

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6148666号
(P6148666)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A

請求項の数 10 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-505106 (P2014-505106)	(73) 特許権者	513257524
(86) (22) 出願日	平成24年4月13日(2012.4.13)		ノークレール セシリア
(65) 公表番号	特表2014-513524 (P2014-513524A)		スウェーデン王国 ブロンマ エス-16
(43) 公表日	平成26年6月5日(2014.6.5)		7 66, トヴェールハンドスグレン
(86) 国際出願番号	PCT/SE2012/050407		3
(87) 国際公開番号	W02012/141653	(74) 代理人	110000659
(87) 国際公開日	平成24年10月18日(2012.10.18)		特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
審査請求日	平成27年4月9日(2015.4.9)	(72) 発明者	ノークレール セシリア
(31) 優先権主張番号	61/475, 926		スウェーデン王国 ブロンマ エス-16
(32) 優先日	平成23年4月15日(2011.4.15)		7 66, トヴェールハンドスグレン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		3
		審査官	大久保 智之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトメガロウイルス (CMV) の遺伝子変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ヒトサイトメガロウイルス (CMV) Mer l i n 株 Genbank 参照配列 A Y 4 4 6 8 9 4 . 2 (野生型 CMV) の遺伝子変異体であって、

前記遺伝子変異体は、サイトメガロウイルス Mer l i n ゲノムの前初期 (I E) 遺伝子の位置 1 7 3 9 0 4 から位置 1 7 4 0 1 9 のイントロン 2 スクレオチド (配列番号 1 7) を欠き、且つ配列番号 1 の配列を含む、遺伝子変異体。

【請求項 2】

哺乳動物におけるサイトメガロウイルス (CMV) 関連癌形態を診断するため、哺乳動物において癌を発生する素因を検出するため、又は輸血若しくは移植による癌の危険の伝達を除去するために哺乳動物組織、細胞及び体液をスクリーニングするためのデータを得る方法であって、該方法は、

a) 前記哺乳動物、哺乳動物組織、哺乳動物細胞、又は哺乳動物体液からの生体試料の専門分析を行う工程；及びその後、

b) 前記生体試料において、請求項 1 記載のヒトサイトメガロウイルスの遺伝子変異体 (CMV Mer l i n I E Δ i 2) の存在又は不在を検出する工程と、を含む方法。

【請求項 3】

前記哺乳動物または哺乳動物組織または細胞移植からの前記生体試料が、血液試料、組織試料、幹細胞試料、臓器移植移植片試料、精液試料、尿試料、唾液試料、細胞スワブまたは母乳試料から成る群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

10

20

【請求項4】

請求項1記載のヒトサイトメガロウイルスの遺伝子変異体 (CMV Merlin IEΔi2) の存在又は不在は、Taqman PCR若しくはシーケンスキャプチャーPCRアッセイ等のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等のDNA配列若しくはcDNA配列の検出法、又はFISH (蛍光in situハイブリダイゼーション) 技術等のISH (in situハイブリダイゼーション) を含む方法により決定される、請求項2又は3記載の方法。

【請求項5】

前記PCRは、少なくとも請求項1記載のIE遺伝子の対立遺伝子のエクソン2及びエクソン3の部分を増幅することにより、又はGenbank参照配列AY446894.2のCMV Merlinゲノムの前初期 (IE) 領域のエクソン2及びエクソン3の部分を増幅することにより、あるいは少なくとも請求項2記載のヒトサイトメガロウイルスの遺伝子変異体 (CMV Merlin IEΔi2) のエクソン2及びエクソン3の部分を増幅することにより行われる、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記癌が、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、結腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、皮膚癌、および肉腫、腎臓癌、膵臓癌ならびにそれらの転移から成る群より選択される、請求項2～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

配列番号1又はそのPCRプライマー若しくはそのISHプローブを含む核酸を用いることにより、請求項1記載のヒトサイトメガロウイルス (CMV Merlin IEΔi2) の遺伝子変異体を検出する、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

in vitro法である、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

哺乳動物におけるサイトメガロウイルス (CMV) 関連癌形態を診断するため、哺乳動物において癌を発生する素因を検出するため、又は輸血若しくは移植による癌の危険の伝達を除去するために哺乳動物組織、細胞及び体液をスクリーニングするための、請求項1記載のヒトサイトメガロウイルス (CMV Merlin IEΔi2) の遺伝子変異体若しくはそれに由来するPCRプライマー若しくはISHプローブの使用であって、

癌等が、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、結腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、皮膚癌、肉腫、腎臓癌、及び膵臓癌から成る群より選択される、使用。

【請求項10】

哺乳動物、哺乳動物組織又は細胞移植から得られた生体試料において、請求項1記載のヒトサイトメガロウイルスの遺伝子変異体 (CMV Merlin IEΔi2) を検出するための、TaqManポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、シーケンスキャプチャーPCRアッセイ、又はISH若しくはFISH検出を行うための試薬を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば癌疾患に罹患している患者に存在することが証明されている、サイトメガロウイルス (CMV: Cytomegalovirus) の新規遺伝子変異体の分野に関する。したがって、本発明は、癌についての、およびより具体的にはサイトメガロウイルス (CMV) の感染の存在を含む癌形態についての、診断方法の分野に関する。本発明は、特に、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、結腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、肉腫、腎臓癌、皮膚癌および膵臓癌の診断に関するが、他の癌形態にも応用できる。

【背景技術】

【0002】

サイトメガロウイルス (CMV) は、世界人口の大部分を感染させる一般的なウイルスであり、成人人口の60～100%は、この感染の経験があり、このウイルスの保有者で

10

20

30

40

50

ある。CMVは、一次感染後、潜伏性および持続性を確立し、殆どの感染は無症候性である。健常保有者の場合、このウイルスは、他に優先してミエロイド系列細胞において潜在ウイルスとして見つけられ、再活性化は、成熟マクロファージまたは樹状細胞への細胞の分化に依存し、これは、多くの場合、感染によって引き起こされる。1970年代まで、先天性感染症の重症症例のみが、このウイルスのヒト疾患に相当すると考えられていた。世の中の免疫抑制個体、例えばAIDS患者および移植患者、の漸増に伴って、CMVの再活性化は、これらの患者の間で高い罹病率および死亡率の原因となる大きな臨床問題となった。したがって、CMV疾患はこの群の患者に共通であり、命にかかわることもあるので、過去何十年にもわたってCMVの重要性および関心が増してきている。このウイルスは炎症によって再活性化され、炎症性疾患の患者の組織検体におけるこのウイルスの高頻度の存在を示唆する証拠は増えている。最近、様々な起源の癌に活性CMV感染が頻繁に存在することを含意する証拠も増えている。本発明者らは、癌におけるCMVの新規遺伝子変異体を定義し、新たな癌発生機序を立証する。

10

【0003】

CMV感染および癌

最近の報告は、一定の悪性腫瘍、例えば結腸癌、悪性神経膠腫（非特許文献1-7）、髄芽腫（非特許文献8）、EBV陰性ホジキンリンパ腫、子宮頸癌、前立腺癌および乳癌（総説については（非特許文献9、10）を参照されたし）、におけるCMVのゲノムおよびタンパク質の高頻度の存在を示している。本発明者らは、悪性膠芽腫腫瘍の99%、髄芽腫（MB: medulloblastoma）および神経芽腫（NB: neuroblastoma）、悪性黒色腫、結腸、乳、膵臓、前立腺、皮膚、卵巣および子宮癌の>90%において活性CMV感染の存在を確認した（非特許文献1、8）。重要なこととして、このウイルス感染は、同じ患者から得た非癌組織検体において、および健常対照個体において、潜伏性のままである（非特許文献1、3）。

20

【0004】

CMVおよび腫瘍調節（oncomodulation）：

既に1970年代に、Fed Rappのグループは、前立腺癌におけるCMVの高頻度の存在を報告し、動物モデルにおいて発癌性であった腫瘍からのウイルス株を単離した（非特許文献11、12）。幾つかのその後の研究において、CMVは正常ヒト癌を形質転換することができず、そのためこのウイルスは発癌性と思われなかった。その代わり、宿主細胞機能に対して特異的な効果を持つ非常に多数のウイルスタンパク質によって媒介される腫瘍形成に対するCMVの間接的影響を記述するために腫瘍調節という用語が提案されている（（非特許文献13、14）に総説されている）。進化の過程で、CMVは、多くの異なる細胞および免疫機能に影響を及ぼす洗練された機序を発達させてきた（非特許文献15、16）。このウイルスは、感染細胞において約170のタンパク質を生産し、それらのうちのおおよそ50のみが、ウイルス生産に不可欠なものである（非特許文献17）。したがって、これらのウイルスタンパク質のうちの圧倒的多数が、ウイルスのその宿主との共存を支援することとなる重要な宿主機能の制御に向けられる。これらのタンパク質が、癌発生の一因となる宿主機能の制御により、および免疫応答を変調させることにより、免疫系によって発見されないようにウイルス感染腫瘍細胞を守ることとなる（非特許文献15）。癌の病理発生に関与する可能性を秘めているCMV機序は、腫瘍調節機序と呼ばれる（非特許文献10、13）。

30

40

【0005】

腫瘍調節は、腫瘍細胞によってもたらされる適切な遺伝的環境の中で、細胞内シグナル伝達経路、転写因子および腫瘍抑制タンパク質の混乱を特徴とする発癌プロセスを促進する能力と定義される。CMVは、細胞分化を阻止することができ、発癌遺伝子発現に干渉することができ、特異的染色体切断を誘導することができ、DNA修復機序を阻害することができ、重要な後成的機能を制御することができ、細胞増殖を制御することができ、アポトーシスを阻害することができ、血管新生および細胞遊走を誘導することができ、これらすべてが腫瘍調節機序をもたらす（非特許文献10、13）。さらに最近のデータは、こ

50

のウイルスが発癌性であり得ることも示唆している；ある研究は、CMVタンパク質US 28の発現が、実際にはそれだけで腫瘍発生をもたらすことを、マウスモデルにおいて誘導COX-2発現およびVEGF生産によって証明した（非特許文献18、19）。トランスジェニックマウスにおける腸上皮に標的化されたUS 28の発現は、腸過形成、腺腫および腺癌を生じさせる結果となる（非特許文献20）。Smitsグループとの共同研究で、本発明者らは、US 28がSTAT3のリン酸化ももたらし、その結果IL-6生産および増殖性表現型を生じさせることを最近立証した。STAT3リン酸化、例えば、膠芽腫におけるSTAT3リン酸化を膠芽腫患者の生存と相関させた（非特許文献6）。本発明者らは、最近、CMVタンパク質IE72がプロモータのSP-1結合部位との相互作用により高テロメラーゼ活性を誘導することも発見した（非特許文献7）。テロメラーゼ活性の誘導は、発癌性ウイルスの共通現象である。興味深いことに、本発明者らは、GBM腫瘍においてCMV感染細胞のみがhTERT発現増加を呈示することを見出した（非特許文献7）。癌におけるCMV感染の重要な役割についてのさらなる報告で、本発明者らは、最近、CMV感染レベルが膠芽腫患者の生存延長に関連づけられることを見出した（非特許文献1）。さらに、膠芽腫腫瘍におけるCMV感染レベルは、患者生存についての強力な予後因子である。診断時に腫瘍におけるCMV感染度が低い（25%未満のウイルス陽性細胞と定義される）患者は、感染度が高い患者より2.5倍より長く生存する（非特許文献21）。in vitroでのガンシクロビル処置は、腫瘍成長を80～95%阻害し、および動物モデルは、ウイルス複製を標的にする薬物を使用すると、腫瘍成長の40～75%阻害を明示する（非特許文献8、22）。

