvtvsKG (配列番号 8 8)
M-MLV	(エコトロビック)	ldgtthksnegFYVCPGphrprEsks (配列番号 8 9)	

表 8. LNCap 由来ウイルスの部分配列のアライメント。

LNCap RNA RTPCR 産物由来 の配列。(7084-7750bp)

AAAAAGAGGCCGGTGTGTTGGGACTTACTATGGGGCATAGCTCAGGAGTTGGACACGGACTACAGCCCTAGTGGCCACCA
AACACATTGAGCAGCNCAGGCAGCTACATACAGCCTGGGCCTTAGAAAATCAGTCAGTGCCTAGAAAGTCCTGACACTCGTGA
AAACCCGGGGATTAGATCTACTGTCTCAAAGGAGGAGATTAGTGCCTGCGCTTAAGAAGAAAGAATGCTGTTAACGGGACCACT
ATGGCAAGCTAACGCAAGGATPRACAGAGAACAAAATGTTGCAATTCAGACAAAGGGTCTTGTGAGCTTAAACGGTCCCATT
CCCCACACCACTATGGCCCTTGATGATACTTATTAATCCACTTTGAACTCTGAACTCTGAACTCTGAACTCTGAACTCTG
CAGGGCTGGTTCTGACCCAGCACTATCACCAACATCAATAGTCAGAAGTGGAACTACGTGAAATAAGATTTTATTCTGAA
TGTGAAAGACCCCCCATAGG (SEQ ID NO. 6)

Lipman-Pearsonタンパク質アライメント例: 2:ギャップ

類似性配列2(1>645) : 4; キャップ長きペナルティー : 12
配列1(1>127) : 2; ペナルティー : 4; キャップノーマル

LNCAP env 配列
(2>123)
HXV35 env
(496>616)
指標
97.6

(2>123) (2>123) (496>616) (496>616) 97.6

V10 . V20 . V30 . V40 . V5

KSVSVALEKSLTSLSEVVVLQNRGLDLLKEGGLCAALKKEEECCFYADHTG
KSVSVALEKSLTSLSEVVVLQNRGLDLLKEGGLCAALKFCEEVYADHTG

KSVSALEKSLTSLSSEVLLNQNKNGDILLELREGGLCAALK. EECF YADHIC
AEF12

500 ^510 ^520 ^530 ^540

v110 v120 (配列器를 90)

(配列番号 9-1) (配列番号 9-2)

LLILLFGBCLNRVQFVKD (配列番号92)
^600 ^610

Lipman-Pearson タンパク質アライメント

Ktuple: 2; ギャップ : 4; ギャップ長さペナルティー : 12
配列1 (1>127) 配列2 (1>644)
INCAP env DG-75 env
(2>123) (495>615)
(2>123) (495>615)

ギャップ	長さ	ギャップ	長さ
数		数	
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	1

v10 v20 v30 v40 v50 v60 v70 v60 v90
KSVSALEKSLSLTSLSEVVLQNRRLGLDLIPLKEGLCAALKEECCFYADHTGVVRDSSMAXLRERLNOROKLFEESGOGWEEGLNRSPWFTTLIST
KSVSALEKSLSLTSLSEVVLQNRRLGLDLIPLKEGLCAALKEECCFYADHTGVVRDSSMAKLRERLNOROKLFEESGOGWEEGLNRSPWFTTLIST
KSVSALEKSLSLTSLSEVVLQNRRLGLDLIPLKEGLCAALKEECCFYADHTGVVRDSSMAKLRERLNOROKLFEESGOGWEEGLNRSPWFTTLIST
^500 ^510 ^520 ^530 ^540 ^550 ^560 ^570 ^580

v100 v110 v120
TIMGPLIVLLILLFGPCILNRLVQFVXD (配列番号 9 0)
IMGPLIVLLILLFGPCILNRLVQFVR: (配列番号 9 3)
-IMGPLIVLLILLFGPCILNRLVQFVKG (配列番号 9 4)
^590 ^600 ^610

【 0 2 2 9 】

表 9. RT-PCRおよびFISHによって測定された前立腺におけるHXVの存在

VP番号	RNL 遺伝子型	RT-PCR によるHXV	FISH (+) 細胞		% FISH (+) 細胞	FISH によるHXV
				細胞数		
VP 29	AA	有	7	659	1.062	++
VP 42	AA	有	6	530	1.132	++
VP 62	AA	有	10	904	1.106	++
VP 88	AA	有	5	408	1.225	++
VP 31	AA	無	6	526	1.141	++
VP 79	AA	有	2	464	0.431	+/-
VP 10	AA	有	1	872	0.115	-
VP 35	AA	有	1	849	0.118	-
VP 90	AA	有	1	843	0.119	-
VP 27	AA	無	0	762	0.000	-
VP 45	AG	無	0	987	0.000	-
VP 46	AG	無	0	794	0.000	-
VP 30	GG	無	1	661	0.151	-
VP 50	GG	無	1	787	0.127	-
VP 51	GG	無	0	842	0.000	-
<1/500= -; 1-2/500 = +/-; 3-4/500 +; 5-6/500 ++						

10

20

【 0 2 3 0 】

表 10. gag ネステッド RT-PCR による XMRV スクリーニング

	遺伝子型 ^a			合計
	QQ	RQ	RR	
PCR +	8	0	1	9
PCR -	12	14	51	77
合計	20	14	52	86

^aRNASEL 遺伝子型は以下の通りである：QQ— ホモ接合体 R462Q バリアント ; RQ— ヘテロ接合体 ;
RR— ホモ接合体 野生型

【 0 2 3 1 】

表 11. XMRV ゲノムの配列決定のために用いられるPCRプライマー

プライマー	配列	断片の大きさ	XMRV ヌクレオチド位置
IF	5'-GCGCCAGTCATCCGATAAGACT(配列番号 95)	642	1-642
NA3-136R	5'-CCCAGTGCTGCAAGGTTAGA(配列番号 96)		
550F	5'-CGCCGAAACCGCGCCGCGCGT(配列番号 97)	968	526-1494
1500R	5'-TCGTCGCCCGGACTGCCTTCTG(配列番号 98)		
1470F	5'-GACAGGAGAAGAAAAGCAGCG(配列番号 99)	1280	1440-2720
2730R	5'-GCTTGGCGAAC TGCCAGTCCC(配列番号 100)		
2670F	5'-AGCCGGATGTTCTCTAGGGT(配列番号 101)	1228	2631-3859
3870R	5'-GCTTGCCTGCATCTTTGTC(配列番号 102)		
3810F	5'-AGACCCAGTGGCAGCCGGGT(配列番号 103)	1400	3780-5180
5190R	5'-TGACTTACCTGGGAGACGAAG(配列番号 104)		
5100F	5'-AACTGCCAAGGTGTGACCAA(配列番号 105)	748	5071-5819
5842R	5'-AACTATTGGGGGCCCCACGGGTTA(配列番号 106)		
NA7-F	5'-CATGGAAAGTCCAGCGTTCT(配列番号 107)	1448	5753-7201
C9-R	5'-AGCTGCTCGAATTGTTGGT(配列番号 108)	997	7175-8172
7200F	5'-CTAGTGGCCACCAAACAATTC(配列番号 40)		
K1-R	5'-AAGGCTTATTGGGAACACG(配列番号 109)	411	7578-7989
7600F	5'-CGCTTGGTCCAGTTGTAAAA(配列番号 38)		
227R	5'-TGGGGAAC TGAAACTGAGG(配列番号 39)		
100F	5'-AGGGGCCAACAGGATAACT(配列番号 110)	127	7862-7989
227R	5'-TGGGGAAC TGAAACTGAGG(配列番号 111)		
B7-F	5'-TCTGGAAAGTCCCACCTCAG(配列番号 112)	216	7956-8172
K1-R	5'-AAGGCTTATTGGGAACACG(配列番号 109)		

10

20

30

表 12. 図 22A-22Bに示された Virochip マイクロアレイに対するE-予測を用いる
コンピュータによるウイルス種の予測

試料	アレイ ID	最上位の予測 ($p < 0.05$) ^a	NCBI 分類 ID	p- 値
VP10	MegaViroP7-244	NA		
VP27	MegaViroP7-245	NA		
VP29	MegaViroP5-174	脾臓病巣形成	11819	1.3E-05
VP31	MegaViroP5-176	NA		
VP35	MegaViroP5-177	脾臓病巣形成	11819	1.0E-05
VP42	MegaViroP5-178	マウス骨肉腫	11830	1.5E-05
VP62	MegaViroP8-037	脾臓病巣形成	11819	2.0E-05
VP79	MegaViroP8-030	C型マウス	44561	2.9E-03
VP88	MegaViroP8-031	脾臓病巣形成	11819	1.4E-05
VP90	MegaViroP8-032	脾臓病巣形成	11819	2.4E-04
VP107	MegaViroP7-246	NA		
VP45	MegaViroP5-195	NA		
VP46	MegaViroP5-196	NA		
VP49	MegaViroP5-197	NA		
VP30	MegaViroP5-175	NA		
VP50	MegaViroP10-128	NA		
VP51	MegaViroP5-199	NA		
VP66	MegaViroP8-035	NA		
VP86	MegaViroP8-036	脾臓病巣形成ウイルス	11819	8.2E-04
HeLa	MegaViroP5-179	18型ヒト乳頭腫ウイルス	10582	1.0E-06

10

20

先に記載されたように、E-予測を用いて^aマイクロアレイを分析した

(Urisman, A., et al. (2005), Genome Biol 6: R78)

【 0 2 3 3 】

表 13. FISHによって測定されたXMRVに感染した前立腺細胞の頻度

患者	RNASEL アミノ酸残基 462 ^a	全細胞数 ^b	FISH/XMRV 陽性細胞 (%)	XMRV FISH ^c	XMRV gag RT-PCR ^d
VP 88	QQ	408	5	++	+
VP 31	QQ	526	6	++	-
VP 42	QQ	530	6	++	+
VP 62	QQ	904	10	++	+
VP 29	QQ	659	7	++	+
VP 79	QQ	464	2	+	+
VP 10	QQ	872	1	+/-	-
VP 35	QQ	849	1	+/-	+
VP 90	QQ	843	1	+/-	+
VP 45	RQ	987	0	-	-
VP 46	RQ	794	0	-	-
VP 30	RR	661	1	+/-	-
VP 50	RR	787	1	+/-	-
VP 51	RR	842	0	-	-

10

20

^a, SNP nt1385 "A" はアミノ酸462位にてグルタミン(Q)をもたらし、
SNP nt1385 "G" は残基462位のアルギニン(R)に対応する；

^bは、全ての前立腺細胞の型を含む； ^c, +/- = 0.1-0.2%
+ = 0.2-1%; ++ = >1%; ^d Urisman, A., et al., (2005), PLOS

Pathogens を参照。

【 0 2 3 4 】

本明細書に記載される全ての引用文献は、その全体が参考により援用される。

【 0 2 3 5 】

本発明は、その好ましい態様に関して特に示され記載されるが、添付の請求の範囲によつて包含される発明の範囲から逸脱することなく、形式および詳細においての種々の変更が本明細書中になされ得ることを、当業者は理解されたい。

30

【 0 2 3 6 】

寄託された微生物または他の生物材料に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下の表示は、ページ19、23行およびページ20、5行の記載に参照される、寄託された微生物または他の生物材料に関する表示。		
B. 寄託の表示		補助紙面に表示されるさらなる寄託 []
寄託機関名 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION		
寄託機関の住所（郵便番号および国名を含む） アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニヴァーシティー ブルヴァード 10801 American Type Culture Collection		
寄託日 2005年3月30日	受託番号	未入手
C. 補助表示（該当しない場合は空白） 歐州特許を求める指定に関して、出願人はここで、欧州特許の付与の通知の公表までまたは出願日から20年間、本願が拒絶され、または取り下げられるか、もしくは取り下げと見なされる場合、受託番号[]で American Type Culture Collectionに寄託される生物材料が、欧州特許条約第28条3項に規定されるように、請求人により指定される専門家への試料の供給によってのみ利用可能であることを要請することを国際事務局に通知する（欧州特許条約第28条4項）。		
D. 表示される指定国（全指定国について表示がない場合） 20		
E. 別の表示（該当しない場合は空白） 下記の表示は後に国際事務局に提出される（例えば「寄託の受託番号」等の表示の一般的な種類を特定する） 20		

受理官庁の使用に限る <input type="checkbox"/> 本紙は国際出願で受理された	国際事務局の使用に限る <input type="checkbox"/> 本紙は国際事務局に受理された
権限のある職員	権限のある職員

10

20

30

Based on PCT/R0/134 (July 1998; reprint January 2004)

【0237】

寄託された微生物または他の生物材料に関する表示

(補助紙面)

C. 補助表示（続き）

本PCT出願におけるオーストラリアの指定に関して、およびオーストラリア特許規則の規則3.25条3項に従って、出願人はここで、受託番号 未入手(N/A) で American Type Culture Collectionに寄託される生物材料の試料の分譲が、特許の付与前、または本願の消滅、拒絶もしくは取下げ前に、本発明に関係のない当業者、および試料の分譲の請求に指定された者に実施されるに過ぎないことを通知する。

本PCT出願におけるカナダの指定に関して、出願人はここで、カナダ特許が出願に基づいて発行されるか、または本願が拒絶されるか、または放棄されて復活しないか、または取り下げられるまで、特許庁長官だけが、受託番号 未入手 で American Type Culture Collectionに寄託され、本願に参照される生物材料の試料の分譲を、長官が指定した独立した専門家に認可することを要請することを国際事務局に通知する。

【図面の簡単な説明】

【0238】

40

50

【図1】図1は、インターフェロンの抗ウイルス活性における2'-A/RNアーゼL系の役割を示す概略図(schematic)である；2'-PDE、2',5'-ホスホジエステラーゼ；P'tase、5'-ホスファターゼ。

【図2】図2は、RNアーゼLのドメイン構造と並べた前立腺癌症例の異なる集団におけるRNASEL変異を示す概略図である；LOH、ヘテロ接合の損失(Carpten, J., et al., Nature Genetics 2002; 30:181-4; Rokman A., et al., Am J Hum Genet. 2002 May; 70(5): 1299-304; Rennert, H., et al., Am J Hum Genet. 2002 Oct; 71(4):981-4; Wang D., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24): 15687-92; Casey G., et al., Nat Genet. 2002 Dec; 32(4):581-3; Xiang Y., et al., Cancer Res. 2003; 63(20):6795-801)。 10

【図3】図3は、ウイルス転写物と並べたHXVのゲノム構造を示す概略図である。

【図4】図4は、HXV₃₅(図において「PCRV」と示す)および他のガンマレトロウイルス間の関係の樹状図である。

【図5】図5は、MFOLD (Zuker M., et al., RNA, 1998, 4(6):669-79, 1998)を用いて行なわれるHXV₃₅ ゲノムRNAの推定二次構造を示す。

【図6】図6は、RT-PCRによって測定したときの、ヒト前立腺癌組織におけるHXV RNAの存在を示すアガロースゲルである。エチジウムプロミドは、ネステッドRT-PCR産物の電気泳動の1%アガロースゲルを染色した。HXV RNAは、VP 10 (しかし、VP 107およびVP27は検出されない)前立腺RNA試料中にGAGネステッドRT-PCR産物として検出されたが、唯一の非特異的増幅産物がHEMIネステッドレーンで観察された。方法：1回の反応に、1 μgのDNアーゼ処理全RNA、1 uLのリバースプライマー(100 pmol)、および7.5 uLのH₂Oを使用した。変性は65 °Cで5分間であり、プライマーは室温で5分間アニーリングした。10 μLの反応混合物(10 × バッファー(Stratascript)2 μL、12.5mM dNTP 0.8 μL、H₂O 3.2 μL、0.1M DTT 2 μL、およびRT 2 μL)を添加し、試料を42 °Cで1時間インキュベートした。次いで、2 μLの各RT反応物をPCRに供給(seed)するために使用した。すべてのプライマーは100 pmol/uLであった。50 uL 反応のためのPCR配合(recipe)は、以下のとおり：10 × PCRバッファー(Stratascript)5 μL、50mM MgCl₂ 2 μL、外側フォワードプライマー0.5 μL、外側リバースプライマー0.5 μL、25mM dNTP 0.5 μL (または1 μLの12.5mM)、Taq DNAポリメラーゼ0.5 μL (5U/ μL Invitrogen Inc.)、50 μLまでのH₂Oである。PCRパラメータ：94 °Cで2分間の変性、[94 °Cで45秒間、45秒間外側プライマーアニーリング、72 °Cで1.5分間] × 30サイクル、その後、72 °Cで7分間の伸長工程。1 μLの外側PCRを内側PCRに供給するために使用した。内側PCRのためのサーモサイクリングパラメータは、プライマーアニーリング温度を除いて、外側と全く同じであった。Ld = DNAラダー、- = w/o cDNA。 20