【0006】

CMVは免疫系による検出を回避する

CMVは、免疫系による認識を回避するように設計された、洗練された機序を発達させてきた。例えば、CMVは、HLAクラスIおよびクラスII分子の発現ならびに抗原提示を阻害し、T細胞活性化を制御し、NK細胞活性化を阻害し、活性化されたTおよびNK細胞から放出される細胞溶解性ペプチドから細胞を守る（非特許文献16、23）。CMVは、その独自のケモカイン、サイトカインおよび成長因子を生産し、ならびにケモカイン、サイトカインおよび成長因子の細胞生産を制御する（非特許文献15）。これらは、感染細胞を免疫系に不可視にする戦略の例であり、CMV感染腫瘍が、免疫系によってまたはそれらに対して開発された免疫療法によって制御されない理由を説明することができる。それ故、このウイルスが炎症依存性である（非特許文献24）と同時に、感染腫瘍細胞は免疫系に不可視になる（（非特許文献16、23）において総説されている）。本発明者らのグループは、初めて、ミエロイド系列の細胞を潜在ウイルスの主要循環キャリアとして同定し（非特許文献24）、T細胞の免疫活性化ならびにその結果としてのTNF- α およびIFN- γ 生産がマクロファージ分化を生じさせる結果となり、潜在CMVの再活性化の重要な要素であることを確認した（非特許文献24、25）。 α ウイルス感染は、COX-2も誘導し（非特許文献18、26-28）、本発明者らは、最近、このウイルスが5-L0発現も誘導（非特許文献29）して、炎症を誘導し、ウイルス複製を増進し、これが腫瘍生物学に大いに関連していることを発見した。

【0007】

CMV遺伝子産物は化学療法に対する耐性を付与する

アポトーシス、すなわちプログラム細胞死は、NK細胞および細胞傷害性T細胞によって媒介される死滅についての機序の最終段階である。薬物によって誘導される死に対する腫瘍細胞の感受性減弱は、抗癌療法が失敗する主な理由の1つである。少なくとも5つの異なるCMVタンパク質（すなわち、IE1、IE2、UL36およびUL37、UL38）は、CMV感染腫瘍細胞のアポトーシスを阻害し、生存を増進することができる。これらのタンパク質は、所望の化学療法効果を妨げることもある。この仮説の裏付けとして、神経芽腫細胞におけるUL36発現は、化学療法に対する耐性を付与する（非特許文献30）。

【0008】

癌におけるCMV濃密体の重要な役割

様々な起源の癌においてCMVタンパク質が頻繁に検出されることを実証するデータが増えている。膠芽腫；神経芽腫；髄芽腫；膵臓腫瘍からの結腸、乳および前立腺癌；肉腫；悪性黒色腫；扁平上皮癌腫；卵巣癌；子宮頸癌の>90は、腫瘍細胞における高CMVタンパク質発現を明示するが、その腫瘍を包囲する非腫瘍組織は、一貫してウイルス陰性である。本発明者らは、患者生検材料も調査し、それらがすべてCMVタンパク質発現について非常に陽性であることを発見した。CMVタンパク質発現は腫瘍内に広範に分布し、CMV RNA転写産物は容易に検出されるが、極めて対照的に、CMV DNAを同じ組織試料において検出することは難しかった。これは、物議をかもし問題となっており、当分野の研究者の多くを悩ませ、これが人為的結果を表すのかどうか関心が高まっている。

10

【0009】

それ故、CMV感染に対する戦略およびこれが例えば癌の開始または進行にどのように影響を及ぼすのかを明らかにすることへの長年の要求およびそのための広範な研究が当分野には存在する。これは、それを明らかにすることで、それを必要とする患者のより容易な処置を可能にする可能性のある診断方法はもちろん、可能性のある新たな治療的処置も明かすことができるだろうからである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

20

【非特許文献1】 Herpesviridae. 2012 Mar 16; 3(1): 3.

【非特許文献2】 J Virol. 2011 Nov 16.

【非特許文献3】 Cancer Res. 2002 Jun 15; 62(12): 3347-50.

【非特許文献4】 Neuro Oncol. 2007 Oct 19.

【非特許文献5】 Clin Cancer Res. 2011 Jul 15; 17(14): 4642-9.

【非特許文献6】 Sci Signal. 2010 Aug 3; 3(133): ra58.

【非特許文献7】 J Natl Cancer Inst. 2009 Apr 1; 101 (7): 488-97.

【非特許文献8】 J Clin Invest. 2011 Oct 3; 121 (10): 4043-55.

【非特許文献9】 Oncotarget. [Research Support, Non-U.S.Gov't], 2011 Dec; 2(12): 1329-38.

30

【非特許文献10】 Virus Res. 2011 May; 157(2): 193-203.

【非特許文献11】 Nature. 1977 Jan 13; 265(5590): 184-6.

【非特許文献12】 Cancer Treatment Reports. 1977; 61 (2): 139-46.

【非特許文献13】 Neoplasia. 2009 Jan; 11(1): 1-9.

【非特許文献14】 Trends Mol Med. 2004 Jan; 10(1): 19-23.

【非特許文献15】 J Intern Med. 2006 Mar; 259(3): 219-46.

【非特許文献16】 Crit Rev Immunol. 2006; 26(3): 231-64.

【非特許文献17】 Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 9; 100(25): 14976-81.

【非特許文献18】 Cancer Res. 2009 Apr 1; 69(7): 2861-9.

【非特許文献19】 Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 29; 103(35): 13068-73.

40

【非特許文献20】 J Clin Invest. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U. S. Gov't]. 2010 Nov 1; 120(11): 3969-78.

【非特許文献21】 Rahbar A, Stragliotto G, Peredo I, Orrego A, Willems J, Soderberg-Naucler C. Low levels of Human Cytomegalovirus infection in glioblastoma multiforme associates with high patient survival; -a case control study Submitted. 2011.

【非特許文献22】 Wolmer-Solberg N, Baryawno N, Odeberg J, Fuchs D, Rahbar A, Taher C, et al. Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? Submitted. 2011.

【非特許文献23】 Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:333-59.

50

- 【非特許文献 2 4】Cell. 1997; 91 (October 3): 119-26.
 【非特許文献 2 5】J Clin Invest. 1997 Dec 15; 100(12): 3154-63.
 【非特許文献 2 6】Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19; 99(6): 3932-7.
 【非特許文献 2 7】Microbes Infect. 2006 Jul; 8(8): 2236-44.
 【非特許文献 2 8】Circ Res. 1998 Jul 27; 83(2): 210-6.
 【非特許文献 2 9】J Exp Med. 2008 Jan 21; 205(1): 19-24.
 【非特許文献 3 0】Cancer Res. 1998 Jan 15; 58(2): 367-72.
 【非特許文献 3 1】J Virol. 2004 Aug; 78(15): 8191-200.
 【非特許文献 3 2】Taher C, Yaiw K-C, Rahbar A, Mohammad A-A, Assinger A, Khan Z, et al. High Prevalence of a Novel Genetic Variant of Cytomegalovirus in Cancer Patients submitted. 2011.

- 【非特許文献 3 3】J Virol. 1993; 67(6): 3166-75.
 【非特許文献 3 4】J Clin Microbiol. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 May; 34(5): 1209-15.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、サイトメガロウイルス (CMV) の、前初期遺伝子 (IE: immediate early gene) CMVゲノムのイントロン 2 (配列番号 17) の欠如を示した、新規遺伝子変異体を定義することにより、本明細書において提起する問題を今般解消した。前記遺伝子変異体を CMV IEΔi2 という名にした。本発明はまた、主要最初期遺伝子におけるイントロン 2 (配列番号 17) の欠如による野生型 CMV および/または新規ウイルス株の変異体を表す、CMV IEΔi2 という名の、発見された CMV の新規遺伝子変異体はもちろん、前記遺伝子変異体から転写されたスプライス変異体および前記遺伝子変異体から翻訳されたタンパク質も包含する、方法および使用に関する。前記方法は、例えば、癌の素因の診断または既に発生した癌疾患の診断に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】免疫組織化学によるヒトサイトメガロウイルス (CMV) タンパク質の検出を示す図である。CMV 前初期抗原 (CMV-IEA: CMV immediate early antigen) が、GBM (glioblastoma multiform: 多形膠芽腫) 患者から得た脳腫瘍組織 (A) において、神経芽腫、髄芽腫における NB (B)、MB (C) において、ならびに結腸癌組織 (G) において、および乳癌組織 (H) において検出された。平滑筋細胞アルファアクチンに対する抗体 (D、E、F) およびケラチン 20 (I) およびサイトケラチン (J) に対する抗体は、対照としての役割を果たした。未指定のバー = 50 μm

【図 2】乳癌試料におけるヒトサイトメガロウイルス前初期 (CMV IE: cytomegalovirus immediate early) および後期 (LA: late) タンパク質の免疫組織化学染色を示す図である。CK は、陽性または染色対照としての腫瘍細胞のサイトケラチン染色を表し、陰性 (Neg) 対照は、アイソタイプ対照抗体を表す。この写真は、腫瘍細胞において CMV、すなわち CMV タンパク質、が限定発現されることの例証となる。

【図 3】リンパ節における乳癌腫瘍のリンパ節マクロ転移のヒトサイトメガロウイルス前初期 (CMV IE) および後期 (LA) タンパク質の免疫組織化学染色を示す図である。CK は、陽性、すなわち染色対照としての腫瘍細胞のサイトケラチン染色を表し、陰性対照は、アイソタイプ対照抗体を表す。この写真は、腫瘍転移の際にも腫瘍細胞において CMV タンパク質が限定発現されることの例証となる。

【図 4】ヒトサイトメガロウイルス前初期抗原 (CMV IEA) および pp65 につい

ての細胞系（髄芽種D 2 8 3）のフローサイトメトリー染色を示す図である。CMVタンパク質発現は、様々な起源の腫瘍細胞系において様々なタンパク質発現レベルで頻繁に検出される（ $n=40$ ；CMV陽性細胞は、0.5%から69%まで幅があり、同じ細胞系でも試料採取時が異なると変わり得る）。

【図5】野生型のヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期（IE）遺伝子および該CMV IE遺伝子領域のPCRに使用した様々なプライマーの位置の略図である。CMV IE Δ i 2にはイントロン2が欠けており、これを、主要前初期（MIE：major immediate early）アウターおよびMIEインナープライマーペアを使用するネステッドPCRによって、または欠失変異体のみが陽性シグナルを与えることを可能にするエクソン2および3に及ぶプローブでのTaqman PCRによって判定する。