【図7】図7は、RT-PCRによって測定したときのLNCaP (クローンR)細胞株におけるHXV関連RNAの存在を示すアガロースゲルである。エチジウムプロミドは、RT-PCR産物の電気泳動の1%アガロースゲルを染色した。前立腺癌細胞株LNCaP_R、PC3およびDU 145ならびに正常前立腺上皮細胞(PrEC)RNA由来の逆転写(DNアーゼ処理)全RNA1 μgを、ウイルスenv領域(上)およびGAPDH(下)に特異的なプライマーを用いたRT-PCRによって増幅した。Ld = DNAラダー、-cDNAなし、+ cDNAあり。 30

【図8】図8は、逆転写酵素アッセイによって測定したとき、LNCaP細胞はHXV-関連ウイルスを産生することを示す。RT活性は、成長の2、4および8日目に(12時間暴露)、ウイルス感染LNCaP 細胞培地において観察された。2、4および8日目由来の培地を、RTアッセイ前に新鮮培地で1:10に希釈した。培地を含有しないMock反応物をネガティブコントロールとして使用した。 40

【図9】図9は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによって決定したときの、LNCaP 細胞株におけるウイルスの存在を示す。LNCaP_R (A)、PC3 (B)およびDU 145 (C)細胞から調製したサイトブロック(cytoblock)におけるFISH解析。ウイルスenv ゲノムの2.14kbセグメントを用いて、ウイルスFISHプローブを作製した。(A)ポジティブ蛍光緑色シグナルが、LNCaP_R細胞細胞質および核の両方に見られ、ウイルスRNAおよびDNAの両方の標識を示す。(B)PC3細胞および(C)DU145細胞における蛍光シグナルの非存在。方法：脱パラフィ 50

ン化されたスライドを一連の減少エタノール濃度により再水和した。再水和された組織を40分間約95%で標的回復に供し、次いで、20分間室温まで冷却した。組織をH₂O中で灌ぎ、次いで、300 μlのプロテイナーゼKを室温で10分間、直接スライドに適用した。組織を、H₂O中で再度灌ぎ、増大EtOH濃度により脱水し、次いで、風乾した。10ulのプローブ混合物を適用し、スライドにカバースリップを載せ、脱気し、ラバーセメントで密閉した。プローブおよび標的DNAを73°Cで同時変性した。ハイブリダイゼーションを37°Cで一晩行なった。スライドを3秒間ストリンジエント洗浄し、2X SSC洗浄液中で1分間57°Cでインキュベートした。次いで、スライドを2X SSCで灌いだ。DAPI対比染色を伴うVectashield Mounting Medium(Vectashield Inc.)を適用し、より明白な核可視化のためにDAPIが核酸に充分結合するが可能となるように、スライドを暗所で室温で少なくとも30分間インキュベートした。青：DAPI、緑：ウイルス

【図10】図10は、ヒト前立腺癌組織におけるウイルスRNAの存在を示す。2つの異なるホモ接合変異型RNアーゼL患者(A)患者VP29(B, C, D,)患者VP62由来のヒト前立腺癌TMAにおけるFISHの共焦点蛍光顕微鏡検査。方法：脱パラフィン化ヒト前立腺癌TMAスライドを一連の減少EtOH濃度により再水和した。再水和された組織を40分間約95%で標的回復に供し、次いで、20分間室温まで冷却した。組織をH₂O中で灌ぎ、次いで、-300 μlのプロテイナーゼKを室温で10分間、直接スライドに適用した。組織を、H₂O中で再度灌ぎ、増大エタノール濃度により脱水し、次いで、風乾した。10ulのプローブ混合物を適用し、スライドにカバースリップを載せ、脱気し、ラバーセメントで密閉した。プローブおよび標的DNAを73°Cで同時変性した。ハイブリダイゼーションを37°Cで一晩行なった。スライドを3秒間ストリンジエント洗浄し、2X SSC洗浄液中で1分間57°Cでインキュベートした。次いで、スライドを2X SSCで灌いだ。DAPI対比染色を伴うVectashield Mounting Medium(Vectashield Inc.)を適用し、より明白な核可視化のためにDAPIが核酸に充分結合するが可能となるように、スライドを暗所で室温で少なくとも30分間インキュベートした。青：DAPI、緑：ウイルス

【図11】図11は、ウサギにおいて抗体を生成させるために使用したHXV₃₅gagペプチド(配列番号:3)、HXV gagペプチド(配列番号:7、8、9)のアミノ酸配列およびHXV35 gagタンパク質から作製した疎水性親水性プロットを示す。

【図12】図12は、(レーン1)LNCaP_R、(レーン2)PC3および(レーン3)DU145細胞由来の個々のタンパク質における(A)抗NCおよび(B)抗MA抗体を用いたウエスタンプロットを示す。

【図13】図13は、HXV₃₅のアミノ酸配列(配列番号:2)を示す。

【図14】図14は、HXV₃₅gagペプチドのアミノ酸配列(配列番号:3)を示す。

【図15】図15は、HXV₃₅pro-pol ペプチドのアミノ酸配列(配列番号:4)を示す。

【図16】図16は、HXV₃₅env ペプチドのアミノ酸配列(配列番号:5)を示す。

【図17】図17は、RNA RTPCR産物(7084～7750bp)(配列番号:6)として得られ、HXV₃₅env ヌクレオチド配列と97%の同一性を有し、HXV₃₅ env アミノ酸配列と97.6%の類似性を有するHXV-LNCaP ウィルス配列の部分ヌクレオチド配列であり、HXV-LNCaPおよびHXV₃₅が同じウイルスの変異型であることを示す。

【図18A】図18A～18Dは、患者VP62由来の前立腺の免疫組織化学的解析を示し、これは、前立腺のホモ接合R462Q RNアーゼLがFISHによってXMRV陽性であることを示す。図18A～18D、左パネル：Roche製のマウス抗サイトケラチンAE1/AE3 (AE1対AE3の20:1混合物)モノクローナルAbカクテルを用いた免疫組織化学(IHC)(赤色)。抗ケラチンAE1 Abは、酸性サブファミリーの56.5、50、50'、48および40 kDaケラチンを認識する。抗ケラチンAE3 Abは、塩基性サブファミリーの6つのメンバーのすべてを認識する。IHC(赤色)は前立腺上皮細胞を標識する。緑色標識は、図9に対する説明に記載されたHXV₃₅ env プローブのためのFISHである。青は核のDAPI染色である。図18A～18D、右パネル。ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図18B】図18A～18Dは、患者VP62由来の前立腺の免疫組織化学的解析を示し、これは、前立腺のホモ接合R462Q RNアーゼLがFISHによってXMRV陽性であることを示す。図18A～18D、左パネル：Roche製のマウス抗サイトケラチンAE1/AE3 (AE1対AE3の20:1混合物)モノ

10

20

30

40

50

クローナルAbカクテルを用いた免疫組織化学(IHC)(赤色)。抗ケラチンAE1 Abは、酸性サブファミリーの56.5、50、50'、48および40 kDaケラチンを認識する。抗ケラチンAE3 Abは、塩基性サブファミリーの6つのメンバーのすべてを認識する。IHC(赤色)は前立腺上皮細胞を標識する。緑色標識は、図9に対する説明に記載されたHXV₃₅ env プローブのためのFISHである。青は核のDAPI染色である。図18A～18D、右パネル。ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図18C】図18A～18Dは、患者VP62由来の前立腺の免疫組織化学的解析を示し、これは、前立腺のホモ接合R462Q RNアーゼLがFISHによってXMRV陽性であることを示す。図18A～18D、左パネル：Roche製のマウス抗サイトケラチンAE1/AE3 (AE1対AE3の20:1混合物)モノクローナルAbカクテルを用いた免疫組織化学(IHC)(赤色)。抗ケラチンAE1 Abは、酸性サブファミリーの56.5、50、50'、48および40 kDaケラチンを認識する。抗ケラチンAE3 Abは、塩基性サブファミリーの6つのメンバーのすべてを認識する。IHC(赤色)は前立腺上皮細胞を標識する。緑色標識は、図9に対する説明に記載されたHXV₃₅ env プローブのためのFISHである。青は核のDAPI染色である。図18A～18D、右パネル。ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図18D】図18A～18Dは、患者VP62由来の前立腺の免疫組織化学的解析を示し、これは、前立腺のホモ接合R462Q RNアーゼLがFISHによってXMRV陽性であることを示す。図18A～18D、左パネル：Roche製のマウス抗サイトケラチンAE1/AE3 (AE1対AE3の20:1混合物)モノクローナルAbカクテルを用いた免疫組織化学(IHC)(赤色)。抗ケラチンAE1 Abは、酸性サブファミリーの56.5、50、50'、48および40 kDaケラチンを認識する。抗ケラチンAE3 Abは、塩基性サブファミリーの6つのメンバーのすべてを認識する。IHC(赤色)は前立腺上皮細胞を標識する。緑色標識は、図9に対する説明に記載されたHXV₃₅ env プローブのためのFISHである。青は核のDAPI染色である。図18A～18D、右パネル。ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【図19】図19は、LNCaP、クローンRの免疫組織化学的解析であり、LNCaPクローンRが、p30キャップシドに対する抗体を用いるIHCによってXMRV陽性であることを示す。図19、左パネル：HXV gagタンパク質の標識 + 核のDAPI(青)染色を示す、ヤギにおいて調製されたローシャーマウス白血病ウイルスp30タンパク質(ATCC、カタログ番号VR-1564AS-Gt)に対する特異的抗血清を用いた免疫組織化学。右パネル：核のDAPI染色。

【図20】図20は、LNCaP感染細胞におけるHXVのIHCおよびFISHによる二重標識を示し、LNCaPクローンRは、FISHおよびIHCによりXMRV陽性であることを示す。HXV gagタンパク質の標識 + 核のDAPI(青)染色 + 図18A～18Dに示されたウイルス核酸のFISH標識(緑色)を示す、ヤギにおいて調製されたローシャーマウス白血病ウイルスp30タンパク質(ATCC、カタログ番号VR-1564AS-Gt)に対する特異的抗血清を用いた免疫組織化学。

【図21】図21は、LNCaP細胞によって生成されたウイルス(XMRV-LN)は、DU145ヒト前立腺癌細胞に感染するために使用した場合、感染性であることを示す逆転写酵素アッセイの結果を示す。DU145細胞は、8ug/ml ポリブレン、-FBSの存在下で、500 uLのLNCaP感染上澄により3時間感染させた。ウイルスを逆転写酵素アッセイによってモニターした。

【図22】図22A～22Bは、DNAマイクロアレイおよびRT-PCRによるXMRV検出を示す。図22Aは、19名の患者由来の腫瘍試料について得られたVirochipハイブリダイゼーションパターンを示す。試料(x軸)およびマイクロアレイ上に存在する502個のレトロウイルスオリゴヌクレオチド(y軸)を、階層的クラスター化を用いてクラスター化した。カラーバーは、観察されたハイブリダイゼーション強度の範囲を示す。拡大図は、最も強い陽性シグナルを有するオリゴヌクレオチドを含む選択されたクラスターを示す。QQ RNASEL遺伝子型を有する患者由来の試料を赤色で示し、RQおよびRR個体由来のものならびにコントロールを黒で示す。図22Bは、XMRV gag遺伝子に特異的なネステッドRT-PCRの結果を示す。増幅されたgag PCR断片は、対応するヒトGAPDH増幅コントロールとともに、マイクロアレイクラスターと同じレーン順を用いたゲル電気泳動によって分離された。

【図23】図23A～23Cは、XMRVの完全ゲノムを示す。図23Aは、8185 nt XMRVゲノムのケマティック(chematic)地図である。LTR領域(R、U5、U3)を四角で示す。Gag、Gag-Pro-Pol

10

20

30

40

50

およびEnv ポリタンパク質をコードする推定オープンリーディングフレームを緑色で示す。対応する開始コドンおよび停止コドン(AUG、UAG、UGA、UAA)ならびに選択的Gag開始コドン(CUG)を、そのヌクレオチド位置とともに示す。同様に、スプライスドナー(SD)およびアクセプター(SA)部位を示し、スプライスされた3.2Kb Env サブゲノムRNA(波線)に対応する。図23Bは、XMRV VP₃₅ゲノムクローニングおよび配列決定を示す。マイクロアレイオリゴヌクレオチドのハイブリダイズからのプローブ回収(青色バー)または腫瘍cDNAからのPCR(黒色バー)によって得られたクローンを配列決定した。個々のクローン(表10)を増幅するために使用したプライマーは、MTCRのゲノム(黒色矢印)または重複VP35クローン(青色矢印)のいずれかに由来した。図23Cは、XMRV VP35をXMRV VP42、MuLV DG-75およびMTCRと比較するゲノム配列類似性プロットを示す。AVID (Bray, N., et al., Genome Res., 13:97-102 (2003)) を用いてペアワイズ整列を行ない、100ヌクレオチドのデフォルト10 ウィンドウサイズでmVISTA (Frazer, KA, et al., Nucleic Acids Res., 32.W273-279 (2004)) を用いてプロットを作製した。Y軸目盛は、50~100%のヌクレオチド同一性割合を表す。

【図24】図24は、完全ゲノム配列に基づいたXMRVの系統発生的解析を示す。XMRV VP35およびVP42；MTCR；MuLV DG-75、MCF1233、Akv、モロニー、フレンドおよびローシャー；ネコ白血病ウイルス(FLV)；コアラレトロウイルス(KoRV)；ならびにテナガザル白血病ウイルス(GALV)の完全なゲノムを、ClustalX(材料および方法を参照)を用いて整列した。ギャップを排除し、多塩基置換のためのキムラ補正を使用し、この整列に基づいて、根のない(unrooted)近隣結合系統樹を作成した。Bootstrap値(N=1000試験)を示す。MuLVゲノムを、公開された実験的証拠(Raisch KP, et al., Virology 308: 83-91; O'Neill RR., et al., J Virol 53: 100-106; Perryman S., et al., Nucleic Acids Res 19: 6950; Shinnick TM., et al., Nature 293: 543-548; Sijts EJ., et al., Virus Res 34: 339-349; Khimani AH., et al., Virology 238: 64-67; Lenz J., et al., J Virol 42: 519-529)に基づいて、異種栄養性(X)、ポリトロピック(polytropic) (P)、またはエコトロピック(E)として標示した。20

【図25】図25は、受容体特異性を決定することが知られた(Battini JL., et al., J Virol 66: 1468-1475; Tailor CS., et al., Immunol 281: 29-106)SU糖タンパク質可変領域(VRAおよびVRB)に広がるXMRVおよび関連MuLV由来のタンパク質配列の多配列整列を示す。XMRV VP35(配列番号:10)およびVP42(配列番号:11)；MTCR(配列番号:14)；MuLV DG-75(配列番号:12)、NZB-9-1(配列番号:13)、MCF1233(配列番号:15)、Akv(配列番号:19)、モロニー(配列番号:18)、フレンド(配列番号:16)、ならびにローシャー(配列番号:17)由来のEnvタンパク質配列を、該デフォルト設定でClustalXを用いて整列した。配列を、公開された実験的証拠(Raisch KP., et al., Virology 308: 83-91; O'Neill RR., et al., J Virol 53: 100-106; Perryman S., et al., Nucleic Acids Res 19: 6950; Shinnick TM., et al., Nature 293: 543-548; Sijts EJ., et al., Virus Res 34: 339-349; Khimani AH., et al., Virology 238: 64-67; Lenz J., et al., J Virol 42: 519-529)に基づいて、異種栄養性(X)、ポリトロピック(P)、またはエコトロピック(E)として標示した。可変領域VRAおよびVRBを四角で示す。整列の右側のヌクレオチドの位置は、Env開始コドンに相対する。30

【図26】図26は、XMRVおよび関連MuLV由来5'gagリーダーヌクレオチド配列の多配列整列を示す。XMRV VP35(配列番号:20)およびVP42(配列番号:21)；MTCR(配列番号:22)、MuLV DG-75、(配列番号:24)、MCF1233、(配列番号:23)ならびにフレンド(配列番号:25)由来のgagのAUG開始コドンに対する選択的CUG開始コドンから伸長する配列を、該デフォルト設定を用いてClustalXと整列させた。VP35配列に対応する推定アミノ酸翻訳を配列の上に示す。；「*」は停止を示す。整列の右側のヌクレオチドの位置は選択的CUG開始コドンのCに相対する。40