10

【図6】ネステッドPCRが、癌患者における実験室サイトメガロウイルス株（CMV）で感染させた細胞のRNA試料のcDNAと同様のサイズの、218bpのPCR DNA断片を増幅し（C3）、その一方で、同じ培養物のDNA調製物が332bpのPCR断片を増幅する（C2）ことを示す図である。健康ドナー（HD：healthy donor）および伝染性単核球症（IMN：infectious mononucleosis）を有するウイルス血症患者からの野生型のDNA断片を増幅した。HD：健康ドナー、CC：結腸癌、NTC：無テンプレート対照、NB：神経芽腫、BrC：乳癌細胞、OvC：卵巣癌、C1：未感染線維芽細胞、C2：CMV感染線維芽細胞からのDNA、C3：CMV感染線維芽細胞からのcDNA。

20

【図7】CMV IE Δ i 2変異体を保有する癌患者におけるイントロン2の欠失（A）または健康ドナーにおける野生型変異体（B）を明示するクロマトグラムを示す図である。この図は、CMV IE Δ i 2変異体を保有する癌患者におけるイントロン2欠失の部位（A）（配列：GTG GCC TTG GTC ACG GGT GTC TCG GCC GTG GCA CCT TGG AGG AAG GGC CCT）または健康ドナーにおける野生型変異体（B）（配列：ACG TCG TGG CCT TGG ACA CGG GTG TCT CGG CCT AAA CAC ATT AGA AAT AG）を実証する。

【図8】様々な起源の癌において見出されたヒトサイトメガロウイルス（CMV）IE Δ i 2株におけるイントロン2の欠如を実証するシーケンシングされたPCR産物のアラインメントを示す図である。エクソン2およびエクソン3を示し、ネステッドPCRに使用したプライマーの位置も示す。CMV IE Δ i 2は、例えば、乳癌、結腸癌、髄芽種、神経芽腫および膠芽腫において見出されるが、ウイルス血症患者または健康対照は、野生型CMV株を保有する。

30

【図9】実験研究において一般に使用される3つの異なるウイルス株（332bpの野生型断片を増幅するVR1814、TB40およびAD169）のネステッドPCRを示す図である。ウイルスストックからまたはウイルス感染細胞から試料を調製した。NTC：陰性対照、C2：218bpの断片を増幅した感染細胞からのcDNA。

【図10】ネステッドPCRがアテローム性動脈硬化症を有する患者および伝染性単核球症患者（IMN）からの血清試料中の318bpの野生型DNA断片を増幅することを示す図である。C2：同じ細胞からのDNA調製物（C3）で見えるwt DNAバンドも明示するCMV野生型感染細胞のcDNA試料（この試料をDNase処理しなかった）。

40

【図11】健康血液ドナーにおけるDNAの増幅を示す図である。C2：DNA野生型（wt）CMVについての陽性対照。ある個体（22）は、CMV IE Δ i 2を有し、これは、調査した対照の12～13%において見出された。

【図12】前初期（IE）遺伝子の欠失されたイントロン2を描写する、GBM RNA転写産物、すなわち（3つの異なるフラスコから採集した）膠芽腫初代細胞培養物からのCMV DNA、の配列アラインメントを示す図である。IE1、IE9、IE17.5およびIE19のコード配列を、エクソン2およびエクソン3のMerlin参照配列（

50

遺伝子バンク A Y 4 4 6 8 9 4 . 2) と共に示す。

【図 1 3】ヒトサイトメガロウイルス (CMV) モノクローナル抗体 (クローン 8 1 0 R) を使用する神経芽腫 (NB) 原発性腫瘍からの細胞溶解産物のウエスタンブロット分析を示す図である。CMVタンパク質前初期 (IE) 5 5、IE 7 2 および IE 8 6 は、豊富ではない；1つの試料のみが IE 5 5 を明示する (NB 7)。その代わり、新規タンパク質は、3 8、3 1、2 0 および 1 0 k D a のサイズを再発現した。図 1 4 に示す陽性対照。

【図 1 4】ヒトサイトメガロウイルス (CMV) モノクローナル抗体 (クローン 8 1 0) を使用する膠芽腫原発性腫瘍からの細胞溶解産物のウエスタンブロット分析を示す図である。CMVタンパク質前初期 IE 5 5、IE 7 2 および IE 8 6 は、豊富ではない；2つの試料のみが IE 7 2 を明示する (4 2、5 0)。その代わり、おおよそ 5 0、5 3、2 8、2 4、1 9 および 1 0 k D a のサイズを有する新規タンパク質が発現された。陰性対照は、未感染線維芽細胞、MRC-5 であり、陽性対照は、感染後 1 5 日の時点での感染 MRC-5 である。

【図 1 5】IE 8 6 に対するヒトサイトメガロウイルス (CMV) ペプチド抗体を使用する膠芽腫原発性腫瘍細胞培養物からの細胞溶解産物のウエスタンブロット分析を示す図である。ウイルス感染細胞の陽性対照と野生型 CMV 株 VR 1 8 1 4 の供覧のための 2 コマ。CMVタンパク質 IE 5 5 および IE 8 6 は、初代培養物にはもちろん 4 0 k D a および 2 0 k D a タンパク質にも非常に豊富にあるが、原発性膠芽腫において発現される特有のタンパク質の幾つかは失われる。2つの試料のみが 5 0、5 3 k D a タンパク質を発現し (3 0、4 6)、3つが 2 8 k D a タンパク質を発現する (4 2、4 7、4 8)。その代わり、新規タンパク質は、5 0、5 3、2 8、2 4、1 9 および 1 0 k D a のサイズを再発現した。

【図 1 6】細菌人工染色体 (BAC: bacterial artificial chromosome) ベクター内の全ヒトサイトメガロウイルス (CMV) ゲノムを含有する CMV プローブを使用する蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション (FISH: fluorescent in-situ hybridization) を示す図である。A) 感染後 7 日の時点での CMV 野生型感染細胞 (AD 1 6 9)。B) CMV 野生型ウイルスの健常保有者。C) 別の膠芽腫患者 D) に関して描写したように増幅されることがある、CMV ゲノムの末梢位置を明示する膠芽腫腫瘍からのインプリント。CMV ゲノムの末梢位置のパターンは、癌細胞内に CMV IE Δ i 2 株を保有する癌患者では非常に明瞭であり、再現可能である (n = 4 0 ; 1 0 0 %)。

【図 1 7】図 1 7 A は、細菌人工染色体 (BAC) ベクター内の全ヒトサイトメガロウイルス (CMV) ゲノムを含有する CMV プローブを使用する蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション (FISH) が、膠芽腫患者からの腫瘍細胞における染色体 1 7 への CMV ゲノムの組み込みを明示することを示す図である。図 1 7 B は、染色体 1 7 の両方の染色分体中に存在する CMV DNA を表す 2 つの小点がより高倍率では見えることを示す図である。

【図 1 8】図 1 8 A は、GBM 患者において見出された RNA 転写産物の配列アラインメントを示す図である。Awasthi ら、「J Virol」、2004 年 8 月、p. 8 1 9 1-8 2 0 0 (3 1) からの公知スプライス変異体の略図。出版された学術雑誌 (IE 1 および IE 2 のアミノ酸アラインメントおよびスプライス変異体を示している Awasthi ら、「J Virol」、2004 年 8 月、p. 8 1 9 1-8 2 0 0 (3 1)) からの前初期 (IE) 1 9、IE 1 7 . 5 および IE 9 の配列アラインメント。図 1 8 B は、IE 遺伝子のエクソン 2、3、4 および 5 から誘導された多数のスプライス変異体を示すカートン図 (carton drawing) である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 4】

定義

本明細書の中で言及する場合の「イントロン」は、遺伝子の最終成熟 RNA 産物を生成

10

20

30

40

50

するためにRNAスプライシングによって除去される遺伝子内の任意のヌクレオチド配列である。用語イントロンは、遺伝子内のDNA配列を指すが、イントロンを有する遺伝子から転写されたRNA転写産物内の対応する配列では除去されている。

【0015】

本明細書の中で言及する場合の「エクソン」は、メッセンジャーRNAに転写されるタンパク質合成のための情報をコードするDNAの核酸配列である。

【0016】

本明細書中で「CMV IE Δ int2」とも呼ぶ、本明細書中で定義する場合の「CMV IE Δ i2」は、CMVの分離株である、CMVの遺伝子変異体であって、核酸配列は図5に示すとおりCMV IEゲノムに対応するが、前初期と称する領域のイントロン2（IEのイントロン2を配列番号17に提供する）に対応する部分が、図6、図7および図8で実証されるようにそのDNAに欠損、欠如または欠失している遺伝子変異体を指す。wt CMV株は、遺伝子バンクにおける（AY446894.2 Merlin）を指し、塩基対位置170689-176186におけるその最初期遺伝子は、図5において参照遺伝子としておよび図8においてイントロン2が欠如しているCMV IE Δ i2への参照として言及するようなIE遺伝子を含む。本明細書において、前記遺伝子変異体は、Merlin参照配列AY446894.2（野生型CMV）の位置173903から位置174019の核酸配列が前記遺伝子変異体に欠如していることをさらに特徴とする。

【0017】

「最初期」（IE）遺伝子は、急性感染中において多種多様な細胞刺激に応答して一過的かつ迅速に活性化される遺伝子である。IE遺伝子は、感染中にCMVゲノムから転写される遺伝子の第一セットであり、その後、初期および後期遺伝子が転写され、この転写をそれらのIE遺伝子が制御する。IE遺伝子は、あらゆる新たなタンパク質が合成される前に刺激に対する第一の応答ラウンドにおいて転写レベルで活性化される、確立された応答機序を示す。CMVゲノムのウイルスユニークロング（UL: unique long）遺伝子セグメント内にある主要前初期遺伝子UL123/122は、wt CMV Merlin株（遺伝子バンクAY446894.2）の塩基対位置170689-176186に位置する領域を指す。主要前初期遺伝子は、主要前初期（MIE）プロモータの制御下で転写されて、幾つかのIEタンパク質（IE1またはIE72、IE2またはIE82-86、IE86、IE2-55またはIE55）をコードするセンスRNA転写産物を生産する。これらのタンパク質は、エクソン2およびエクソン3を共有し、したがって同じタンパク質N末端を共有する。これらの主要IEタンパク質に加えて、他のIEタンパク質が修飾mRNA分子の転写産物の翻訳によって生産される（下記参照）。

【0018】

本明細書において述べる場合のサイトメガロウイルス（CMV）の「遺伝子変異体」は、イントロン2のみが欠如しているCMV変異体を指すか、他のCMV株と比較してCMVゲノムの前初期領域と一般に称する領域（図5参照）が改変されており、その領域イントロン2を含まない（図6、図7および図8参照）ような変異体である、CMVの新規ウイルス株を指す。したがって、この変異体は、変異が既にCMVウイルスのDNAレベルで起こっており、その後、この遺伝子変異体からのCMVタンパク質の転写および翻訳の結果として起こる事象で増殖されるため、「遺伝子による」または「遺伝子改変された」ものであり、それをここでさらに説明する。配列番号1の核酸配列は、本明細書中で定義するとおりのおよび野生型CMVと比較されるようなこの遺伝子変異体の特徴DNA領域を定義するものである。この領域は、wt CMVのエクソン2および3であって、イントロン2を欠如したため該wt CMVの遺伝子変異体のDNA内で今や直接接続されているエクソン2および3に対応する。CMVウイルスが、かかる修飾領域を有する場合、これを、かかるCMVウイルスがwt CMVの遺伝子変異体であることの識別に用いることができる。これは、例えば、PCR法を使用することにより、または本明細書においてさらに定義するように行うことができる。