【図27】図27A～27Bは、異なる患者の腫瘍試料由来のXMRV配列の比較を示す。図27Aは、9個の陽性腫瘍試料由来の380 nt XMRV gag RT-PCR断片、ならびにMTCR；ならびにMuLV DG-75、MCF1233、Akv、モロニー、ローシャーおよびフレンド由来の対応配列に基づく系50

統発生樹を示す。ClustalXを用いて配列を整列させ、隣接連結法（材料および方法を参照）を用いて対応する樹を作製した。腫瘍試料由来のXMRV断片を赤色で示す。図27Bは、9個のXMRV-陽性腫瘍試料由来の2500 nt pol PCR断片に基づく系統発生樹を示す。PCR断片は、鑄型として増幅cDNAを用いて得た。系統発生樹は図27Aに示すようにして構築した。

【図28A】図28A～28Bは、XMRV VP35の完全ヌクレオチド配列（配列番号：26）を示す。左の数値は、最初のヌクレオチドに対するヌクレオチド座標を示す。Gag（配列番号：27）；Gag-Pro-Pol（配列番号：28）およびEnv（配列番号：29）ポリタンパク質の推定オープンリーディングフレームを、対応するヌクレオチドの下に示す。5'gagリーダーにおける特徴的な24-nt欠失に三角を示す。他のゲノム特徴ならびにネステッドgag RT-PCRに使用されるプライマーは、矢印に示される。10

【図28B】図28A～28Bは、XMRV VP35の完全ヌクレオチド配列（配列番号：26）を示す。左の数値は、最初のヌクレオチドに対するヌクレオチド座標を示す。Gag（配列番号：27）；Gag-Pro-Pol（配列番号：28）およびEnv（配列番号：29）ポリタンパク質の推定オープンリーディングフレームを、対応するヌクレオチドの下に示す。5'gagリーダーにおける特徴的な24-nt欠失に三角を示す。他のゲノム特徴ならびにネステッドgag RT-PCRに使用されるプライマーは、矢印に示される。

【図29】図29A～29Bは、推定Gag-Pro-Pol（図29A）およびEnv（図29B）ポリタンパク質に基づくXMRVの系統発生的解析を示す。XMRV VP35およびVP42の推定Gag-Pro-PolおよびEnv配列ならびにMTCR；MuLV DG-75、MCF1233、Akv、モロニー、フレンドおよびローシャー；ネコ白血病ウイルス（FLV）；コアラ レトロウイルス（KoRV）；ならびにテナガザル白血病ウイルス（GALV）由来の対応する配列を、ClustalXを用いて整列させた。得られた整列を用いて、根のない近隣結合系統樹（実施例2、材料および方法を参照）を作成した。Bootstrap p値（N=1000試験）を示す。20

【図30】図30は、FISHによって決定された前立腺組織におけるXMRV核酸の存在を示す。前立腺癌症例VP62（パネルA～C）およびVP88（パネルD～F）由来の前立腺組織を、Spectrum GreenTM標識XMRV-35 DNAプローブで検出した後、H&E染色（左）によって可視化した（右の拡大図）。FISHパネルにおいて核をDAPIと対比染色した。H&E写真内の矢印はFISH陽性細胞を示す。パネルに示すバーは10 μmである。拡大図は、63×1.4N.A. 対物ズーム2で捕捉した図である。

【図31】図31は、FISHおよび同時FISH/免疫蛍光によるXMRV感染前立腺間質細胞の特徴付けを示す。組織マイクロアレイを用いて、前立腺癌症例VP62由来前立腺組織を、それぞれ、XMRV-35 プローブ（緑色）（パネルAおよびC）ならびに対応するH&E染色（パネルBおよびD）を用いたFISHによって解析した。矢頭はFISH陽性細胞を示す。拡大図（右側）は、図30の説明に記載したようにして得たFISH陽性細胞である（矢印）。パネルAおよびBのFISH陽性細胞は、間質線維芽細胞である；パネルCおよびDは、間質細胞における有糸分裂像であり、EおよびFは間質造血要素である。（パネルE）FISH（緑色）によるXMRVおよび免疫蛍光（赤色）によるサイトケラチンAE1/AE3の同時染色。パネルに示すバーは10 μmである。30

【図32】図32は、XMRV-35 プローブ（緑色）（パネルA）ならびに染色体1の2つの腕に特異的なコントロールプローブ（赤色および緑色）（パネルB）を用いた症例VP88の前立腺組織におけるFISHを示す（実施例3、材料および方法）。パネルに示すバーは10 μmである。拡大は、図31の説明に記載のようにして行なった。40

【図33】図33は、前立腺組織におけるGagタンパク質の存在を示す。SFFV Gag p30に対するモノクローナル抗体を用いたIHCを、症例VP62（パネルA～D）、VP88（パネルE～H）、およびVP51（パネルI、J）の前立腺組織において行なった。免疫蛍光（パネルA、B、E、Fおよび拡大図[右]）ならびに明視野（パネルC、D、G、Hおよび拡大図[右]）によって示されるGagタンパク質を示す二官能性クロモゲン(chromagen)の可視化が、顆粒細胞質染色（赤色）によって、ホモ接合RNアーゼL 462Q症例VP62およびVP88の間質細胞において検出されるが、ホモ接合RNアーゼL 462R 症例VP51では検出されない（パネルIおよびJ）。GおよびHの陽性細胞は間質リンパ球である。パネルA、BおよびIのバーは5 μmであり、パネルEおよびFでは10 μmであった。拡大は、図31の説明に記載のようにして行なった。50

【図34-1】図34A～34Dは以下のものを示す。図34Aは、LNCaP-R細胞におけるガンマレトロウイルスの存在を示すRT-PCRの結果を示す。700bp env-LTR領域のPCRアンプリコンを、エチジウムプロミドで染色した1%アガロースゲル上で分離する。使用した前立腺細胞株を上部に示す。比較のため、ヒトGAPDH mRNAの第8エキソンのRT-PCRを示す。図34Bは、完全ゲノム配列に基づくXMRV LNCaP-Rの系統発生的解析を示す。XMRV LNCaP-R；XMRV VP35およびVP42 (Urisman A., et al., PLOS Pathogens ; MTCA ; MuLV DG-75、MCF1233、Akv、モロニー、フレンドおよびローシャー；ネコ白血病ウイルス(FLV)；Koala レトロウイルス(KoRV)；ならびにテナガザル白血病ウイルス(GALV)の完全ゲノムを、デフォルト設定を用いてClustalXにより整列した。整列に基づいて根のない近隣結合系統樹を作成した(材料および方法を参照)。Bootstrap値(N=1000試験)を示す。MuLV ゲノムを異種栄養性(X)、ポリトロピック(P)、またはエコトロピック(E)として標示した。

【図34-2】図34Cは、XMRV-LNCaP RVおよび関連MuLV由来の5'gagリーダーヌクレオチド配列の多配列整列を示す。ClustalXのデフォルト設定を使用し(実施例3、材料および方法)、XMRV-LNCaP RV(配列番号:30)、XMRV-VP35(配列番号:20)およびVP42(配列番号:21)、MTCR(配列番号:22)、MuLV DG-75(配列番号:24)、MCF1233(配列番号:23)、ならびにフレンドMuLV(配列番号:25)由来gagのAUG開始コドンに対する選択的CUG開始コドンから伸長する配列を整列した。整列の右側のヌクレオチドの位置は、選択的CUG開始コドンの最初の位置に相対する。整列させたヌクレオチド配列の上部の「*」は、停止コドンを示す。図34Dは、XMRV-LNCaP RVに対してXMRV-VP35、MTCR、MCF1233およびMuLV DG-75を比較するゲノム配列類似性プロットを示す。整列はAVID (Bray N., et al., Genome Res 13 : 97-102) を用いて作製した。100ヌクレオチドのデフォルトウィンドウサイズでViSTA (Frazer KA., et al., Nucleic Acids Res 32: W273-279) を用いてプロットを可視化した。Y軸目盛は、50～100%のヌクレオチド同一性割合を表す。類似性プロットは、黒色バーで示されるXMRV LNCaP-Rの推定オープンリーディングフレームに対して示す。

【図35】図35A～35Cは以下のものを示す。図35Aは、8185 nt XMRV-LNCaP RVゲノムの概略マップである。LTR領域(R、U5、U3)に白四角を示す。Gag、Gag-Pro-PolおよびEnvポリタンパク質をコードする推定オープンリーディングフレームを緑色で示す。対応する開始コドンおよび停止コドン(AUG、UAG、UGA、UAA)ならびに選択的Gag開始コドン(CUG)のヌクレオチド位置を示す。同様に、スプライスされた3.2kb env サブゲノムRNA部位に対応するスプライスドナー(SD)およびアクセプター(SA)ヌクレオチド位置を示す。(図35B)に使用されたノザンプロットプローブをゲノム内の位置に対して黒色バーとして示す。図35Bは、ノザンプロット解析によるLNCaP-R細胞株内のウイルス転写物の存在を示す。細胞株LNCaP R、Raji、NIH3T3およびDU145から単離された全RNAを、1.2%ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分離し、プロットし、LTR領域内のヌクレオチド位置7780～7991に対応する放射性同位元素標識DNAを用いてプローブした(左)。完全長およびスプライスされたメッセージの位置を矢印で表す。プロットを取り出し(材料および方法)、完全長転写物のみを検出し得る放射性同位元素標識XMRV VP35 Gagプローブ(位置603～957)を用いて再プローブした(右)。左のサイズマーカーは、ヒト18SリボソームRNA(1.9kb)および28SリボソームRNA(5kb)の大きさを示す。図35Cは、LNCaP-R、LNCaP-FGC、DU145およびPC3細胞(示したとおり)における、XMRV VP35 Gag (NC)ペプチド(赤色)に対するアフィニティ精製されたポリクローナル抗体を用いた異なる細胞株におけるLNCaP-RVの存在についてのスクリーニングを示す。DAPIを用いて核を対比染色した。テキサスレッドフィルターを用いて免疫蛍光画像を得た。パネル内に示したバーは30 μmである。

【図36】図36A～36Cは以下のものを示す。図36Aは、LNCaP-R 細胞株におけるウイルス組込み部位を示す。ヒト細胞株LNCaP-R、LNCaP-FGC、DU145およびマウス細胞株NIH3T3から単離されたゲノムDNAをPstIで消化し、XMRV-VP35 U3 LTR領域(ヌクレオチド位置7780～7991)由来の放射性同位元素標識プローブを用いてプローブしたサザンプロット。0.8%アガロースゲル内で分離された分子量マーカーの位置を右側に示す。LNCaP-R細胞のDNA内の多数の組込み部位を、左側に矢印で示す。図36Bは、(図36A)のPstI消化ゲノムDNAのエチジウムプロミド染色が負荷されたゲノムDNAの相対量を示すことを示す。図36Cは、3つの

10

20

30

40

50

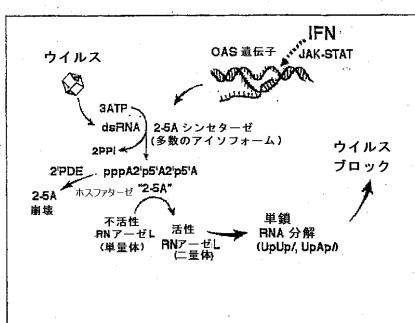
異なるXMRV LNCaP-R 組込み部位の配列(配列番号:31、32、33)を示す。該部位は、修飾リンカー媒介PCR技術(実施例3、材料および方法を参照)によって決定した。ウイルス配列を四角で囲む。各配列の上部に、対応する組込み部位の染色体位置を示す。

【図37】図37A～37Cは、XMRV LNCaP-Rが感染性ウイルスであることを示す。LNCaP-FGC細胞は、mock感染(-ウイルス)またはLNCaP-RV(+ウイルス)感染のいずれかであった(実施例3、材料および方法)。図37Aは、細胞上澄を用いた逆転写酵素アッセイを、感染後の示された時点で二重(-ウイルス)または四重(+ウイルス)に行なったことを示す。DEAE紙にスポットした逆転写酵素アッセイのオートラジオグラフを左側に示す。熒光体画像解析による逆転写酵素活性の定量を右側に示す。図37Bは、感染24時間後のmock(-)またはLNCaP-RV(+)感染細胞株のノザンプロット解析を示す。全RNAを抽出し、1.2%ホルムアルデヒドゲル上で分離し、プロットし、放射性同位元素標識XMRV VP35 LTRプローブ(位置7780～7991)を用いてプローブした。左のサイズマーカーは、ヒト18SリボソームRNA(1.9kb)および28SリボソームRNA(5kb)の大きさを示す。図37Cは、感染36時間後のmock(-)またはLNCaP-RV(+)感染細胞株のサザンプロット解析を示す。感染またはmock感染LNCaP-FGCおよびDU145細胞のゲノムDNAを抽出し(実施例3、材料および方法を参照)、PstIで消化し、0.8%アガロースゲル上で分離し、プロットし、放射性同位元素標識XMRV VP35 U3 LTRプローブ(位置7780～7991)でプローブした。数多くの新規な組込み事象を左に括弧で示す。陽性コントロールとしてNIH3T3ゲノムDNAを使用した。分子量マーカーを右側に示す。

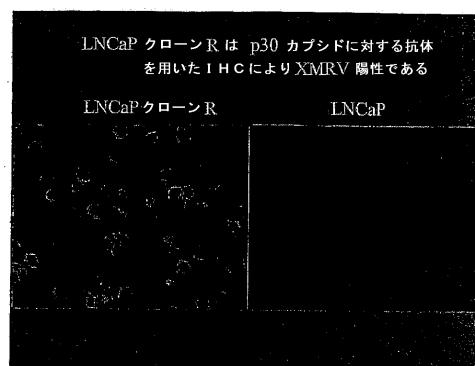
10

【図1】

Figure 1.



【図19】



【図2】

Figure 2.

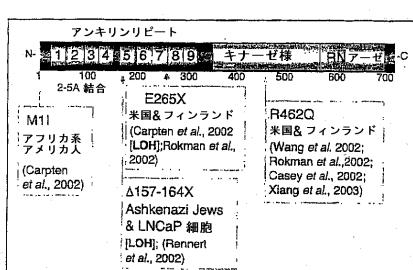
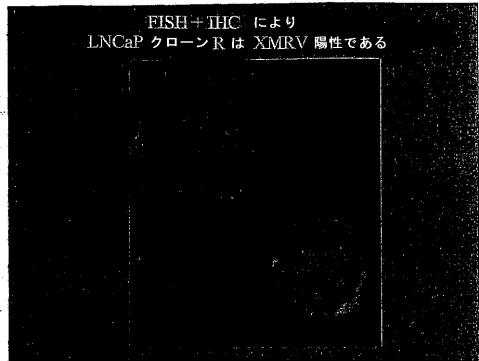


Figure 19

LNCaP、クローニング分析。右パネル：ヤギで調製した、ローシャーマウス白血病ウイルスp30タンパク質に特異的な抗血清(ATCC、カタログ番号VR-1564AS-Gt)を用いた免疫組織化学、HIV gagタンパク質の標識+核のDAPI(青)染色を示す。右パネル：核のDAPI染色。

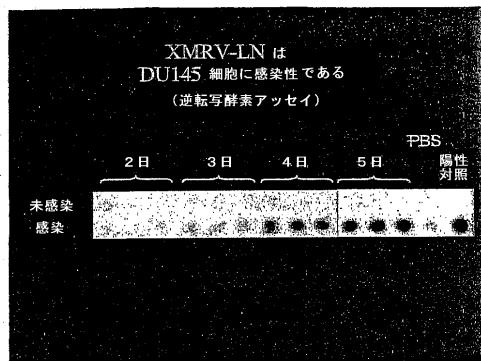
【図 20】



LNCaP感染細胞におけるHXVのIHCおよびFISHによる二重染色。
ヤギで調製した、ローシャーマウス白血病ウイルスp30タンパク質に特異的な抗血清(ATCC、カタログ番号 VR-1564AS-G)を用いた免疫組織化学、HXV gagタンパク質の標識+核のDAPI(青)染色
+ウイルス核酸のFISH標識(緑)を示す。