【0019】

「スプライス変異体」は、遺伝子の転写によって生産されたRNA（一次遺伝子転写産物またはpre-mRNA）、例えば本文脈では遺伝子変異体CMV IEΔi2、のエクソンがRNAスプライシング中に多数の方法で再接続されるプロセスによって生産され、このプロセスは、時として選択的スプライシング（または差次的スプライシング）と呼ばれる。分子生物学において、「RNAスプライシング」は、イントロンが除去され、エクソンが連結される、転写後のRNAの修飾である。典型的な真核生物メッセンジャーRNA（mRNA）にはこの修飾が必要であり、その後、そのmRNAを用いて翻訳により正しいタンパク質を生産することができる。多くの真核生物イントロンについて、スプライシングは、核内低分子リボ核タンパク質（snRNPs：small nuclear ribonucleoproteins）の複合体であるスプライソソームによって触媒される一連の反応で行われるが、自己スプライシングイントロンもある。

10

【0020】

結果として生ずる様々なmRNAは、様々なタンパク質アイソフォームに翻訳され得、すべてが、野生型CMV感染では5プライマー末端からの転写によって生産される。主要IE遺伝子の中で、6つの公知スプライス変異体、例えば、エクソン2およびエクソン3を含有するもの（図5および図8参照）；IE9（AY445661.1；エクソン2および3、ならびにエクソン4の2つのアミノ酸；感染細胞では観察されないが10kDのものであると予測されるタンパク質）；IE19（AY436380.1；エクソン2、3、およびエクソン4の断片が38kDタンパク質を生産する）；IE17.5（AY445660.1；IE19と共有される、エクソン2、3、ならびにエクソン4のより小さい断片が、31kDaタンパク質を生産する）；IE18（配列番号2；エクソン2、3および5が18kDaタンパク質を生産する）が、変異体IEタンパク質を生産することは公知である。2つのIEタンパク質、IE40（配列番号3；40kDaタンパク質）およびIE60（配列番号4；60kDaタンパク質）、はエクソン5から作られる。かくて、その結果、単一遺伝子が多数のタンパク質をコードすることができる。したがって、本明細書における様々な「スプライス変異体」は、遺伝子変異体CMV IEΔi2の転写中に起こる様々なスプライシング事象によって生産されて、新規IE RNA転写産物およびIEタンパク質を生産する。

20

【0021】

したがって、本発明は、サイトメガロウイルス（CMV）の遺伝子変異体であって、本明細書においてCMV IEΔi2またはCMV IEΔint2とも呼ばれ、CMVゲノムのIE遺伝子内のイントロン2が欠如している遺伝子変異体に関する。CMVの本遺伝子変異体が、癌疾患に罹患している患者に高い出現率で存在することは証明されており、それをここでさらに明らかにする。

30

【0022】

CMV IEΔi2は、様々な癌形態を有する患者に非常に多く見られる（72/86、85%）が、ウイルス血症患者（1/19、10%）および健常集団（2010年に試験して15/100；15%、1995年に試験して0/285）ではさほど頻繁には検出されないことが判明した（32）。CMVのこの遺伝子変異体に感染した腫瘍細胞は、スプライスRNA変異体および新規CMV IEタンパク質を発現し、これらが癌の樹立および進行をさらに助長する。この新規CMV株は、様々な組織／器官の腫瘍細胞において活性ウイルス感染生産ウイルスタンパク質として検出されるが、腫瘍を包囲する非腫瘍組織は、CMVタンパク質陰性のままである。

40

【0023】

CMV IEΔi2は、100の臨床単離物のうちの3つから単離された。3ケースすべてにおいて、CMV IEΔi2ウイルスは、wt CMVウイルスと共に単離されたので、より遅い成長速度およびより低い複製効率を有するようである。

【0024】

CMV IEΔi2株の保有者の如何なる生涯リスクが、癌またはCMV陽性腫瘍の発

50

生についてのものなのかは今のところ不明であり、その84%しかCMV IEΔi2株を保有しない。したがって、CMV IEΔi2株に感染している個体の10~15%のうちの何名が癌を発生することとなるのかは不明であるが、本明細書の中でさらに提起する多くの理由のためやはりこのCMV IEΔi2株の保有者を同定する必要がある。

【0025】

遺伝子変異体CMV IEΔi2の転写が如何にして調節されるのかは今のところ不明である。腫瘍組織検体において、CMV IEΔi2の存在は、スプライスCMV変異体IEタンパク質の高い発現と関連づけられる。

【0026】

したがって、本発明の1つの態様では、CMVΔIEi2株の保有者を同定することにより、例えば、配列番号1で開示する変異体同定マーカについて検索することにより、および様々な一般に用いられている技術を用いることにより、哺乳動物における癌の素因を検出することおよび/または癌形態を診断することが可能である。この情報は、生体試料を通した、例えば献血、器官および幹細胞移植ならびに授乳による、個体間のCMVΔIEi2株の伝達を回避するのに有用であり得る。

【0027】

成人人口の約70%はサイトメガロウイルス(CMV)の保有者である。CMVタンパク質および核酸は、最近、膠芽腫、神経芽腫、髄芽腫、乳、結腸および前立腺癌をはじめとする様々な起源の腫瘍の>90%において見出された。非常に多数のCMVタンパク質が発癌性または腫瘍調節性(oncomodulatory)であるが、ほんの少数のCMV保有者しか癌を発生しないことを示唆する証拠が増えている。これまでに未知のCMVウイルス株が腫瘍患者、原発性腫瘍培養物(89%)または細胞系の84%において検出されるのに対して、この株が健康血液ドナーの0~15%およびCMVウイルス血症患者の10%において見出されることが判明した。このウイルス株は、CMVゲノムの最初期領域内のイントロン2の欠如によって同定された。スプライスRNA変異体および特有のウイルスタンパク質は、腫瘍細胞内のCMV IEΔi2株によって生産された。CMV IEΔi2株の個体において癌を生じさせる発癌能力の浸透度をやはり明らかにすべきである。さらに、輸血によるこのウイルスの伝播を、哺乳動物におけるかかるCMV株の存在を判定するための方法、例えば、本発明の態様により例示されるもの方法によって予防することができる。

【0028】

本発明は、腫瘍におけるCMV感染が、様々な癌形態と高度に関連づけられるCMVの新規変異体を説明する決定的証拠を開示する。このCMV変異体での癌細胞の感染は、癌幹細胞から欠陥粒子「濃密体」を生じさせ、それにより癌の診断および発生の新規モデルを提案する、感染の新規実体を表す。その裏付けとして、CMVゲノムの主要前初期領域内のイントロン2が一貫して欠如しているCMVの新規遺伝子変異体を明らかにした。

【0029】

新規RNA転写産物およびCMV IEタンパク質は、原発性腫瘍、原発性腫瘍培養物および細胞系におけるCMV感染腫瘍細胞によって生産される。RNA転写産物は、濃密体またはエキソソームによってCMV DNA陽性細胞から周囲の細胞へと送達され、その結果、ウイルスを複製しない細胞においてCMVタンパク質が発現されることとなり、それによって、細胞の形質転換が可能になる。それらの細胞は溶解感染を受けることにならないからである。

【0030】

特定の理論により拘束されないが、どの組織/器官において腫瘍が発生することとなるのかは、主として、欠陥ウイルス粒子、すなわち濃密体、でのまたはエキソソームによるCMVタンパク質およびRNAの送達による、細胞の発癌性形質転換および標的組織での癌発生を生じさせる結果となる、CMVΔIEi2株を保有する潜伏感染細胞のその組織への動員およびそのウイルスの再活性化に依存することとなる可能性が高い。炎症は、潜在CMVの再活性化のための駆動力であるので、癌開始のこの初期段階は、癌の周知リス

ク因子である炎症に依存することとなる可能性が高い。活性時、CMV IEΔi2は、CMV IE領域から新規RNA転写産物（図12でCMV IEΔi2によって生産されることが説明されるようなセンスRNAとアンチセンスRNA両方）を生産することとなる。IEタンパク質は、CMV濃密体で細胞間を移動するので、多くの細胞形態の主因となる。

【0031】

CMV IEΔi2株が、樹立された癌においてそのように多くみられることに鑑みて、その潜在的高悪性能の疑いをさらに強める。したがって、変異体CMV株（CMV IEΔi2）の検出を輸血または幹細胞移植片注入の前、臓器移植前に行って、この外見上発癌性のCMV株の伝達を回避すること、および患者においてより晩年に疾患が発生するのを予防することができるだろう。これは、本発明の例証態様に従って行うことができるだろう。

10

【0032】

さらに、CMV血清陽性授乳母の90%より多くが、彼女たちの母乳中に再活性化された潜在CMVを有し、1歳の子供におけるCMVの出現率は、主として母乳によるウイルス伝達のため、39~40%である。したがって、授乳婦は、彼女たちの子供へのこの外見上発癌性のCMV株の授乳および伝達を避けるため、およびそれによって子供の将来の癌発生病リスクを低下させるために、CMV IEΔi2株の保有者であるかどうか検査することを選択することができるだろう。受精によるその伝達を避けるために、ウイルスを含有するかもしれない新鮮およびバンク保存精液にもこの試験法を適用すべきである。したがって、本発明は、授乳母から得た生体試料において本明細書中で定義するとおりの遺伝子変異体を同定および／または検出するための方法にも関する。

20

【0033】

ヒト試料（組織、または体液、例えば血液、血漿、血清、母乳、精液、尿および唾液、または幹細胞試料）中のCMV IEΔi2の存在を、最初期遺伝子のイントロン2の欠如を特異的に検出するPCR技術で診断し、新規タンパク質をウエスタンブロットまたはELISA法で検出する。様々な一般的な癌形態を有する患者から得た生体試料における野生型CMV株からのCMV IEΔi2株の検出の実行可能性を立証するために3つの診断PCR法の例を本明細書に開示し、これらの例は本発明に包含され、材料および方法の項でこれらの例を詳細に説明する。

30

【0034】

様々なCMV特異的抗体を使用するウエスタンブロットにより、腫瘍細胞の細胞溶解産物において、CMV IEΔi2株によって生産された新規タンパク質を検出する。

【0035】

これらのタンパク質に特異的な抗体を使用するELISAを用いて、サンドイッチELISA設定でのさらなる検出のためのタンパク質を捕捉する。したがって、このELISAを本発明の態様において利用することができるだろう。さらに、5プライマー末端または3プライマー末端からそれぞれ転写された新規センスおよびアンチセンス転写産物のタンパク質をELISAに使用して、CMV IEΔi2株の保有者を定義するために血清または血漿中のそれらの存在をスクリーニングしながら、これらの特有のタンパク質に対して生産された抗体を検出して、疾患のバイオマーカーとして使用する。本発明の他の態様では、静脈内免疫グロブリン中のCMVに対する抗体またはCMV IEΔi2株によって生産された濃密体のエンベロープ中に存在するCMVタンパク質に対する特異的モノクローナルもしくはポリクローナル抗体を使用して、ヒト試料、例えば血清または血漿、中のこれらの粒子を濃縮して、活性形態のCMV IEΔi2株を検出する。PCR、ウエスタンブロットまたはELISA技術を用いて、核酸または新規タンパク質の存在を確認する。

40

【0036】

したがって、1つの態様において、本発明は、サイトメガロウイルス（CMV）の遺伝子変異体であって、CMVゲノムの前初期（IE）遺伝子のイントロン2（IEのイント

50

ロン2の配列を配列番号17に示す)の欠如を特徴とする遺伝子変異体(CMV IEΔi2)に関する。したがって、前記遺伝子変異体は、配列番号17の核酸、すなわち、Merlin参照配列AY446894、2の位置173903から位置174019における核酸配列の欠如をさらに特徴とし得る。野生型株と比較して前記遺伝子変異体CMV IEΔi2において前記配列(配列番号17)が除去されているまたは欠失している場合、ゲノム内のその領域では、配列番号1に明記するとおりのDNA配列が産生される、すなわち、この場合、イントロン2が不在のためエクソン2および3は隣接している。

【0037】

配列番号7および8に明記するようなプライマーを使用することにより配列番号1を産生し、それを使用してCMV DNAを増幅する。プライマー位置は、Merlin配列AY446894、2の位置173741から174073である。

【0038】

本明細書における他の態様では、本明細書中で定義するとおりの遺伝子変異体の転写によって得られるRNAスプライス変異体を包含する。もう1つの態様では、本発明は、遺伝子変異体CMV IEΔi2の転写によって得られるRNAスプライス変異体に関する。1つの態様において、前記RNAスプライス変異体は、CMV IE遺伝子のエクソン2および3、ならびに／またはそれらの一部から成る。

【0039】

本発明に関して、エクソンの1つ以上の部分を含むRNAスプライス変異体は、例えば、あるエクソンの一部分および完全な他のエクソンから成る、例えば図12bに例示するような、RNAスプライス変異体を指す。

【0040】

もう1つの態様において、前記RNAスプライス変異体は、CMV IE遺伝子のエクソン2、3および4、またはそれらの一部から成る。もう1つの態様において、前記RNAスプライス変異体は、CMV IE遺伝子のエクソン2、3および5、ならびに／またはそれらの一部から成る。本明細書に例示するような本発明のすべての態様において、前記遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および／またはRNAスプライス変異体および／または本明細書中で述べるタンパク質を、例えば、本発明の任意の方法または使用またはキットにおいて、CMV IEΔi2株およびしたがってその保有者を同定するために使用できることは、理解されるはずである。

【0041】

本発明のもう1つの態様において、本発明は、本明細書中で定義するとおりのRNAスプライス変異体によってコードされるタンパク質であって、おおよそ150、125、86、72、55、53、50、40、38、36、32、31、24、20、19、18、14、12および10kDaのサイズを有するCMVタンパク質から成る群より選択されるタンパク質に関する。

【0042】

本発明のもう1つの態様は、生体試料中のCMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および／またはそのCMV IEΔi2から転写された本明細書中で定義するとおりの1つ以上のRNAスプライス変異体および／または前記スプライス変異体から翻訳された本明細書中で定義するとおりの1つ以上のタンパク質の存在または不在を検出するための方法であって、a)哺乳動物からの生体試料を用意する段階、b)本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記1つ以上のスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質が、前記生体試料中に存在するかどうかを、段階a)において得た前記試料の専門分析によって判定する段階を含む方法に関する。

【0043】

本発明のもう1つの態様は、生体試料中のCMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および／またはそのCMV IEΔi2から転写されたRNAスプライス変異体および／または前記スプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在を

検出するための方法であって、a) 前記試料の専門分析を行う段階、およびその後、b) 前記生体試料中のCMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記スプライス変異体（単数もしくは複数）から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在を検出する段階を含む方法に関する。

【0044】

さらなる態様において、本発明は、哺乳動物において癌を発生する素因を検出するための方法であって、a) 前記哺乳動物からの生体試料を用意する段階、およびb) 本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記RNAスプライス変異体（単数もしくは複数）から翻訳された1つ以上のタンパク質が、前記生体試料中に存在するかどうかを、段階a) において得た前記試料の専門分析によって判定する段階、およびc) 前記生体試料中の、本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体（CMV IEΔi2）および／またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはその／それらのスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在に基づいて、癌を発生する素因を判定する段階を含む方法に関する。

【0045】

さらに1つの態様では、哺乳動物において癌を発生する素因を検出するための方法であって、a) 生体試料の専門分析により、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記スプライス変異体（単数もしくは複数）から翻訳された1つ以上のタンパク質が、前記生体試料中に存在するかどうかを判定する段階、およびb) 前記生体試料中のCMVの遺伝子変異体（CMV IEΔi2）および／またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはその／それらのスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在に基づいて癌を発生する素因を判定する段階を含む方法を、本明細書において定義する。

【0046】

さらなる態様において、本発明は、サイトメガロウイルス（CMV）関連癌形態を、CMV感染を保有する哺乳動物において診断するための方法であって、a) 前記哺乳動物からの生体試料を用意する段階、b) 本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはその／それらのスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質が、前記生体試料中に存在するかどうかを、段階a) において得た前記試料の専門分析によって判定し、そして前記生体試料中の、本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のRNAスプライス変異体および／またはその／それらのRNAスプライス変異体から翻訳されたタンパク質の存在または不在に基づいて、前記哺乳動物がCMV関連癌疾患に罹患しているかどうかを診断する段階を含む方法に関する。

【0047】

なお、さらなる態様では、サイトメガロウイルス（CMV）関連癌形態を、CMV感染を保有する哺乳動物において診断するための方法であって、a) 生体試料の専門分析により、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはその／それらのスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質が、前記生体試料中に存在するかどうかを判定する段階、およびb) 前記生体試料中の、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体および／またはそのCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはそのスプライス変異体から翻訳されたタンパク質の存在または不在に基づいて、前記哺乳動物がCMV関連癌疾患に罹患しているかどうかを診断する段階を含む方法を、本明細書において定義する。

【0048】

本明細書中で定義するとおりの方法では、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体 (CMV IEΔi2) および／またはそのCMV IEΔi2 から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記スプライス変異体 (単数もしくは複数) から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在を、それ／それらに対する抗体の前記哺乳動物における存在または不在によって判定することができる。

【0049】

加えて、本明細書中で定義するとおりの方法では、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体 (CMV IEΔi2) および／またはそのCMV IEΔi2 から転写された1つ以上のスプライス変異体および／または前記スプライス変異体 (単数もしくは複数) から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在または不在を、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体、このCMVの遺伝子変異体から転写された1つ以上のスプライス変異体および／またはその／それらのスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質に対して産生されたT細胞の前記哺乳動物における存在または不在によって判定することができる。

10

【0050】

本明細書中で定義するとおりの方法において使用するための前記生体試料は、検出のために試料ウイルス粒子を単離することができる、本明細書中で定義するとおりの任意の生体試料であり得る。前記生体試料が細胞を含む場合、これらの細胞をウイルス材料の検出前に溶解することができ、その後、そのウイルス材料をそこから単離する。前記生体試料は、細胞試料に加えて血漿試料であることもある。したがって、本発明に関して、前記生体試料は、血液試料、血漿試料、組織試料、幹細胞試料、臓器移植移植片試料、精液試料、尿試料、唾液試料および母乳試料から成る群より選択することができるが、これらに限定されない。

20

【0051】

本明細書中で定義するとおりの方法では、前記専門分析をDNA検出法、例えば、ISH (in situハイブリダイゼーション) によって行うことができる。

【0052】

1つの態様において、本発明は、本明細書中で定義するとおりの方法であって、前記方法の前記専門分析がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、例えば、TaqMan (登録商標) リアルタイムPCRまたはシーケンスキャプチャーPCRを含む方法によって行われる方法に関する。1つの態様では、前記PCRを、CMVのIE遺伝子のエクソン2および3の少なくとも一部分を増幅することによって行って、配列番号1の存在を判定することができる、すなわち、前記試料中のCMV IEΔi2を検出することができる。これは、図5および図8および表1に例示するようなプライマーを使用することによって行われる。この方法はまた、例えばCD34陽性造血幹細胞における潜在型のCMV IEΔi2を保有する幹細胞において、循環または組織定住CD133陽性幹細胞において、および血管内皮細胞成長因子2 (VEGFR2: vascular endothelial cell growth factor 2) の発現によって同定される循環または組織定住内皮前駆細胞において、CMV IEΔi2を検出するために用いられる。

30

40

【0053】

もう1つの態様では、本発明による方法の技術的分析を、FISH技術 (蛍光in situハイブリダイゼーション) を用いることによって行う。FISHは、染色体上の特異的DNA配列の存在または不在を検出および局在定位するために用いられる技術である。FISHには、蛍光プローブであって、染色体の該蛍光プローブと高い配列類似度を示す部分のみに結合するものである蛍光プローブが使用される。蛍光顕微鏡法を用いて、染色体に結合した蛍光プローブの位置を見つけ出すことができる。FISHは、多くの場合、遺伝相談、医学および種同定に使用するためのDNAの特異的特徴を見つけるために用いられる。FISHを用いて、組織試料内の特異的mRNAを検出および局在定位することもできる。これに関連して、FISHは、細胞および組織内の遺伝子発現の時空間パタ

50

ーンを定義するのに役立ち得る。他の態様において、FISH技術は、遺伝子変異体CMV IEΔi2に感染した細胞内のDNA位置の特異的パターンを検出するためのならびにCMV IEΔi2のヒト染色体への組み込みを同定するための分析用のDNAまたはRNAプローブを含む場合がある。DNA位置のパターンは、CMV陽性腫瘍細胞では潜在wt CMV、またはwt CMVの活性複製と比較して明確に異なる。

【0054】

他の態様では、本発明による方法の技術的分析を、抗体を使用することによって行う。かかる抗体は、例えば、CMVゲノムの前初期(IE)領域のエクソン2および3、すなわちそれらによってコードされたタンパク質、に対して産生されたものであり得、したがって、かかる抗体によりCMVの遺伝子変異体が分析している生体試料中に存在するかどうかを判定することができる。他の態様では、他の領域に対して産生された抗体、例えば、癌患者の血液、血漿または血清からの非感染性CMV粒子、すなわち濃密体またはエキソソーム、に対して産生された抗体も使用することができる。本発明の他の態様では、本明細書に開示するような様々な専門分析方法を併用して、例えば、抗体検出、続いてのPCRもしくはウエスタンブロット、または他の任意の組み合わせを併用して、遺伝子変異体CMV IEΔi2および/またはその1つ以上のRNAスプライス変異体および/または前記RNAスプライス変異体から発現された1つ以上のタンパク質の存在または不在を同定することができる。遺伝子変異体CMV IEΔi2から翻訳された濃密体を含めて、非感染性または欠陥CMV粒子の存在を、抗体を使用して検出することもできる。

【0055】

本発明に関連して、本明細書中で例示するような前記方法を癌の診断に用いることができ、前記癌は、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、結腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、皮膚癌、および肉腫、腎臓癌、膵臓癌ならびにそれらの転移から成る群より選択される。本明細書において述べない他の癌形態も、前記癌形態が本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体の感染を含むのであれば、診断することができる。