Figure 20

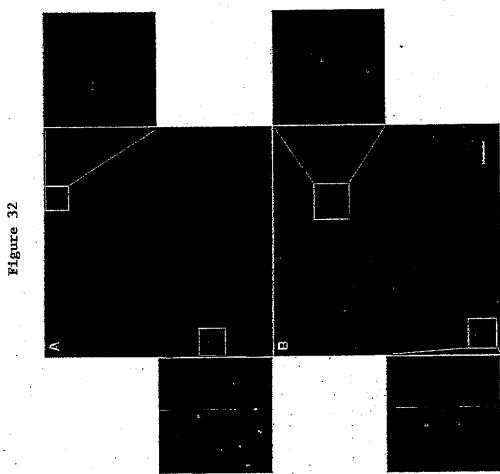
【図 21】



DU145ヒト前立腺癌細胞への感染に使用する場合、LNCaP細胞に產生されたウイルス(XMRV-LN)は感染性である。8ug/mlボリープレン、+FBSの存在下で3時間、DU145細胞を、500ulのLNCaP感染上清に感染させた。逆転写酵素アッセイでウイルスをモニターした。

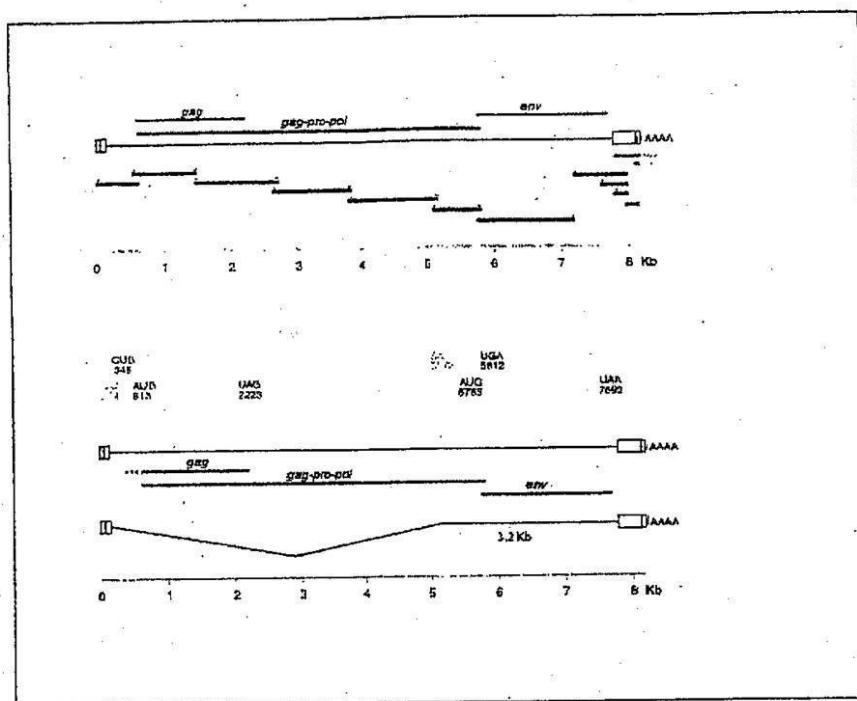
Figure 21

【図 3 2】



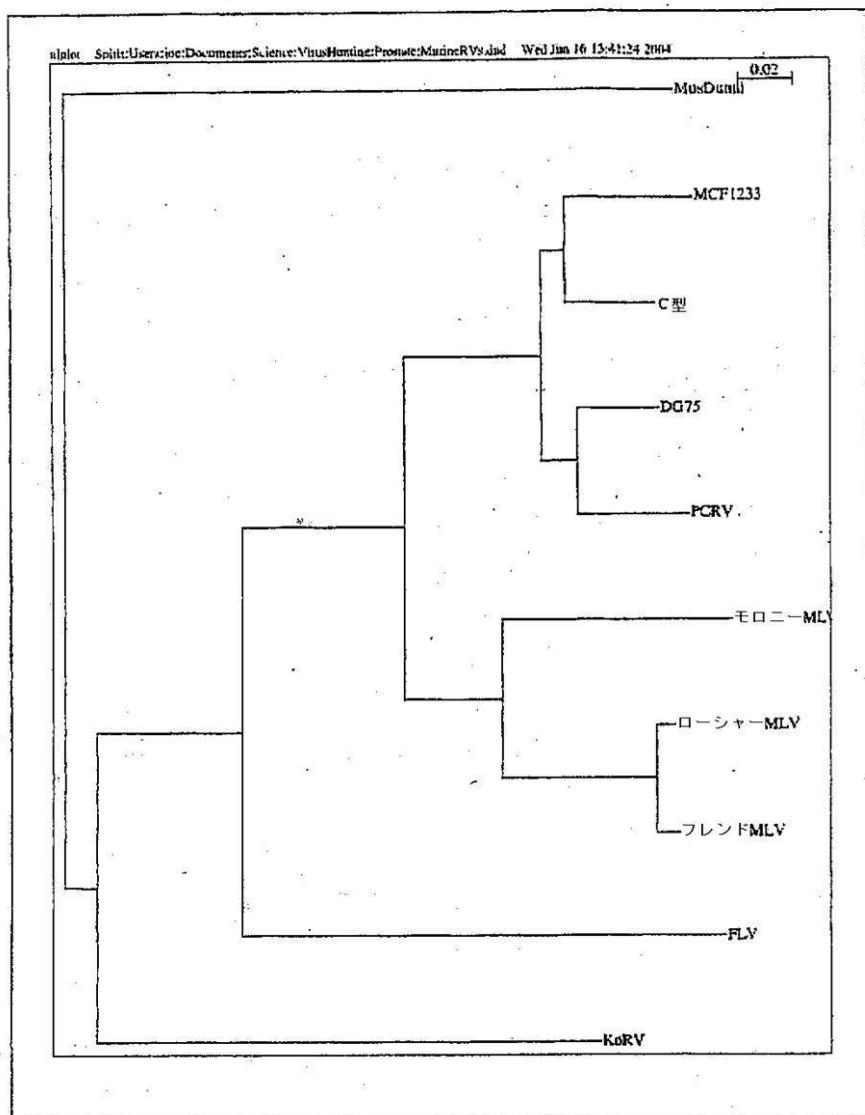
【図3】

Figure 3.



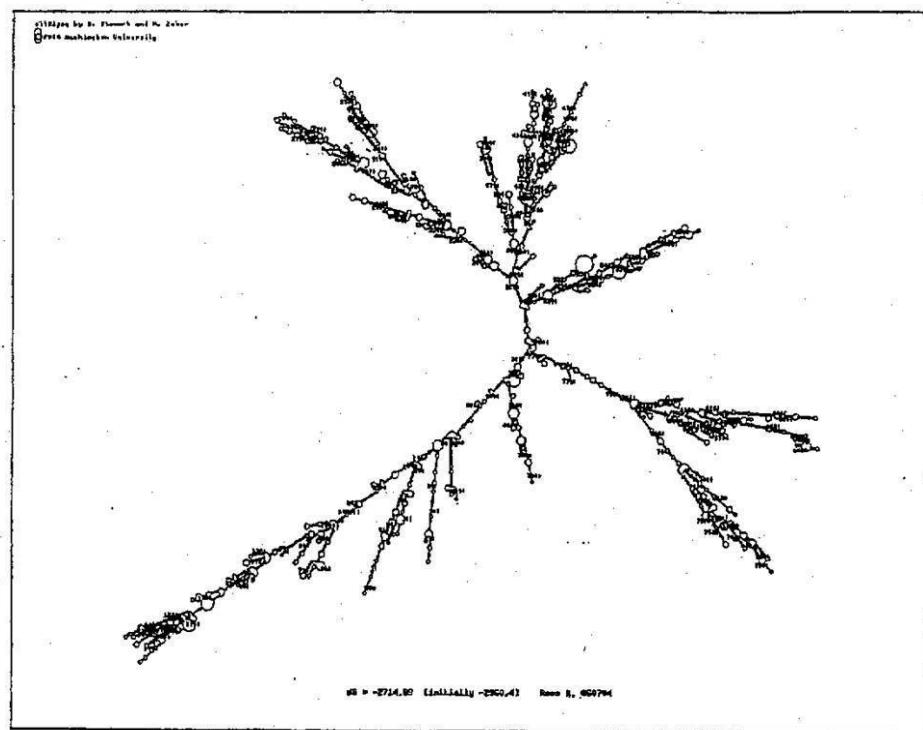
【図4】

Figure 4.



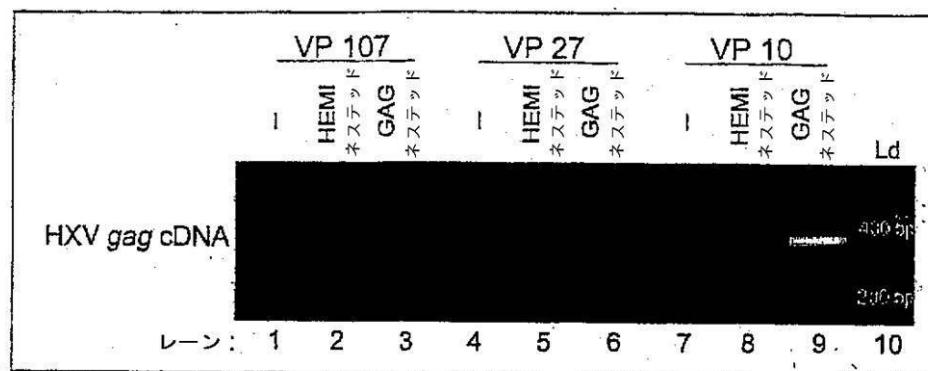
【図5】

Figure 5.



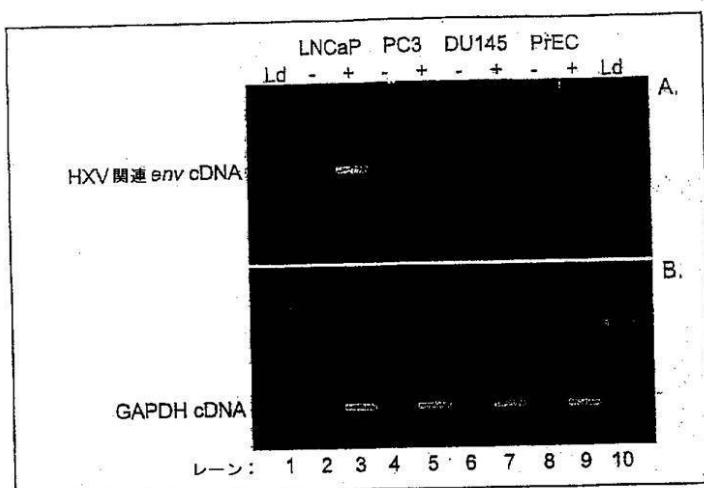
【図6】

Figure 6.



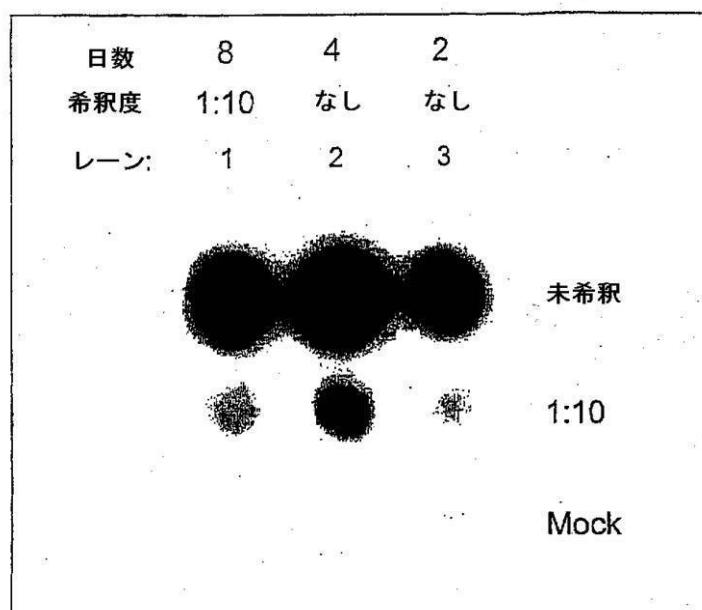
【図7】

Figure 7.



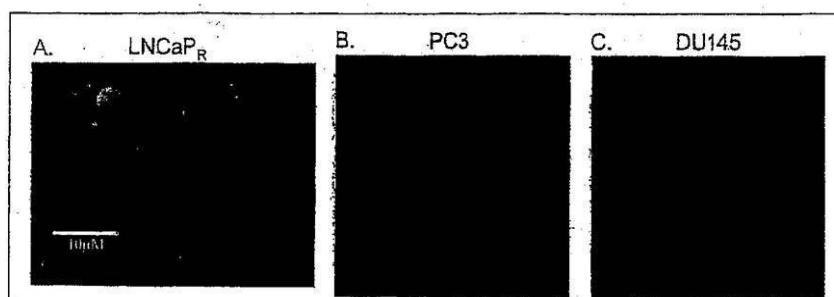
【図8】

Figure 8.



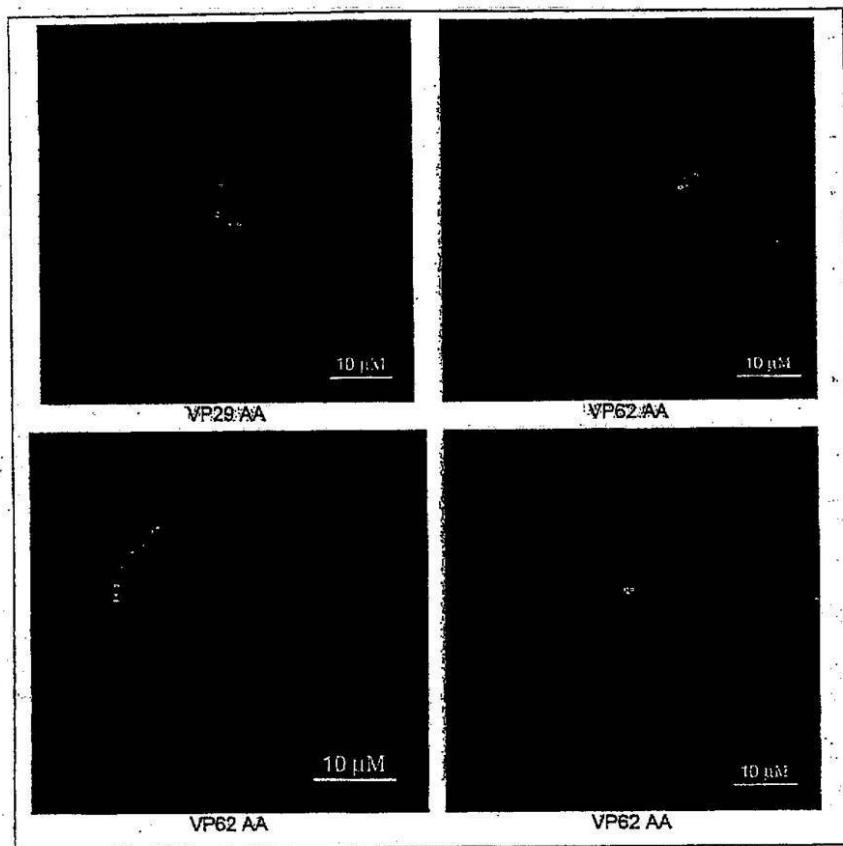
【図9】

Figure 9.



【図10】

Figure 10.



【図 11】

Figure 11.