【0056】

本明細書に開示するような方法では、本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および/またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のスプライス変異体および/または前記スプライス変異体(単数もしくは複数)から翻訳された1つ以上のタンパク質を、配列番号1に含まれる核酸の、PCR法で前記領域を増幅することによるような、使用により検出することができる。

【0057】

本明細書に開示するようないずれの方法も、in vitro法である場合がある。

【0058】

もう1つの態様において、本発明は、哺乳動物において癌の素因を検出するための、CMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および/またはそのCMV IEΔi2から転写された本明細書中で定義するとおりの1つ以上のRNAスプライス変異体および/またはその/それらのRNAスプライス変異体から翻訳された本明細書中で定義するとおりの1つ以上のタンパク質の使用にも関する。

【0059】

もう1つの態様において、本発明は、哺乳動物においてサイトメガロウイルス(CMV)関連癌形態を診断するための、本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および/またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のRNAスプライス変異体および/またはその/それらのRNAスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質の使用に関する。診断することができる癌形態は、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、結腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、皮膚癌、肉腫、基底細胞癌腫および膵臓癌から成る群より選択することができる。本明細書において述べない他の癌形態も、前記癌形態が本明細書中で定義するとおりのCMVの遺伝子変異体の感染を含むのであれば、診断することができる。この場合、CMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)および/またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以

上のスプライス変異体および／または前記スプライス変異体（単数もしくは複数）から翻訳された1つ以上のタンパク質の使用であって、前記変異体が、配列番号1に含まれる核酸を使用することによって、例えば、PCR法で配列番号1を、前記領域を増幅することにより、使用することによって検出される使用にも関する。

【0060】

本発明に関して、本明細書で述べる場合の前記哺乳動物は、任意の哺乳動物、例えば人間であり得る。

【0061】

1つの態様において、本発明は、潜在CMV IEΔi2を保有する細胞、例えばCD34およびVEGFR2陽性細胞も含めて、哺乳動物から得た生体試料において、本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体（CMV IEΔi2）および／またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のRNAスプライス変異体および／またはその／それらのRNAスプライス変異体から翻訳されたタンパク質の存在を診断および／または検出するための試薬を含むキットにも関する。1つの態様において、前記試薬は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うための試薬を含む。もう1つの態様において、前記試薬は抗体を含む。

10

【0062】

1つの態様において、本発明は、CMV IEΔi2株関連ペプチドに特異的な抗体およびより高レベルのこれらの抗体を検出する方法を用いて、例えば、IEスプライス変異体タンパク質でコーティングされたELISAプレート、膜またはビーズを使用して、患者血清または血漿試料中のCMV IEΔi2株のスプライス変異体IEタンパク質に対して作られたタンパク質に対する抗体を癌のバイオマーカーまたは癌発生のリスクのバイオマーカーとして診断および／または検出するための試薬を含む、診断方法／キットにも関する。

20

【0063】

1つの態様において、本発明は、患者におけるCMV IEΔi2株から作られたペプチドに対して反応性T細胞を癌のバイオマーカーまたは癌発生のリスクのバイオマーカーとして診断および／または検出するための試薬を含む診断方法／キットにも関する。

【0064】

さらに、CMV IEΔi2株によって感染された細胞は、一般的なヒト癌形態では悪性形質転換細胞を意味する。腫瘍細胞においてより高い存在量で生産される、本明細書中で定義するとおりの新規IE-CMVタンパク質の同定は、この新規CMVタンパク質を標的にする免疫療法および治療的ワクチン接種を可能にし、それによってCMV IEΔi2株感染細胞の効率的排除を可能にする。腫瘍内の幹細胞が、これらのCMVタンパク質と高レベルのMHCクラスIおよびクラスII分子の両方を発現していることを証明し、それによって特異的免疫療法のためのそれらの標的化の実行可能性を立証する。

30

【0065】

癌患者から血漿交換によって濃縮された抗原提示細胞、例えば樹状細胞にベクターでCMV IEΔi2 DNA、RNAをex vivo供給して、細胞内でタンパク質を生産することとなり、または腫瘍から精製タンパク質もしくはエクソン2およびエクソン3への組換えタンパク質を使用して、患者からの自家T細胞に提示することとなる。培養で増殖させた反応性T細胞を養子療法として患者に戻して、癌からの治療を生じさせる。あるいは、樹状細胞ワクチン接種戦略で樹状細胞を患者に逐次注射で戻して、CMV IEΔi2関連ペプチドへのT細胞増殖をin vivoで刺激する。両方の戦略は、癌患者におけるウイルス感染腫瘍細胞および腫瘍幹細胞を死滅させることを目的とする。

40

【0066】

癌患者に移入してウイルス感染腫瘍細胞および腫瘍幹細胞を見つけて死滅させるために使用することを目的としたアポトーシス誘導抗体をはじめとする抗体の生産を誘導するために、CMV IEΔi2株タンパク質を使用する。したがって、1つの態様において、本発明は、本明細書に提示するようなかかる処置方法に関する。

50

【0067】

他の態様では、本明細書に提示するようなCMV IEΔi2遺伝子変異体を使用して、世の中からこのウイルス株をなくすための予防ワクチンを開発することとなる。タンパク質ベースの発現ベクターおよび技術を用いて、予防および治療ワクチンのためのCMV IEΔi2株に対するサブユニットワクチンを生産するために使用される新規CMV IEΔi2 IEタンパク質を発現させる。この新規CMV IEΔi2株に対するDNAワクチンを、該CMV IEΔi2株を標的にする予防および治療ワクチンに使用される新規IEタンパク質の発現のために開発することとなる。したがって、本発明の他の態様において、本発明は、CMV IEΔi2株をコードする、治療または予防ワクチンとして使用するための、ワクチンベクターに関する。他の態様において、本発明は、CMV感染に対する治療または予防ワクチン接種用のワクチンベクターを調製するための、本明細書中で定義するとおりの、CMVの遺伝子変異体(CMV IEΔi2)、もしくは配列番号1の利用、および／またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のRNAスプライス変異体および／またはその／それらのRNAスプライス変異体から翻訳されたタンパク質に関する。一部の態様では、RNA転写産物を使用して、本明細書に開示するような新規CMVタンパク質をCMV IEΔi2のIE領域から発現させて、治療または予防ワクチン接種用のワクチンベクターとして使用することができる。他の態様では、CMV IEΔi2のIE領域から生産されたIEタンパク質を使用して、養子療法のためにT細胞を(ex vivo)刺激することができる。加えて、本明細書に提示する転写産物およびタンパク質は、さらに免疫療法の標的として有用なものであり得、ならびに本明細書中で例示するような予防および治療ワクチンの開発に使用するためのものであり得る。本発明の一部の態様では、粒子を血液から選出することができ、および原発癌または転移性疾患のバイオマーカーとして使用することができる。かかる粒子を腫瘍細胞培養物から単離し、ワクチン接種のために使用することもできる。遺伝子変異体CMV IEΔi2を保有する循環腫瘍細胞を、例えば癌および転移性疾患のバイオマーカーとして、PCRで検出することができる。

【0068】

本発明の他の態様では、人間などの哺乳動物から得た生体試料中の遺伝子変異体CMV IEΔi2および／またはそのCMV IEΔi2から転写された1つ以上のRNAスプライス変異体および／またはその／それらのRNAスプライス変異体から翻訳された1つ以上のタンパク質の存在を検出することにより、ヒト組織もしくは細胞移植(輸血を含む)、幹細胞もしくは臓器移植移植片による、または授乳婦から子供への、CMV IEΔi2株の伝達を回避して、癌のリスクの伝達をなくすことができる。本方法は、CMV IEΔi2器官および血液ドナーと同株を保有するレシピエントとを適合させるために用いることもできる。

【実施例】

【0069】

実験の項
略号

5-LO 5-リポオキシゲナーゼ(lipoxygenase)
BrC 乳癌
CC 結腸癌
CDS コード配列
CK サイトケラチン
CMV サイトメガロウイルス
COX シクロオキシゲナーゼ
CTL 細胞傷害性Tリンパ球
EBV エプスタイン・バーウイルス
FACS フローサイトメトリー
FISH 蛍光in-situハイブリダイゼーション

10

20

30

40

50

GBM	多形膠芽腫	
HCMV	ヒトサイトメガロウイルス	
HCMV-IEA	ヒトサイトメガロウイルス前初期遺伝子抗原	
HD	健常ドナー	
HHV	ヒトヘルペスウイルス	
HLA	ヒト白血球抗原	
HSV	単純ヘルペスウイルス	
IE	前初期遺伝子	
IEΔi2	イントロン2が欠失した最初期遺伝子	
IHC	免疫組織化学	10
IMN	伝染性単核球症	
MB	髄芽腫	
MHC	主要組織適合遺伝子複合体	
MIIE	主要前初期遺伝子	
NB	神経芽腫	
NK	ナチュラルキラー細胞	
NTC	無テンプレート対照	
OvC	卵巣癌	
PBS	リン酸緩衝食塩水	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	20
pp65	ポリペプチド65	
RNA	リボ核酸	
SnRNP	核内低分子リボ核タンパク質	
STAT	シグナル伝達兼転写活性化因子	
UL	ユニークロング	
US	ユニークショート	
VEGFR	血管内皮細胞成長因子	
RT	室温	
【0070】		
方法		30
臨床試料		
本発明者らは、膠芽腫（n=120）、髄芽腫（n=37）、神経芽腫（n=49）、結腸（41）、乳房（69）、前立腺（n=17）、卵巣（25）、子宮頸（40）、膵臓（n=10）の腫瘍についての、ならびに乳癌のリンパ節転移（n=35）および結腸および乳癌の89の脳転移についての固定パラフィン包埋腫瘍検体から400を超える試料を得、CMVタンパク質発現について分析した。本発明者らは、DNA調製および可能な場合はRNA調製のために24名のGBM患者から33の膠芽腫、23の神経芽腫、2の髄芽腫、18の結腸癌、20の乳癌、10の卵巣癌、10の膵臓癌検体および原発性腫瘍細胞培養物の新鮮または凍結腫瘍試料を得た。		
【0071】		40
CMVタンパク質の検出		
免疫組織化学（IHC）		
CMV IE、pp65および後期タンパク質に対する3つの異なるCMV特異的抗体を使用して免疫組織化学で切片をCMVタンパク質について染色した。すべてのパラフィン包埋組織切片を脱ろうし、アルコール系列で再水和し、記載されている（1、3）ような高感度免疫組織化学によって染色した。使用した一次抗体は、CMV-IEAに対する抗体（抗IE1-72およびIE1-86、IgG2a、Chemicon International、米国）、HCMV-LAに対する抗体（IgG2a、Chemicon）、CMV-pp65に対する抗体（IgG1、NovoCastral、米国）、ならびにアイソタイプ対照としての役割を果たす、平滑筋細胞アルファアクチンに対する抗体		
		50

(IgG2a、Biogenex、カリフォルニア州サン・ラモン) およびフォン・ヴィレブランド因子 (IgG1、DakoCytomation、デンマーク) であった。