HXB₃₅ Gag (配列番号:3)

M GQT VTTPLS LTLQHWGDVQ RIASNQSVDW ~~YKGRGRRHES~~
~~AEWPTFNVGW PQDGTFN LGV ISQVKSRVF PGP HGHPDQV~~
 PYIVTWEALA YDPPP WV KPF VSPK PPLPT APVL PPGPSA
 QPPSRSALYP ALTLSIKSKP PKPQVL PDSG GPLIDLLTED
 PPPYGVQPS SARENNEEA ATTSEVSPPS P VSRLRGRR
 DPPAADSTS QAFPLR GGD GQLQYWPFSS SDLYNWKN
 PSFSEDPGKL TALIESVLIT HQPTWDD QQ LLGTL LTGE
 KQRVLL ~~IA~~ YAVRGNDGRPA ~~Q~~ PNEVNAAF PLERPDWDYT
 TTEGRNH LVL YRQLLLAGLQ NAGRSP TNLA KVKG ITQGP
 ESPSAFLERL KEAYRRYTPY DPEDPGQETN VS SFIWQSA
 PDIGRKLERL EDLKSKTLGD LVREA KIFN KRETPEERE
 RIRREIEEKE ERRRAEDEQR ERERDRRRHR E SKLLATVV
 IGQRQDRQGG ERRRPQLDKD Q AY KEKGH WA ~~W~~ ~~W~~
 GPRGERPQTS LLTLD

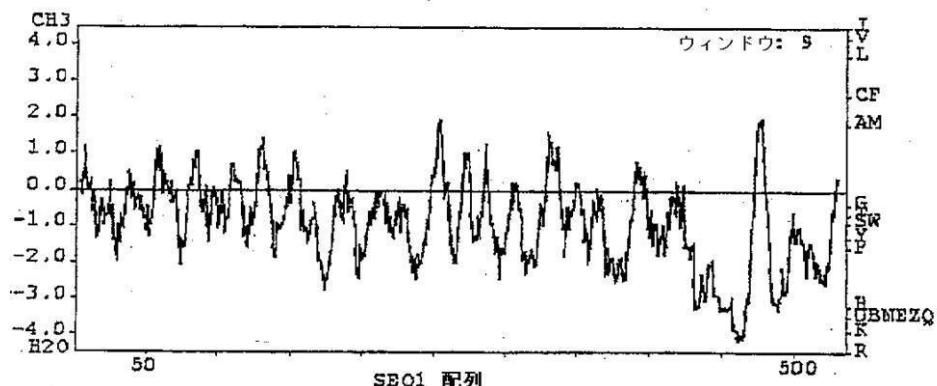
抗原性候補：

DVKKRRWVTFC SAE (配列番号:7)

EAGKAVRGNDGRPTQL (配列番号:8)

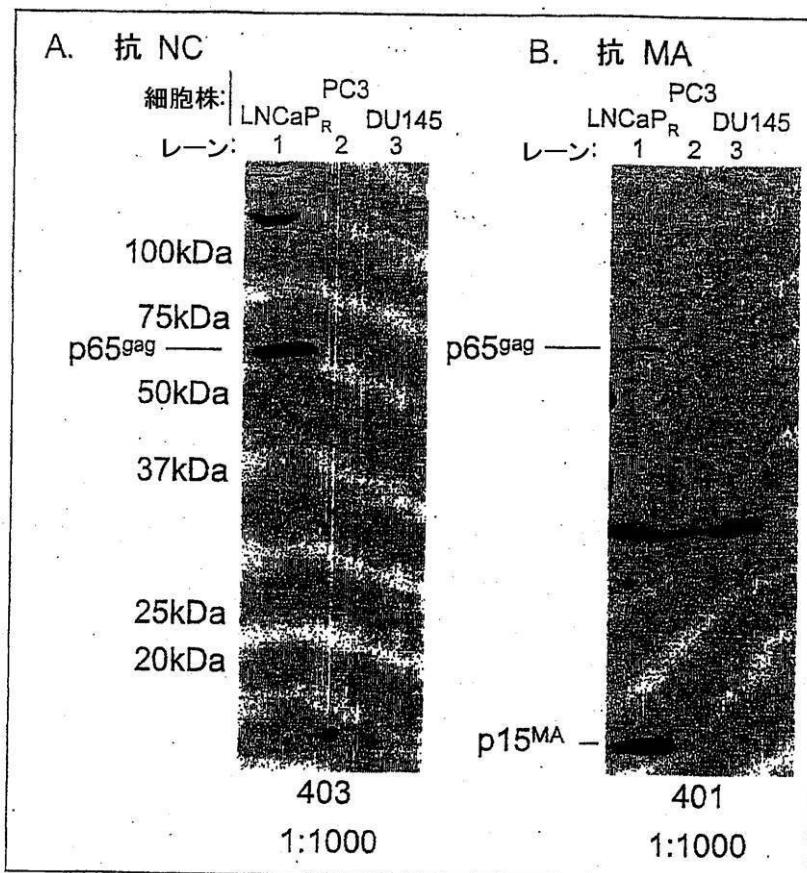
KDCPKKPRGPRGPR (配列番号:9)

疎水性親水性プロット



【図 12】

Figure 12.



【図13】

FIG. 13 HXV₃₅ のアミノ酸配列

(配列番号:2)

MGQTVTPLSLTLQHWGDVQRIASNQSVDFKKRWRVTFCSAEWPTFNVGW
 PQDGTFLGVISQVKSRVFCPGPHGPDQVYIVTWEALAYDPPPWFVSP
 KPPPLPTAPVLPNGPSAQPPRSALYPAUTLSIKSKPPKPQVLDSGGPLIDLLTE
 DPPPYGVQPSSARENNNEEEAATTSEVSPSPMVSRILRGRRDPPAADSTTSQAF
 PLRMGGDGQLQYWPFSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALESVLITHQPTW
 DDCQQLLGTLTGEEKQRVLLEAGKAVRGNDGRPTQLPNEVNAAFPLERPD
 WDYTTEGRNHLVLYRQLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGPNEPSAFLE
 RLKEAYRYTPYDPEDPGQETNVMSFIWQSAPDIGRKLERLEDLKSKTLDL
 VREAEEKIFNKRETPEEREERIRREIEEKEERRAEDEQRERDRRRHREMSKL
 LATVVGQRQDRQGGERRRPQLDKDQCAYCCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGP
 RPQTSLLTLGDGGQGEPPEPRITLKVGQPVTLVDTGAQHSVLTQNPGL
 SDKSAWVQGATGGKRYRWTDRKVHLATGKVTHSFLHVDPDCPYPLLGRDLL
 TKLKAQIHFEFGSGAQVVGPMQQLQVLTNIENKYRLHETSKEPDVPLGSTW
 LSDFPQAWEETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQ
 RLLDQGILVPCQSPWNTPLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPVPN
 YNLLSGLPPSHQWYTVLDKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT
 WTRLPQGFKNSPTELDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSEQDCQ
 RGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETV
 MGQPTPKTIPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPQDQ
 QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFEFLVDEKQGYAKVLTQKLGWRRPV
 AYLSKKLDPVAAAGWPPCLRMVAIAAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEAL
 VKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLTDTRVQFGPVVALNPATLLPKEAPEHD
 CLEILAETHGTRPDLTDQPIPDAADYTWTYTDGSSFLQEGQRAGAAVTTEVI
 WARALPAGTSQAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDYAFATAHVHGEIY
 RRRGLLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRQLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRM
 ADQAAAREAAMKA VLETSTLLIEDSTPYTPPHFHYTEDLKRRLRELGATYNQT
 KGYWVLQGKPVMPDQSVFELLDLSLHRLTHPSPQKMALLDREESPYYMLNR
 DRTIQYVTETCTACAQVNAASKAKIGAGVRVRGHRPGTHWEVDFTEVKPGY
 GYKYLLVFVDTFSGWVEAFPTKRETAKVVSKKLLEDIFPRFEMPQVLSGSDNG
 PAFASQVSQSVADLLGIDWKLHCAYKPQSSGQVERINKTIETLTKLTLASGT
 KDWVLLPLALYRARNTPGPHGLTPYEILYGAPPVLNFHNPEMSKLTNSPSL
 QAHLQALQAVQQEVWKPLAAAAYQDQLDQPVIPHFRVGDAVVVRRHQTKN
 LEPRWKGPYTVLLTPTALKVTDGISAWIHAAHVKAATPPAGTAWKVQRSQ
 NPLKIRLTRGLPMEPESPAFSKPLKDKINPWGPLIMGILVRAGASVQRDSPHQVF
 NVTWKITNLMTGQTANATSLLGTMDFPKLYFDLCDLVGDNWDDPEPDIG
 DGCRSPGGRKRTRLYDFYVCPEGHTVLTGCGGPREGYCGKWGCETTGQAYW
 KPSSSWDLISLKRGNTPKGQGCFDSSVGGSIQGATPGGRCNPLVLEFTDAG
 KRASWDAPKTWGLRLYRSTGADPVTLFSLTRQVNLGVPRVPIGPNPVITEQLP
 PSQPVQIMLPRPPRPPSGAASMVPGAPPSQSQPGTDRLLNLVEGAYQALNL
 TSPDKTQECWLCLVSGPPYYEGVAVLGTYSNHTSAPANCSVTSQHKLTLS
 SEV TGQGLCIGAVPKTHQALCNTTOKTSDGSYYLASPAGTIWACSTGLTPCLSTTV
 LNLTTDYCVLVELWPKVTVHSPNYVYGGQFGKTKYKREPVSLLALLGGL
 TMGGIAAGVGTGTTALVATKQFEQLQAAIHTDLAGALEKSVALEKSLTS
 SE VVLQNRRGLLLLFLKEGGCAALKKECCFYADHTGVVRDMSMAKLRERLNQR
 QKLFESGQGWFEGLFNRSPWFTT LISTIMGPLIVLILLFGPCILNRLVQFV
 KDRISVVQALVLTQQYHQLKSIDPPEEVESRE

【図14】

FIG. 14 HXV₃₅ GAG のアミノ酸配列 (配列番号: 3):

MGQTVTPLSLTLQHWGTVQRIASNQSVVKRRWVTCSAEWPTFNVGW
 PQDGTFLGVISQVSRVFCPGPHGHPDQPVYTVWEALAYDPPPWWVKPFVSP
 KPPPLPTAPVLPPGSAQPPRSRALYPALTLSIKSKPPKPQVLPDSGGPLIDLLE
 DPPPVGVPSSSARENNEEAATTSEVSPPSPMVSRGRDPAADSTTSQAF
 PLRMMGGDQLQYWPFSSSDLYNWKNNNPSFEDPGKLTALESVLITHQPTW
 DDCQQLLGTLTGEEKQRVLLEAGKAVRGNDGRPTQLPNEVNAAFPLERPD
 WDYTTTEGRNHLVLYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGPNEPSAFL
 RLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDGRKLERLEDLKSKTLDL
 VREAEKIFNKRETPEEREERIREEKEERRRAEDEQRERERDRRRHREMSKL
 LATVIGQRQDRQGGERRRPQLDKDQCAYCCKGHWA
 KDCPKKPRGPRGP
 RPQTSLLTLGD

【図15】

FIG. 15 HXV₃₅ PRO-POL のアミノ酸配列 (配列番号: 4):

GGQQQEPPPEPRITLKVGQPVTFLVDTGAQHSVLTQNPGLSDKSAWVQGA
 TGGKRYRWTTDRKVHLATGKVTHSFLHVPDCPYPLLGRDLTTLKAQIHFE
 SGAQVVGPMGQPLQVLTNIENKYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQA
 WAETGGMGLAVRQAPLIPPLKATSTPVSIKQYPPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPC
 QSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLSREVNKVEDIHPVPNPNL
 SGLLPPSHQWYTVDLKD
 AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNS
 PTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSEQDCQRGTRALLQTLG
 NLGYRASAKKAQICQKQV
 KVYLGYLLKEGQRWLTERAKETVMGQPTPKTPRQ
 LREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGT
 LFN
 WGP
 DQQKAYQEIKQAL
 LTAPALGLPDLTKP
 FELVDEKQGYAKG
 VLTQK
 LGP
 WRRPVA
 YLSKKLD
 PVA
 AGWPPCLRMVAAIA
 VLT
 KDA
 GKL
 TMG
 QPL
 V
 L
 A
 P
 H
 A
 V
 E
 A
 L
 V
 K
 Q
 P
 P
 D
 R
 W
 L
 S
 N
 ARMTHYQAM
 LLD
 TDR
 VQFG
 P
 V
 A
 L
 N
 P
 A
 T
 L
 L
 P
 E
 K
 E
 A
 P
 H
 D
 C
 L
 I
 A
 E
 T
 H
 G
 T
 R
 P
 D
 L
 D
 Q
 P
 P
 D
 A
 D
 Y
 T
 W
 Y
 T
 D
 G
 S
 S
 L
 Q
 E
 G
 Q
 R
 R
 A
 G
 A
 V
 T
 T
 E
 V
 I
 W
 A
 R
 A
 L
 P
 A
 G
 T
 S
 A
 Q
 R
 E
 L
 I
 A
 L
 T
 Q
 A
 L
 K
 M
 A
 E
 G
 K
 K
 L
 N
 V
 Y
 T
 D
 S
 R
 Y
 A
 F
 A
 T
 A
 H
 V
 G
 E
 I
 Y
 R
 R
 G
 L
 L
 T
 S
 E
 G
 R
 E
 I
 K
 N
 K
 N
 E
 I
 L
 A
 L
 L
 K
 A
 L
 F
 L
 P
 K
 R
 L
 S
 I
 I
 H
 C
 P
 G
 H
 Q
 K
 G
 N
 S
 A
 E
 A
 R
 G
 N
 R
 M
 A
 D
 Q
 A
 A
 R
 E
 A
 M
 K
 A
 V
 L
 E
 T
 S
 T
 L
 I
 E
 D
 S
 T
 P
 Y
 T
 P
 P
 H
 Y
 T
 E
 T
 D
 L
 K
 R
 L
 R
 E
 L
 G
 A
 T
 Y
 N
 Q
 T
 K
 G
 Y
 W
 V
 L
 Q
 G
 K
 P
 V
 M
 P
 D
 Q
 S
 V
 F
 E
 L
 L
 D
 S
 L
 H
 R
 L
 T
 H
 P
 S
 P
 Q
 K
 M
 A
 L
 L
 D
 R
 E
 S
 P
 Y
 Y
 M
 L
 N
 R
 D
 R
 T
 I
 Q
 Y
 V
 T
 E
 T
 C
 T
 A
 C
 A
 Q
 V
 N
 A
 S
 K
 A
 K
 I
 G
 A
 G
 V
 R
 V
 R
 G
 H
 R
 P
 G
 T
 H
 W
 E
 V
 D
 F
 T
 E
 V
 K
 P
 G
 L
 Y
 G
 Y
 K
 Y
 L
 L
 V
 F
 D
 T
 F
 S
 G
 W
 V
 E
 A
 F
 P
 T
 K
 R
 E
 T
 A
 K
 V
 V
 S
 K
 K
 L
 L
 E
 D
 I
 F
 P
 R
 F
 E
 M
 P
 Q
 V
 L
 G
 S
 D
 N
 G
 P
 A
 F
 A
 S
 Q
 V
 S
 Q
 V
 A
 D
 L
 L
 G
 I
 D
 W
 K
 L
 H
 C
 A
 Y
 K
 P
 Q
 S
 S
 G
 Q
 V
 E
 R
 I
 N
 K
 T
 I
 K
 E
 T
 L
 K
 L
 T
 L
 A
 S
 G
 T
 K
 D
 W
 V
 L
 L
 P
 A
 L
 Y
 R
 A
 R
 N
 T
 P
 G
 H
 G
 L
 T
 P
 Y
 E
 I
 L
 Y
 G
 A
 P
 P
 V
 L
 N
 F
 H
 N
 P
 E
 M
 S
 K
 L
 T
 N
 S
 P
 S
 L
 Q
 A
 H
 L
 Q
 A
 L
 Q
 A
 V
 Q
 Q
 E
 V
 W
 K
 P
 L
 A
 A
 Y
 Q
 D
 Q
 P
 V
 I
 P
 H
 P
 F
 R
 V
 G
 D
 A
 V
 W
 V
 R
 R
 H
 Q
 T
 K
 N
 L
 E
 P
 R
 W
 K
 G
 P
 Y
 T
 V
 L
 L
 T
 P
 A
 L
 K
 V
 D
 G
 I
 S
 A
 W
 I
 H
 A
 H
 V
 K
 A
 A
 T
 P
 P
 A
 G
 T
 A
 W
 K
 V
 Q
 R
 S
 Q
 N
 P
 L
 K
 I
 R
 L
 T
 R
 G
 A
 P

【図16】

FIG. 16 HXV₃₅ ENV のアミノ酸配列 (配列番号: 5):