【0072】

フローサイトメトリー

GBM組織の単個細胞浮遊液用に、アキュターゼ (Accutase) (Sigma-Aldrich) が入っているペトリ皿の中で、滅菌したメスの刃で腫瘍を小片に切断した。腫瘍を15分間、37℃でインキュベートした。この間に、腫瘍を1回インキュベーターから取り出し、ピペットによって解離させた。インキュベーション後、腫瘍をピペティングによってさらに解離させ、50mLチューブでセルストレーナ (75μm) (Falcon、BD Biosciences Pharmingen、スウェーデン国ストックホルム) に移した。2mLシリンジプランジャーを使用して、セルストレーナを通して腫瘍を細分した。PBSを使用してストレーナをすすぎ、その後、8分間、1200rpmで遠心分離した。

10

【0073】

キットPerm 2 (BD Biosciences) を製造業者の指示書に従って使用して、細胞を透過性にした。次の抗体を使用した: CMV-IEA (マウスモノクローナルIgG M0854、Dako Cytomation)、CMV-IEA (マウスモノクローナル11-003 Argene、Parc Technologique)、CMV-IEA (マウスモノクローナルMAB810R (810)、Chemicon、米国カリフォルニア州テメキュラ) およびCMV-pp65 (マウスモノクローナル、Novocastrol)。この細胞をこの一次抗体と共に30分間4℃でインキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、その後、30分間、4℃で二次抗体、FITCまたはPEコンジュゲート型ポリクローナルウサギ抗マウスIgG (Dako Cytomation) と共にインキュベートした。インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定した。CyAn (Beckman Coulter) およびSummit 4.3ソフトウェアを使用して細胞を分析した。

20

【0074】

フローサイトメトリーを使用してCMVタンパク質について膠芽腫腫瘍の初代細胞培養物を分析した。次の市販細胞系をCMVタンパク質について調査した: 脾臓細胞 (ASP C1、Bxcp3、panc1、MiapaCa2、capan2、capan1、patu 8902)、前立腺癌細胞 (LWG、PC3)、結腸癌 (CACO2)、肺癌 (U1810、H23)、乳癌細胞系 (skf3、MCF7、MDA231)。多形膠芽腫を有する患者からの新鮮なGBM腫瘍組織検体 (ストックホルム地域倫理委員会 (Stockholm Regional Ethical Committee) からの倫理許可番号2008/628-31) を小片に切断し、酵素的に (0.5%トリプシン-EDTAを使用) および機械的に解離させて単個細胞浮遊液にした。単離された細胞を、7%ウシ胎仔血清、100U/mL ペニシリンおよび100μg/mL ストレプトマイシンを補足したDMEM/F12 (Invitrogen) のいずれかにおいて増殖させた。血清含有培地中で成長させた細胞をGBM細胞と名づけた。

30

【0075】

VEGF-2およびCD34発現細胞のFACS選別

健常ドナーからのバフフィーコート (倫理許可01/420) を受け取り、一晩、室温で振盪し続けた後、Lymphoprep (Axis-Shield、ノルウェー国オスロ) を製造業者の指示書に従って使用して末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。10分間のRBCバッファー [pH8.0] での溶解によって赤血球を除去した。25~30×10⁶ の精製PBMCを、200μLの各抗体VEGF R2/KDR-FITC (R&D、FAB357F) およびCD34-PE (Biolegend、343506) で希釈し、5mLの最終体積になるまでPBSを添加し、37℃で1時間インキュベートした。細胞を回転沈降させ (5分、1500rpm)、PBSで1回洗浄し、40μmセルストレーナ (BD Falcon) に通した。MoFlo Cytomation計器で

40

50

の選別まで、細胞を氷上で保持した。いずれかの抗体について陽性のまたは二重陽性の細胞を選別後に別々に回収し、DNeasy Blood & Tissue DNA抽出キット (Qiagen) を製造業者の指示書に従って使用して、対照としての非標識細胞と一緒にDNA抽出した。本明細書中で述べるTaqMan PCRにおいてその精製されたDNAを使用してウイルス含有量を検証した。

【0076】

MIE遺伝子のPCRおよびシーケンシング
DNA抽出

QIAGENキット (カリフォルニア州バレンシア) を製造業者の指示書に従って使用することにより、塩析技術により、またはTrizol抽出により、腫瘍組織、腫瘍細胞
10
および血液細胞からDNAを抽出して、同じ試料からDNA、RNAおよびタンパク質を得た。

【0077】

IE遺伝子におけるイントロン2の欠失の検出のためのネステッドPCR

腫瘍組織、腫瘍細胞および血液細胞から抽出したDNA試料を、フォワードおよびリバー
プライマーを使用するネステッドPCRによって、MIE遺伝子のエクソン2および
3 (配列番号5~8; Soderbergら、*「American Society of Microbiology」*、1993年) から増幅した。この方法は広範に使用
されているが、この方法によって、以前に、健常対照において、CMVウイルス血症患者に
20
おいて、または様々な起源の細胞タイプ (線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、癌細胞) を
感染させる多数のCMV株の実験研究において、イントロン2が欠如しているCMV IE
ゲノム変異体が検出されたことはない。

【0078】

社内ネステッドPCRを、本発明者らの研究所において、少し改良したが以前に記載さ
れたように行った (参照: Soderbergら、*「J. Virol」*、1993年、6
7 (6)、3166-3175 (33))。簡単に言うと、おおよそ50~300 ngの
DNAまたはcDNAを第一PCR段階で合計40サイクル、1.25 UのTaqポリメ
ラーゼ (Invitrogen) で増幅した。第二PCR段階で1 μLの第一PCR産物
を使用し、その後、30サイクルの増幅に付した。両方の対照、陽性および陰性試料を記
載のとおり増幅し、最終アンプリコンを1.5% Gel Red染色アガロースゲル上で泳
30
動させた。バンドを切り出し、精製し (Qiagen Gel精製キット)、シーケン
シング (Sequencing Core Facility at Karolinska Institutet) に送った。フリーソフトウェアChromasを使用して
シーケンシング結果を分析し、EMBOSSペアワイズアラインメントでアラインした
。

【0079】

イントロン2欠失変異体 (CMV IEΔi2) の検出のためのTaqMan PCR

全CMV MIE遺伝子をカバーするプライマーを使用することによる一段階PCRを
開発した。簡単に言うと、PCRバッファー (Applied Biosystem) から成るPCR反応混合物中おおよそ70~200 ngのDNAを使用した。増幅サイクル
40
をPCRマシン (Applied Biosystem) で行った。50増幅サイクルは
、50℃で2分間のUNG活性化、95℃で10分間のホットスタート、95℃で10秒
間の変性、60℃で1分間のアニーリングおよび伸長から成った。未感染またはCMV (AD169もしくはVR1814もしくはTB40) 感染MRC-5細胞からDNAおよびRNAを抽出した。OligodT₂₀でのRT-PCRのためにSuperscript III First-Strand Synthesis SystemでcDNAを調整した。Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium、カリフォルニア州ヘイワード) を含有する増幅PCR産物を1.5~2%アガロースゲル上で泳動させ、UV線で可視化した。PCR増幅バンドを切り出し、精製し、自動シーケンシング (ABI 3730 DNAアナライザー) によって分析した。米国
50

国立バイオテクノロジー情報センター (National Centre for Biotechnology Information) BL SAT検索をCMVゲノムの確認に用いた。シーケンシングしたすべてのデータを、アラインメントソフトウェアを使用して参照CMV-IEゲノム (MERLIN) に対してアラインした。

【0080】

Taqman PCRは、Fast 96-Well Block Moduleを備えたApplied Biosystem 7900HT Fast Real-Time PCR Systemをマニュアルに従って用いて、TaqMan (登録商標) Fast Universal PCR Master Mixを使用して行った。温度プロファイルのデフォルト設定を、以下のプライマー/プローブを使用する50サイクルおよび10 μ Lの試料体積と共に使用した：

【0081】

IEcDNA：

配列番号9：フォワード：5' -TGACGAGGGCCCTTCCT-3'、

配列番号10：リバーズ：5' -CCTTGGTACACGGGTGTCT-3'、

配列番号11：プローブ、5' FAM-AAGGTGCCACGGCCCG-NFQMG B-3'

配列番号12：IEDNA：フォワード：5' -GTGACCCATGTGCTTATG ACTCTAT-3'、

配列番号13：リバーズ：5' -CTCAACATAGTCTGTCAGGAACGT-3'、

配列番号14：プローブ、5' FAM-TTGGTACACGGGTGTCTCNFQMG B-3'

【0082】

Taqman PCRの特異性を3つの近縁ヘルペスウイルス、すなわち、HHV-6、HSV-1およびHSV-2で試験した。両方のプライマー/プローブで増幅は認められなかった。各試料を、陰性対照としての試薬対照および無テンプレート対照と共に、三重反復で実行した。DNAについての陽性対照は、AD169感染MRC-5線維芽細胞であり、VR1814感染マクロファージは、cDNA対照としての役割を果たした。陽性および陰性対照が十分に働いた場合にのみ、結果を有効と見なした。場合によっては、PCR産物を1.5% (w/v) 高分解能Gel Red染色 (Sigma) アガロースゲル上で泳動させ、精製し、DNAシーケンシングに送ってアンプリコンをさらに確認した。

【0083】

全IE遺伝子に及ぶIEプライマーおよびMIEプロモータ領域のための2セットのプライマーを利用するシングルおよびネステッドPCR

使用したプライマーを図5に記載する。Applied Biosystem Veriti 96ウェルサーマルサイクラーを使用してPCRを行い、そのPCRプロファイルは、94℃で2分間；94℃で30秒の35サイクル；55℃または60℃（表に示すとおり）、40秒；72℃で50秒間；72℃で7分間の最終伸長および4℃で保持であった。DNAまたはcDNA試料を増幅し、CMV IE遺伝子セグメントの検出のための高感度で高特異的な方法を明らかにした。PCR産物を1.5% Gel Red染色アガロースゲル上で泳動させ、Bio-radゲル・ドキュメンテーション・システムで可視化した。

【0084】

シーケンスキャプチャーPCR

DNA抽出

Omega bio-tekキット (米国ジョージア州) を製造業者の指示書に従って使用することにより3mLの全血からDNAを抽出し、100 μ LのH₂Oで溶出した。

【0085】

シーケンスキャプチャーPCR (Mangiapanら、1996 (34) から改良した方法)

10分間、95℃でDNAを加熱することによってDNAを変性させた。その試料を氷上で10分間冷却して、鎖分離を保った。その後、0.125 pmolの各々のビオチン化された捕捉用プライマーを含有する36.4 μLの3.75M NaClを添加した。

(ネステッドPCRにも使用したものであり、上述のTaqmanプライマーの結合領域外にハイブリダイズする) プライマーの補足後、ビオチンで5'を標識し、HPLC精製した (Cybergene) :

【0086】

配列番号15:MIE II 5'-ビオチン:GAG AAA GAT GGA CC 10
C TGA TAA T (23-mer)

配列番号16:MIE II 3'-ビオチン:CTC GGG GTT CTC GT
T GCA AT (21-mer)

【0087】

60℃の水浴内で3時間、チューブをインキュベートすることにより、プライマーとDNAとをハイブリダイズさせた。2 μLのM-280 Streptavidin Dynabeads (Dynal、ノルウェー国オスロ) を製造業者の指示書に従って洗浄した後、チューブに加え、穏やかに回転させながら室温でさらに2時間インキュベートした。ビオチン標識された捕捉プライマーおよびハイブリダイズしたDNAを伴う磁性ビーズを、Dynal磁石を使用して取り出し、製造業者の指示書に従って洗浄した後、最後に50 μLのTEバッファー (10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA [pH 8]) に再懸濁させた。 20