MESPAFSKPLKDKINPWGPLIIMGLVRAGASVQRDSPHQVFNVWTK
 ITNLMT
 GQTANATSLGGMTDTFPKLYFDLCDLVGDNWDDPEPDIGDGCRSPG
 RKRT
 RLYDFYVCPGHTVLTGCGGPREGYCGKWC
 GCETTGQAYWK
 PSSSWDLISLKR
 GNTPKGQGCFDSSVGS
 GSIQGATPGGRCNPLV
 LEFTDAGKRASWDAPKT
 WG
 LRLYRSTGADP
 VTL
 FSL
 TRQ
 VLN
 V
 G
 P
 R
 V
 I
 G
 P
 N
 P
 V
 I
 T
 E
 Q
 L
 P
 S
 Q
 P
 V
 Q
 I
 M
 L
 P
 P
 R
 P
 P
 P
 P
 S
 G
 A
 A
 S
 M
 V
 P
 G
 A
 P
 P
 S
 Q
 Q
 P
 G
 T
 G
 D
 R
 L
 L
 N
 L
 V
 E
 G
 A
 Y
 Q
 A
 L
 N
 L
 T
 S
 P
 D
 K
 T
 Q
 E
 C
 W
 L
 C
 L
 V
 S
 G
 P
 P
 Y
 Y
 E
 G
 V
 A
 V
 L
 G
 T
 Y
 S
 N
 H
 T
 S
 A
 P
 A
 N
 C
 V
 T
 S
 Q
 H
 K
 L
 T
 S
 E
 V
 T
 G
 Q
 G
 L
 C
 I
 G
 A
 V
 P
 K
 T
 HQALCNTTQKT
 SDG
 YY
 LAS
 P
 A
 G
 T
 I
 W
 A
 C
 S
 T
 G
 L
 T
 P
 C
 L
 S
 T
 V
 L
 N
 L
 T
 T
 D
 Y
 C
 V
 L
 V
 E
 L
 W
 P
 K
 V
 T
 Y
 H
 S
 P
 N
 Y
 V
 Y
 G
 Q
 F
 G
 K
 K
 T
 Y
 K
 R
 E
 P
 V
 S
 L
 T
 A
 L
 L
 G
 G
 L
 T
 M
 G
 G
 I
 A
 A
 G
 V
 G
 T
 G
 T
 T
 A
 L
 V
 A
 T
 K
 Q
 F
 E
 Q
 L
 Q
 A
 I
 H
 D
 L
 G
 A
 L
 E
 K
 S
 V
 A
 L
 E
 K
 S
 L
 T
 S
 L
 E
 V
 V
 L
 Q
 N
 R
 R
 G
 D
 L
 L
 F
 L
 E
 G
 G
 L
 C
 A
 A
 L
 K
 K
 E
 C
 C
 Y
 A
 D
 H
 T
 G
 V
 V
 R
 D
 S
 M
 A
 K
 L
 R
 E
 R
 L
 N
 Q
 R
 Q
 K
 L
 F
 E
 S
 G
 Q
 G
 W
 F
 E
 G
 L
 F
 N
 R
 S
 P
 W
 F
 T
 T
 L
 I
 S
 T
 I
 M
 G
 P
 I
 V
 L
 L
 L
 L
 F
 G
 P
 C
 I
 L
 N
 R
 L
 V
 Q
 F
 V
 K
 D
 R
 I
 S
 V
 V
 Q
 A
 L
 V
 L
 T
 Q
 Q
 Y
 H
 Q
 L
 K
 S
 I
 D
 P
 E
 E
 V
 E
 S
 R
 E

【図 17】

FIG. 17 LNCaP RNA RTPCR 産物からの配列 (7084-7750bp) (配列番号 : 6)

```

aaaagagagcccggtgtcattaactctggccctgtctgtggaggacttactatggcgcatagctccaggaggaa
cagggactacagccctagtggccaccaaacaatcgagcagcgcaggcatacatacagacatfgggccttagaa
aaaatcagtcaagtgccttagaaaaagtctctgacctcggtgtcaggtggctacagaaccggaggggattagatctactgt
tcctaaaagaaggaggattatgtctgcctaaagaagaatgtgtttacgcggaccactgcccgttagaagagatag
catggcaaagctaagagaaaaggtaaccagagacaaaaattgtcgaatcaggacaagggtggtagggactttaa
caggteccccatggticacgaccctgatccaccattatggccctgtatagacttttattaaatcctactttcggaccct
gtattctcaaccgcgttgtccagttgtaaagacacagaattcggtagtgaggccctggctgaccacgactatcacc
aactcaaatacataatccagaatgtggatcacgtgataaaaagattttattcagttccagaagagggggatgaa
agaccccccataaggc

```

【図 18 A】



VP62患者由来の前立腺の解析。左パネル: Rocheからのマウス抗サイトケラチン AE1/AE3 (20:1混合の AE1対AE3) モノクローナル Ab カクテルを用いた免疫組織化学 (IHC) (赤)。抗ケラチン AE1 Ab は、酸性サブファミリーの 56.5, 50, 50', 48 および 40 kDa ケラチンを認識する。抗ケラチン AE3 Ab は、塩基性サブファミリーの全ての6つのメンバーを認識する。IHC (赤)は、前立腺の上皮細胞を標識する。緑の標識は、図9の説明に記載されたような HXB35envプローブについてのFISHである。青は、核の DAPI 染色である。右パネル。ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

Figure 18A

【図 18 B】

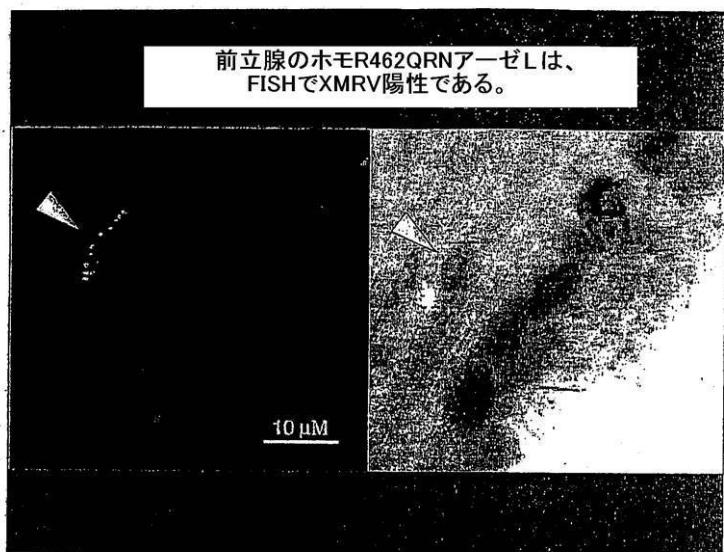


Figure 18B

【図 18 C】



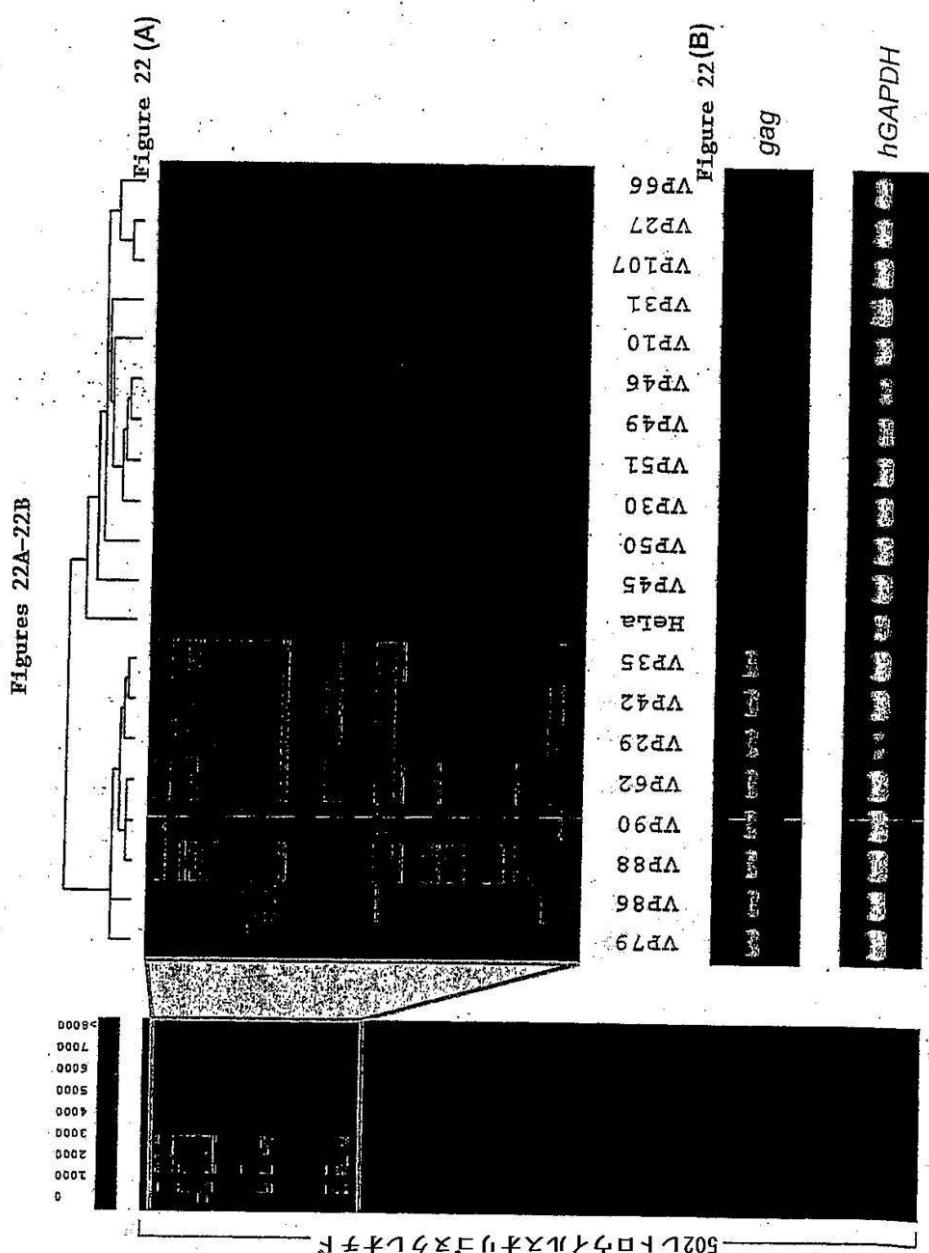
Figure 18C

【図 18D】



Figure 18D

【図22】



【図 23】

Figures 23A-23C

Figure 23 A

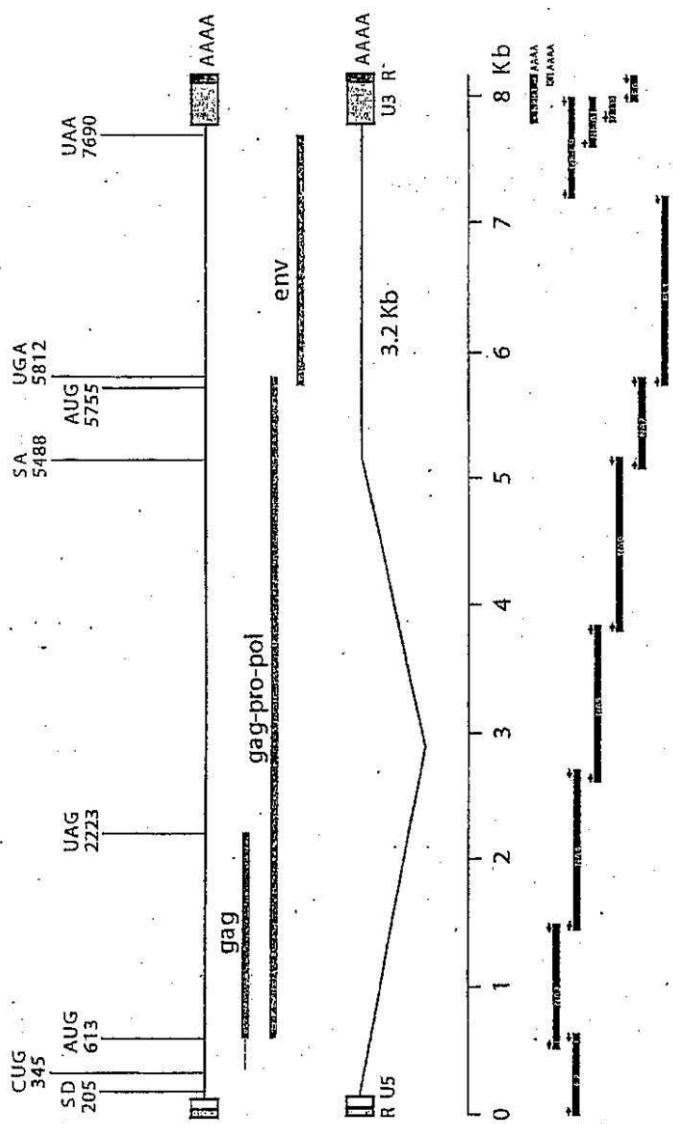


Figure 23 B

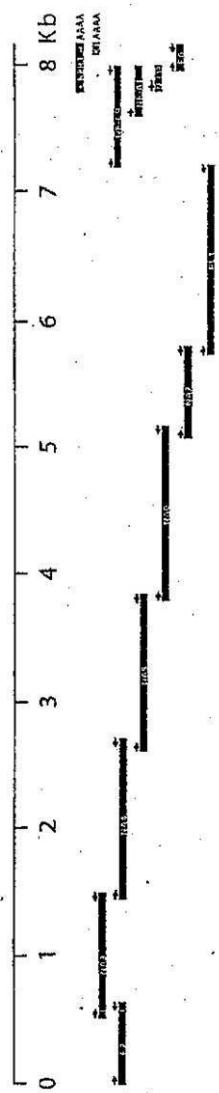
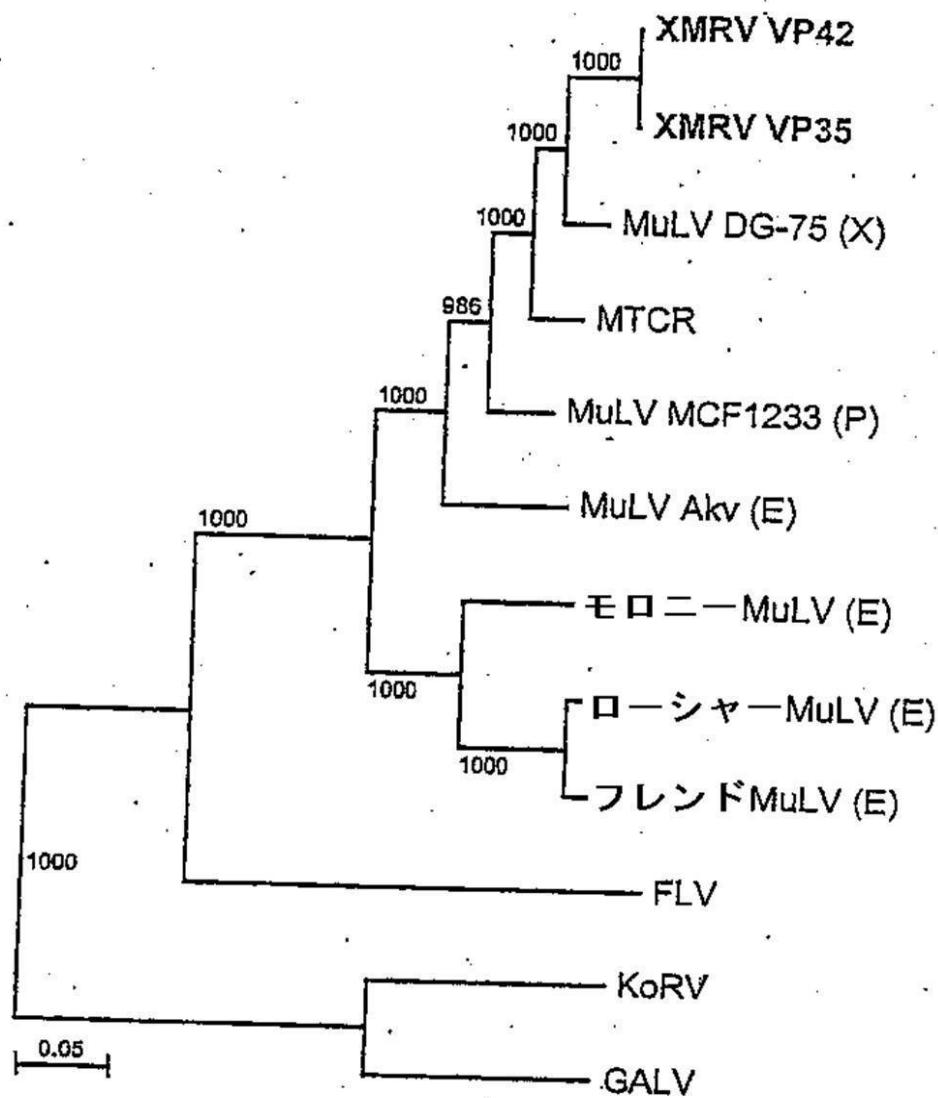


Figure 23 C



【図 24】

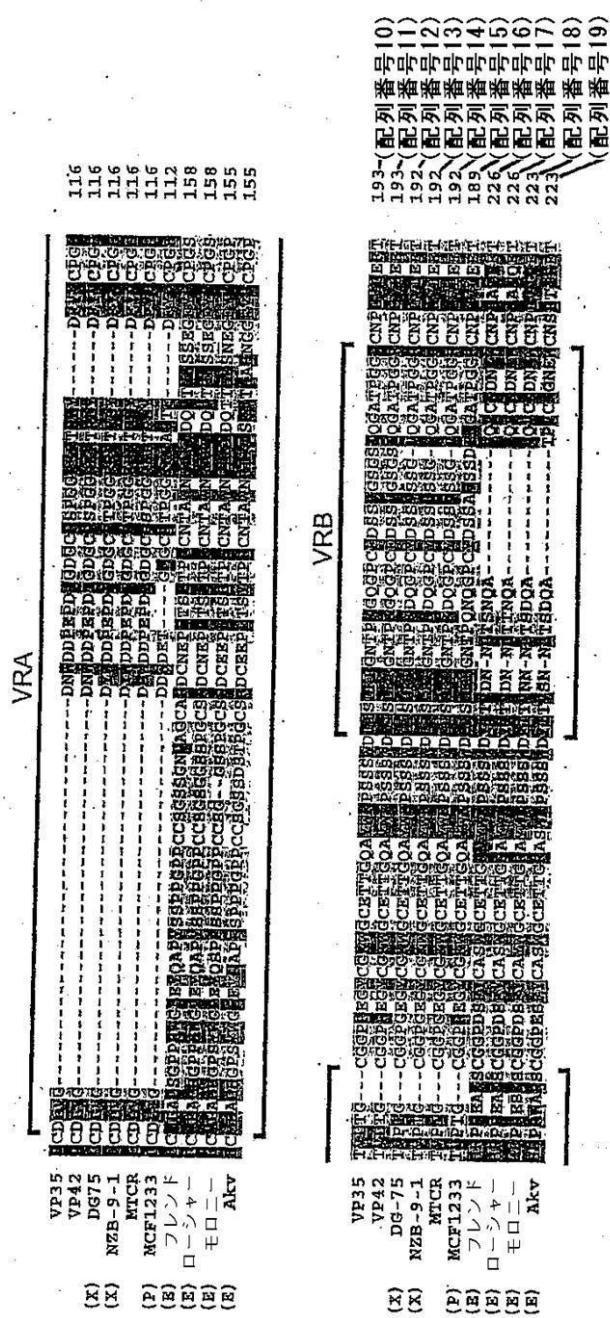
Figure 24



完全ゲノム

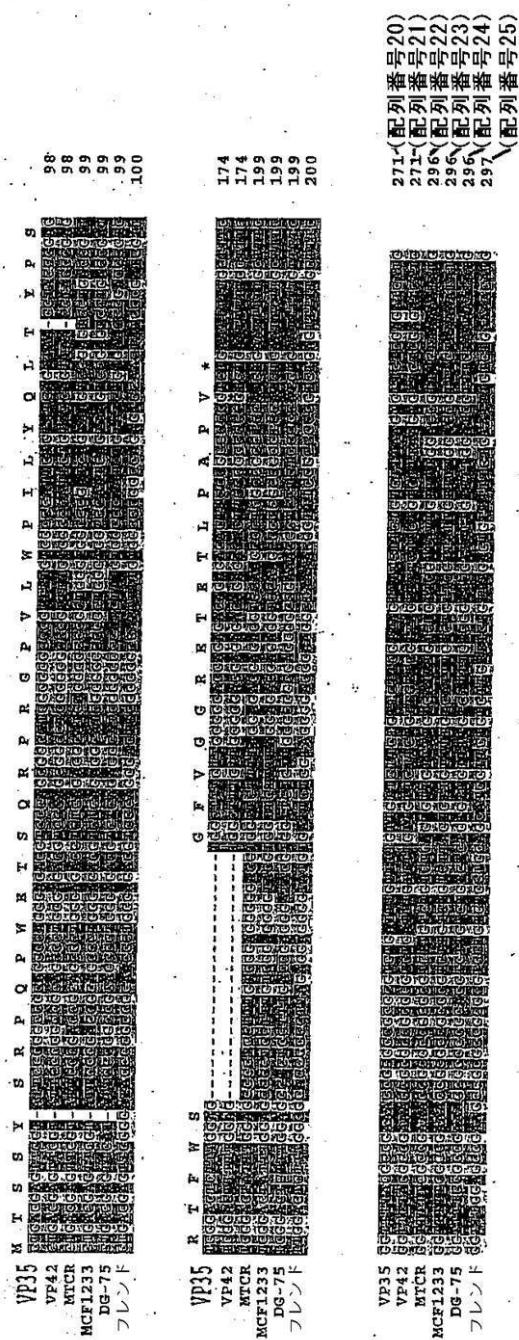
【 図 25 】

Figure 25



【図 26】

Figure 26



【図27】

Figure 27 A **Figure 27 B**

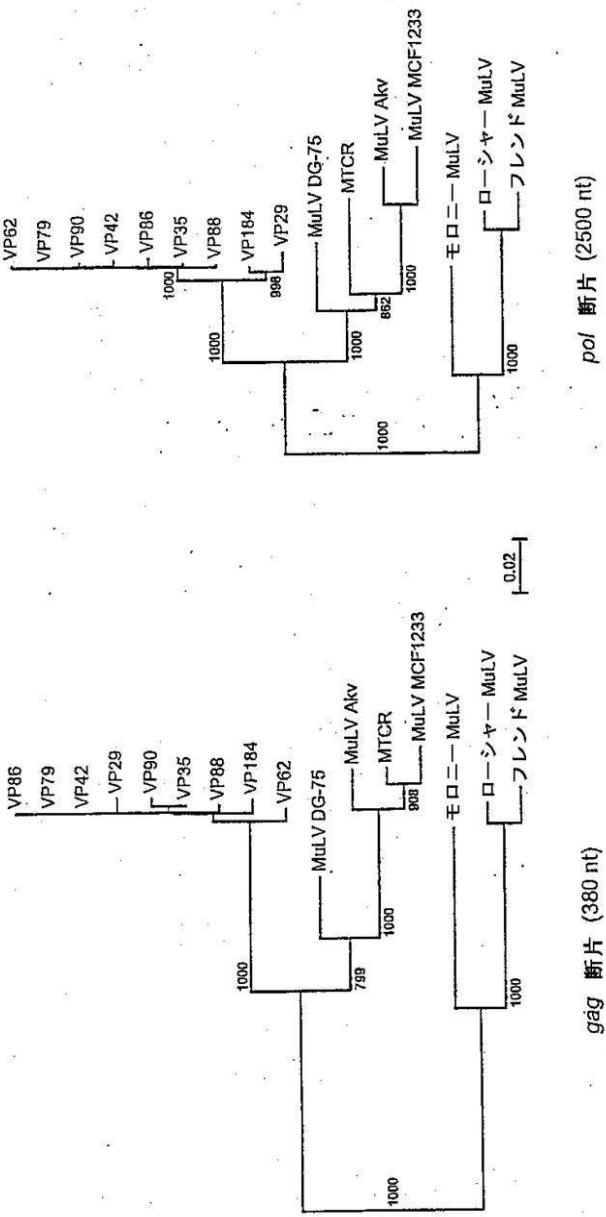


Figure 27A-27B

【 図 2 8 A 】

Figure 28A

【 义 2 8 B 】

Figure 28B

【 図 29 】

Figures 29A-29B

Figure 29A

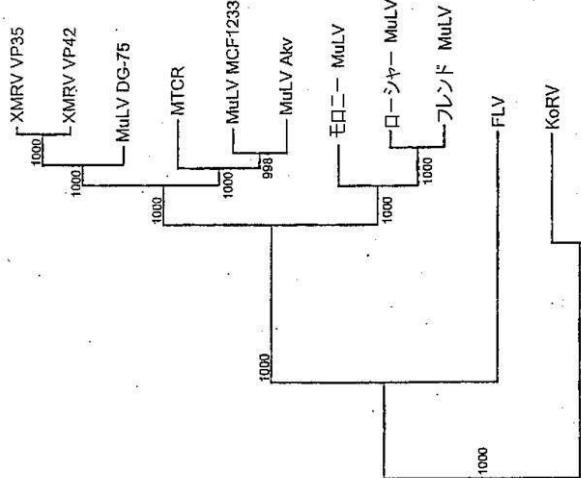
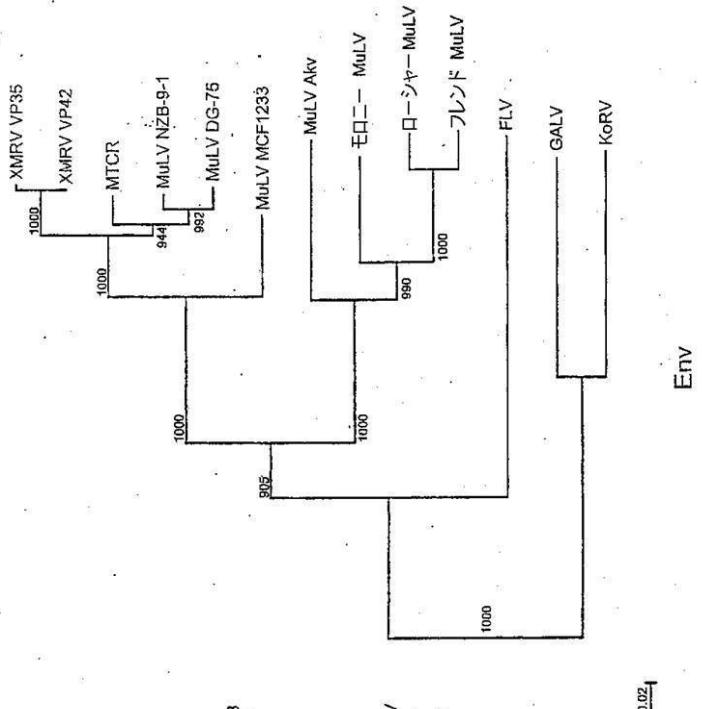
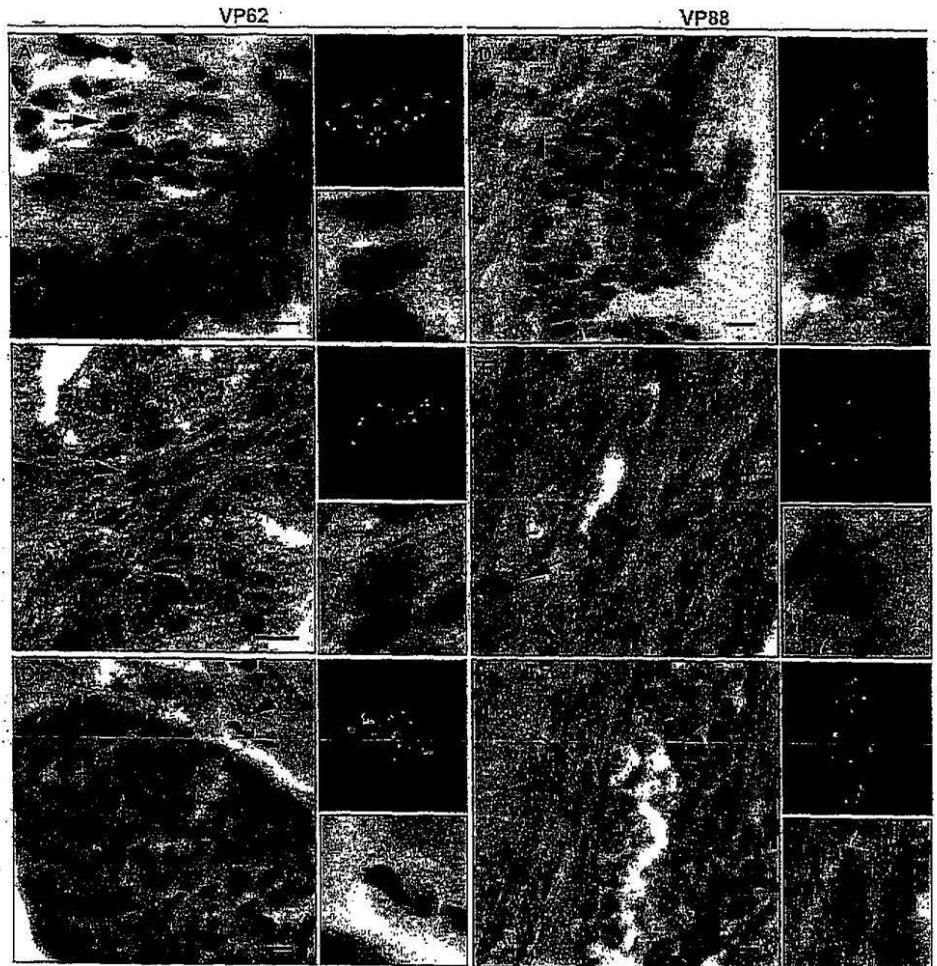


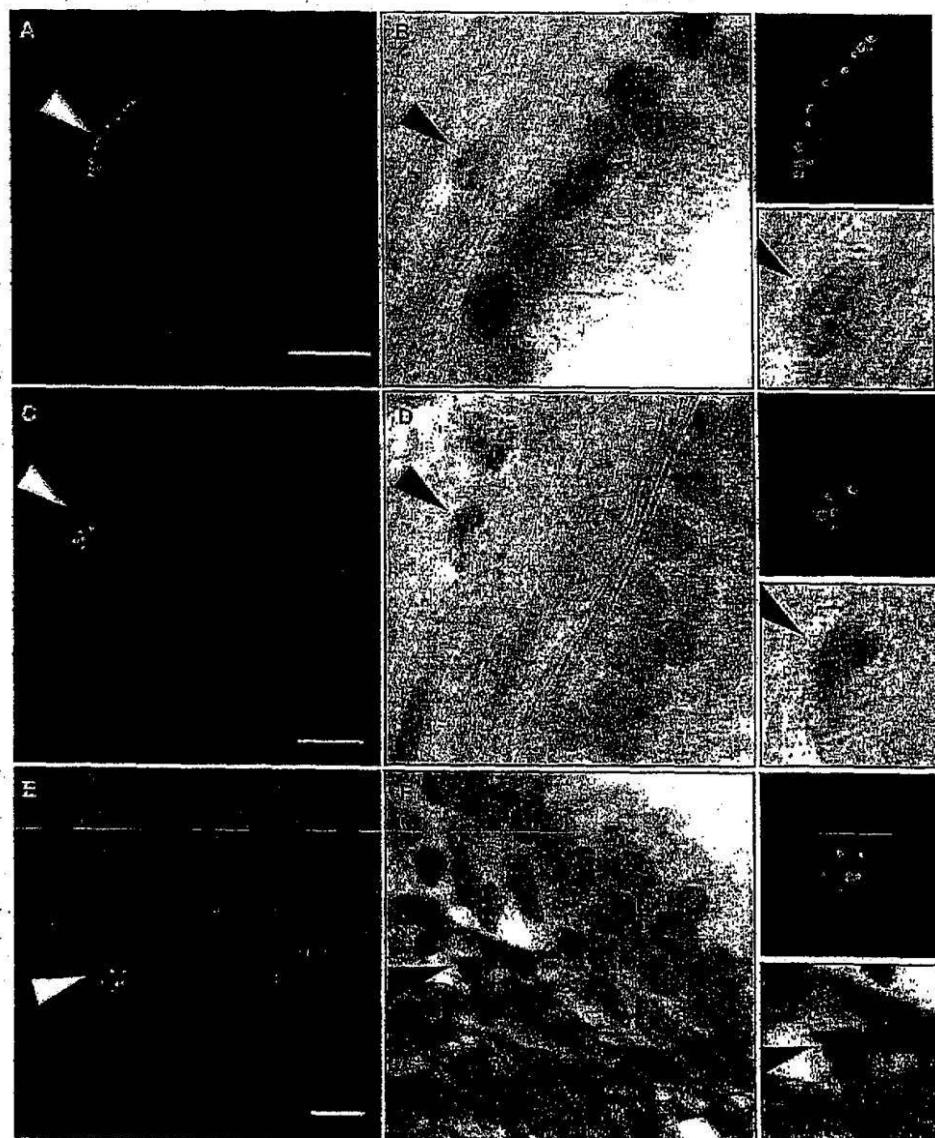
Figure 29B



【図30】

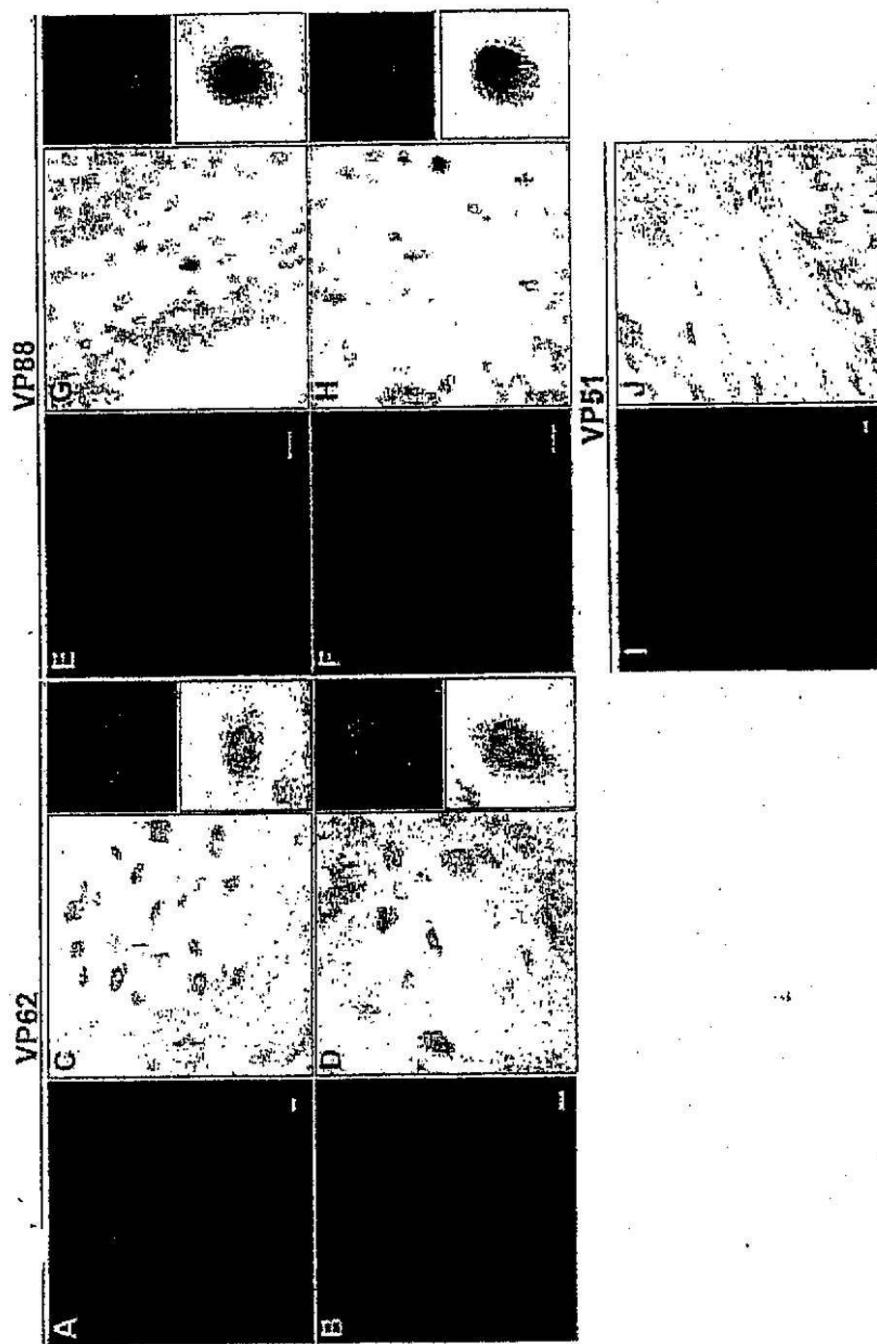


【図31】



【図 33】

Figure 33



【図3-4-1】

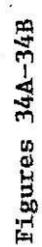
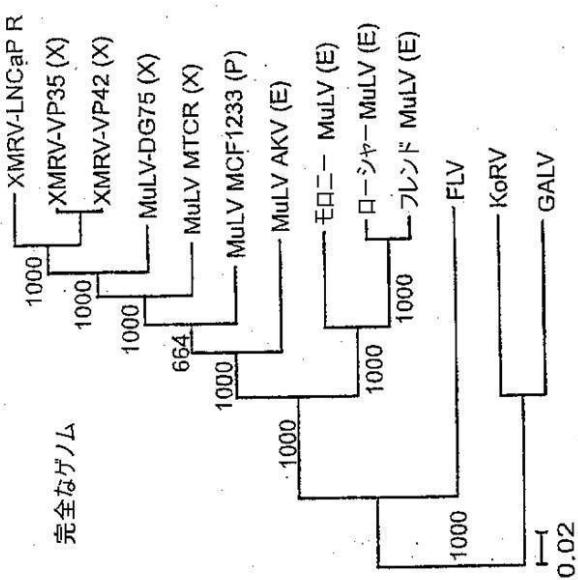
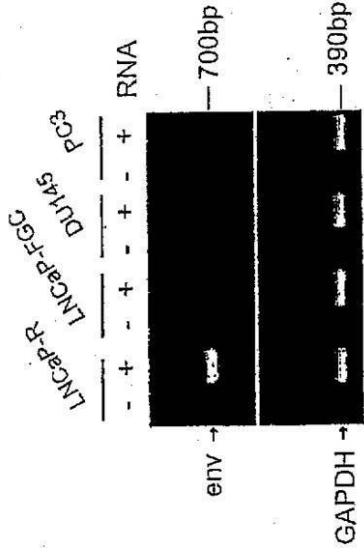


Figure 34B



【図3-4-2】

Figures 34C-34D

Figure 34C



N	E (%)
1	80
2	60
3	50
4	45
5	40
6	35
7	30
8	28
9	25
10	22
11	20
12	18
13	16
14	14
15	12
16	10
17	9
18	8
19	7
20	6
21	5
22	4
23	3
24	2
25	1

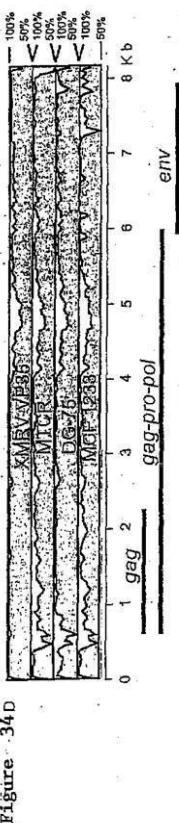


Figure .34

【図 35】

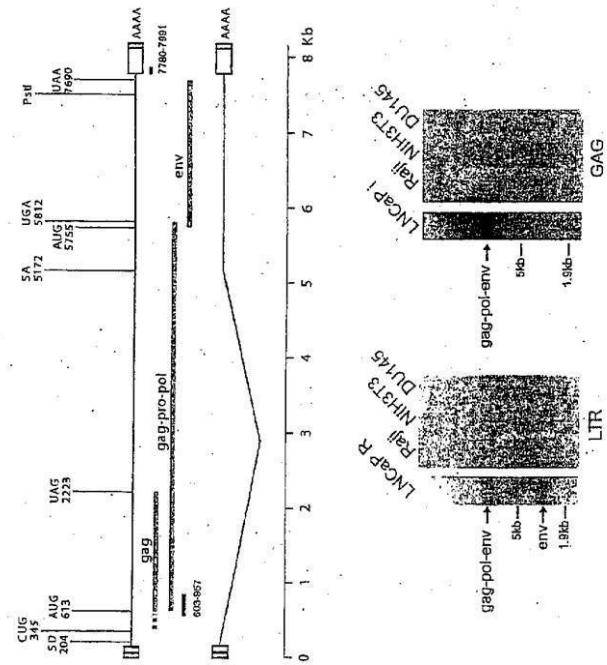


Figure 35B

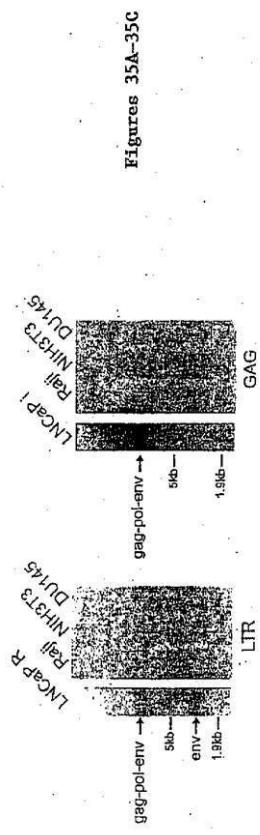
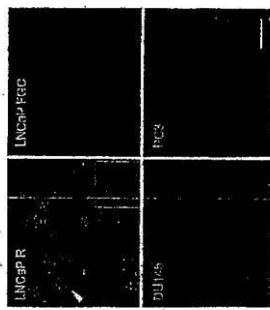
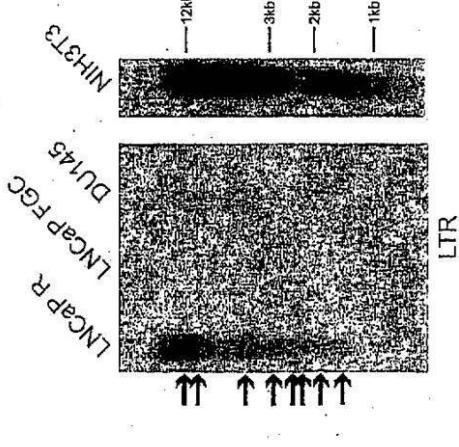


Figure 35C



【図 36】

Figures 36A-36C



部位 1 ヴィル入性 染色体 10q11.22
FRMPD [GGGGCTTTCA~~G~~TCTTATGCTCTAGAGGT (配列番号 :31)]

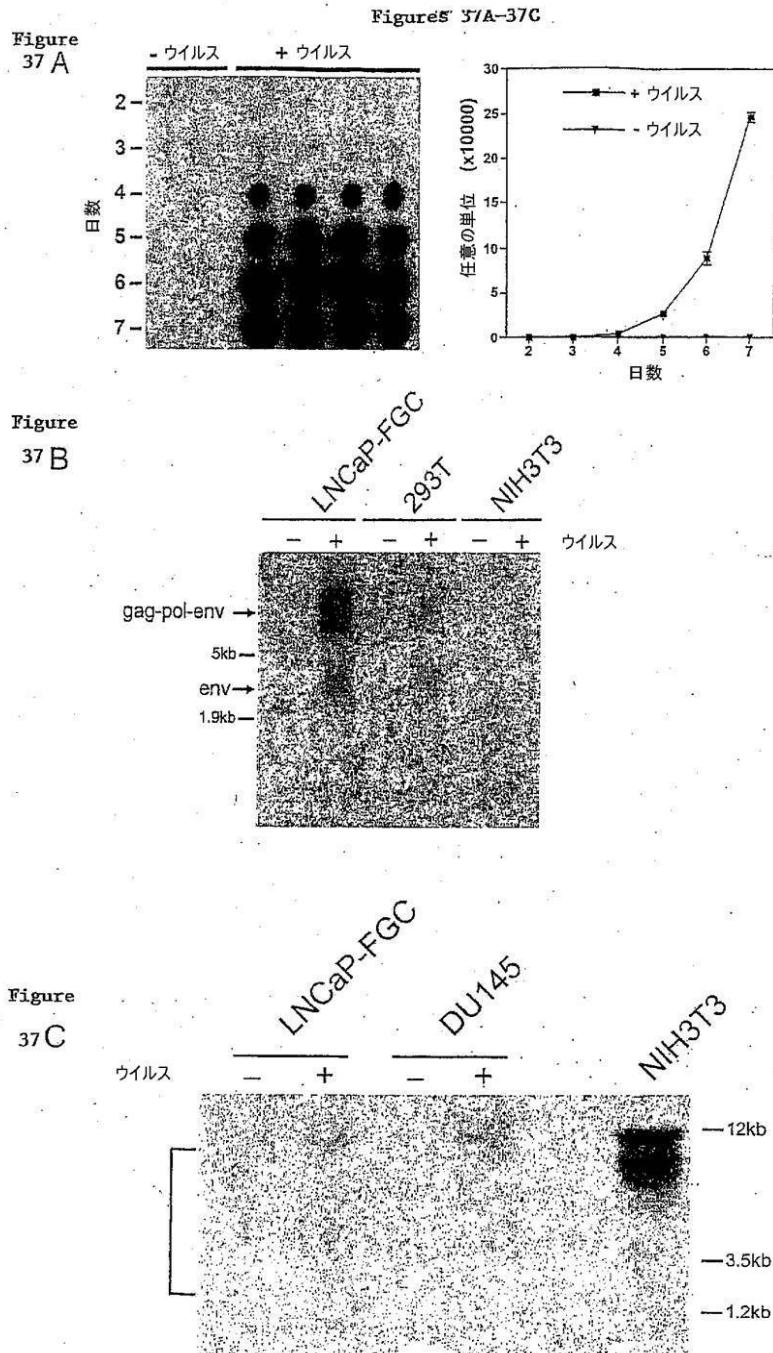
部位 2 ヴィル入性 染色体 7q22
MLLS [ggggctttc~~A~~AGAGGGAAATCGCCCGT (配列番号 :32)]

部位 3 ヴィル入性 染色体 7p15
GFNMB [ggggctttc~~A~~GTGTATATTCAACTGAAG (配列番号 :33)]

Figure 36B



【図 3 7】



【配列表】

2008538494000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV.	C12N7/00	C12N15/11	C07K14/15	C12N15/63
	C12Q1/68	G01N33/569	G01N33/50	A61K39/21
				C12N5/10
				C12N7/02

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)
C12N C07K A61K C12Q G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>URISMAN ANATOLY ET AL: "Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant" PLOS PATHOGENS, vol. 2, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 211-225 URL, XP002402639 ISSN: 1553-7366(print) 1553-7374(ele the whole document</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-35

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 document 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

11 October 2006

Date of mailing of the International search report

08/11/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5810 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brenz Verca, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013167

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHO BRIAN C ET AL: "Frequent disruption of the Nf1 gene by a novel murine AIDS virus-related provirus in BXH-2 murine myeloid lymphomas" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 11, 1995, pages 7138-7146, XP002402640 ISSN: 0022-538X figure 3	10
X	DATABASE UniProt [Online] 1 November 1999 (1999-11-01), ANTOINE M., WEGMANN B., KIEFER P.: "Envelope protein." XP002402648 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9WLJ4 Database accession no. Q9WLJ4 abstract	12
A	RAISCH KEVIN P ET AL: "Molecular cloning, complete sequence, and biological characterization of a xenotropic murine leukemia virus constitutively released from the human B-lymphoblastoid cell line DG-75." VIROLOGY, vol. 308, no. 1, 30 March 2003 (2003-03-30), pages 83-91, XP002402641 ISSN: 0042-6822 the whole document	
A	WANG DAVID ET AL: "Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays." PLOS BIOLOGY, vol. 1, no. 2 Cited November 21, 2003, November 2003 (2003-11), pages 257-260 URL, XP002402642 cited in the application the whole document	
A	WO 2004/037972 A2 (CHIRON CORP [US]; HARDY STEPHEN F [US]; GARCIA PABLO [US]; WILLIAMS LE) 6 May 2004 (2004-05-06) the whole document	
P,A	WU TIYUN ET AL: "Rmcf2, a xenotropic provirus in the Asian mouse species <i>Mus castaneus</i> , blocks infection by polytropic mouse gammaretroviruses" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 15, August 2005 (2005-08), pages 9677-9684, XP002402643 ISSN: 0022-538X the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013167

Box 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.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /013167

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 23–25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 26–30 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/013167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004037972	A2 06-05-2004	AU 2002368276 A1	13-05-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 0 7 K 14/15 (2006.01)	C 0 7 K 14/15	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF, BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY ,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許序注：以下のものは登録商標)

1. JAVA

2. Linux

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72) 発明者 シルバーマン, ロバート

アメリカ合衆国 オハイオ 44121 ピーチウッド, レッチワース ロード 24607

(72) 発明者 クライン, エリック, エイ.

アメリカ合衆国 オハイオ 44122 シェーカー ハイツ, バイロン ロード 22731

(72) 発明者 デリシ, ジョセフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107 サンフランシスコ, アーカンソー ストリート
350

(72) 発明者 ガネム, ドン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131 サンフランシスコ, ゴールドマイン ドライブ
413

(72) 発明者 キャシー, グラハム

アメリカ合衆国 オハイオ 44022 モアランド ヒルズ, スカイライン ドライブ 55

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA14 BA11 BA51 CA04 CA09 CA11 DA02 EA04

HA12 HA15

4B063 QA01 QA17 QA19 QQ08 QQ10 QQ26 QQ52 QQ58 QR32 QR55

QR62 QS25 QS33 QS34

4B065 AA97 AC20 BA02 CA29 CA44 CA46

4C084 AA17 NA14 ZB092 ZB262 ZB332

4C085 AA03 BA65 CC08

4H045 AA10 AA11 AA30 CA01 DA76 DA86 DA89 EA26 EA31 EA51

EA53 FA74