【0088】

前に説明したTaqman PCRにおけるテンプレートとして3 μLのこのビーズ懸濁液を直接使用した。

【0089】

タンパク質抽出およびウエスタンブロット分析

Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、ホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma) および1mMフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を補足した、放射性免疫沈降アッセイ (RIPA: radioimmunoprecipitation assay) タンパク質抽出バッファー (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、1%Triton X-100および2mM EDTA) で細胞ペレットまたは組織試料を可溶化した。腫瘍組織から、製造業者のプロトコル (Invitrogen) によるDNAおよびRNAのTRIZOL単離後に、タンパク質を抽出した。マイクロBCAタンパク質アッセイキット (Pierce) を使用してタンパク質濃度を定量した。0.1Mのジチオトレイトール (DTT) を含有するNovex Tricine SDS Sample Buffer (Invitrogen) 中で試料を調製し、5分間、沸騰させた。同量 (25 μg/レーン) のタンパク質をNuPAGE (登録商標) Novex (登録商標) 4~12%Bis-Tris Gel (Invitrogen) に負荷し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) によって分離し、トランスブロット装置 (Bio-Rad) でフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜 (Amersham) 上に電氣的に転写した。0.05%Tween 20 (TBST) を補足したTris-HCl緩衝食塩水に溶解した5%脱脂粉乳で45分間、膜をブロックした。次の一次抗体を明記する希釈度で用いて免疫標識を行った: マウスモノクローナル抗前初期抗原 (IEA) (1:1000; Argene) ならびにウサギポリクローナル抗IE72 (1:2000) および抗IE86 (1:1000; 親切にも米国Oregon Health and Science UniversityのJay Nels 50

on教授から提供されたもの)。同等の負荷量のタンパク質を、マウスモノクローナル抗 β -アクトニン(1:3000)での免疫標識によって検証した。3回のTBST洗浄の後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)に結合させた抗マウス(1:3000)または抗ウサギ(1:3000)IgGのいずれかと共に膜をインキュベートした。結合抗体をECL-plusキット(Amersham)によって検出した。

【0090】

蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)

プローブ調製のために、全CMVゲノムを含有するプラスミド(親切にもポートランドのNelson博士によって提供されたもの)を、Nick Translation Kit(Vysis、米国イリノイ州ダウンズ・グローブ)を製造業者の推奨基準に従って使用することにより標識した。スライド調製のために、細胞をコルセミド(Gibco)で処理し、HBSSで洗浄した。細胞ペレットを冷4%KClに再浮遊させ、14~16時間、37℃でインキュベートした。遠心分離によって細胞を回収し、4%KClにまた再浮遊させた。冷固定溶液(3:1メタノール:酢酸)をその細胞浮遊液にゆっくりと添加し、氷上で1時間インキュベートした。固定細胞を洗浄し、固定溶液に再浮遊させ、使用するまで20℃で保管した。20 μ Lの細胞浮遊液をスライド調製に使用した。おおよそ200ngのプローブを、8 μ Lのハイブリダイゼーション混合物[2 μ LのHybri-zol、2 μ LのCot-1 DNA(両方ともInvitrogenからのもの)、および0.5Molの酢酸Na、pH5.2(Sigma Aldrich)中]おおよび30 μ Lのエタノール(95%)に添加し、ドライアイス上で15分間、インキュベートした。遠心分離後、上清を廃棄し、そのペレット(プローブ)に70%エタノールを添加し、再び遠心分離してそのプローブを精製した。プローブを8 μ LのHybridisolおよび2 μ Lの蒸留水に溶解し、スライドに添加し、72℃で8分間変性させ、その後、一晚、37℃でインキュベートした。スライドを2 $\times$ 食塩水・クエン酸ナトリウム(SCC:Saline sodium citrate)中で3分間、70℃で洗浄し、脱水し、その後、Vectashield(Vector、Vectashield)でマウントした。

【0091】

結果

調査したすべての腫瘍検体および調査したすべての転移の90%より多くが、免疫組織化学またはフローサイトメトリー分析により、CMVタンパク質陽性であった(図1A、図1B、表1)。さらに、フローサイトメトリーにより、膠芽腫の21の初代細胞培養物がCMV IE、pp65および後期タンパク質を発現することが明らかになった(図1)。CMVタンパク質陽性細胞の数は、細胞系によって異なり、および同じ細胞系でも試料採取時が異なると異なった(図4、および4~69%の幅がある)。しかし、同じ試料採取時のIE、pp65および後期CMVタンパク質に対する4つの抗体を使用すると陽性細胞数についてかなり一致した結果が得られた(図4に例示)。悪性黒色腫、皮膚癌、肉腫、腎臓癌および膵臓癌の試料は、調査したすべての試料(n=18)に関してCMV陽性であることが判明した。腫瘍細胞における高いタンパク質発現の事実にもかかわらず、本発明者らは、腫瘍組織からの組織検体または細胞溶解産物と繊維芽細胞または内皮細胞とを共培養することによって、髄芽腫、神経芽腫および膠芽腫腫瘍の新鮮腫瘍組織(n=21)から感染性ウイルスを得ることができなかった(図示なし)。上気道感染を有する1名の1歳の男児およびCMV症候群(移植後の潜在CMVの再活性化に起因するCMV感染)を有する2名骨髄移植患者からCMV IE Δ i2変異体を単離した。

【0092】

IEタンパク質は、初期および後期遺伝子の発現の調節に中心的役割を果たすので、本発明者らは、必須ウイルスタンパク質の発現の喪失に起因して非生産性感染をもたらす得る特異的遺伝子変異体が腫瘍内に存在し得るという仮説を立てた。スプライス変異体タンパク質は、溶解感染を受けない細胞において動作することができるので、このシナリオは危険であり得る。本発明者らは、全CMV IE遺伝子領域に及ぶプライマーペア(プロ

モータ領域内の2つのプライマーペア、および図5に記載のIE遺伝子のためのプライマーペア)を設計した。すべてのプライマーセットが予想サイズのPCR産物を増幅し、PCR産物のDNAシーケンシングにより、*in vitro*感染細胞においておよびCMVウイルス血症患者のDNAサンプルにおいてIE DNAが確認された。特異性対照として使用したHSV-1、HSV-2またはHHV-6感染細胞培養物から抽出したDNAからはPCR産物が増幅されなかった。12名のCMVウイルス血症患者(10名の単核球症および2名の移植患者)および*in vitro*感染細胞(AD169、TB40およびVR1814株)のDNAを試験した;1名の単核球症患者は、CMV IEΔi2変異体を有し、他のすべては、CMVの野生型変異体を有した。4つのPCR産物のDNAシーケンシングにより、単核球症患者の試料において正常完全長DNAの存在が確認され、癌患者の60/60(100%)において、および1名の単核球症患者において、イントロン2が欠如している欠失変異体を確認された。

【0093】

本発明者らは、本発明者らが1993年に設計したIE遺伝子のエクソン2およびエクソン3におけるプライマーペアでのネステッドPCRを用いた。このネステッドPCRアッセイは、腫瘍患者の悪性腫瘍(膠芽腫、神経芽腫、結腸、乳、卵巣癌)の検体のDNAの72/84(84%)、細胞培養物の検体のDNA(12/15、80%)および血液の検体のDNA(9/33、27%)から約218塩基対(bp)のより短いPCR産物を増幅した。そのPCR産物のDNAシーケンシングによって、イントロン2がPCR産物中に不在であることが明らかになった(図6~図8および表1)。さらに、患者からの膠芽腫腫瘍の初代培養の12/15は、イントロン2が欠如しているCMV株を保有した。この株をCMV IEΔi2と名づけた。

【0094】

本発明者らは、100名の健常ドナーからの血液細胞から、100名のドナーからの濃縮単球から、12名のCMVウイルス血症患者(単核球症および移植患者)および心筋梗塞と診断された24名の患者(心血管系患者)の血清から、ならびに100の臨床CMV単離物からDNAを調製した。単球を濃縮した健常血液ドナーの15/100(15%)は、CMV CMV IEΔi2についてCMV IEΔi2陽性であった一方で、15%は、野生型を有し、後に、52/100(52%)であることが明らかになり、単球を濃縮していない血液細胞のいずれのDNA試料もCMVについて陽性でなかった。さらに、心血管系患者、および全血から調製した健常対照DNAはいずれも、CMV IEΔi2株を有さなかった。9名のウイルス血症患者のDNAならびにCMV実験室株VR1814、TB40およびAD169に感染した*in vitro*感染細胞からのDNAは、野生型株を有した。

【0095】

その後の分析において、心血管系患者の2/24(8%)、健常対照の20/100(20%)およびウイルス血症患者の1/11(9%)は、CMV IEΔi2株を有した。11名のウイルス血症患者のDNAならびにCMV実験室株VR1814、TB40およびAD169に感染した*in vitro*感染細胞からのDNAは、野生型株を有した。1名の単核球症患者は、CMV IEΔi2株を保有し、この患者は、前立腺癌とも診断された。100/100(100%)臨床分離物は、CMV wtウイルスについて陽性であり、これらのうちの3つ、3/100%は、CMV IEΔi2株も有した。留意すべきこととして、1995年に、本発明者らは、ネステッドPCRを用いて285名の血液CMVドナー(145名は血清陽性で140名は血清陰性)を調査し、彼らのうちの1名しか、イントロン2が欠如しているCMV株を保有しなかった。

【0096】

次に、本発明者らは、cDNAおよびDNA特異的プローブを使用してcDNAを検出するが正常DNA IE変異体を検出しないようなTaqMan PCRアッセイを開発した。エクソン2および3に及ぶcDNAプローブを使用して、腫瘍患者および対照の血液および組織から調製したDNA試料中のcDNAとDNA変異体とを区別した。この方

法は、高特異的であり、*in vitro* 感染細胞からのRNA調製物のcDNAのみを認識するが、同じ感染培養物から調製したDNAを認識しなかった。HSV-1、HSV-2およびHHV-6感染細胞培養物のDNA調製物は、このアッセイにおいて陰性であった。

【0097】

原発性腫瘍組織の30/32 (94%) DNA試料および16/21の原発性膠芽腫細胞培養物検体は、cDNAプローブを使用するTaqman PCRによって陽性であった。重ねて、膠芽腫患者から調製したDNAは、この方法を用いて陰性であったが、3つの*in vitro* 感染細胞培養物 (株AD169、TB40EおよびVR1814) から調製したcDNAは陽性であった。*in vitro* 感染細胞 (株AD169、TB40EおよびVR1814) からのDNA調製物または単核球症を有する7名のウイルス血症患者からのDNA調製物は、cDNAプローブを使用して陰性であった。しかし、前立腺癌と潜在ウイルスの再活性化に関連したCMVの単核球症とを有する1名のウイルス血症患者において、本発明者らは、イントロン2が欠如しているCMV変異体を検出した。

【0098】

その後の分析により、原発性腫瘍組織の81/106 (76.4%) DNA試料および19/14 (79%) 原発性膠芽腫細胞培養検体は、cDNAプローブを使用するTaqman PCRによって陽性であることが明らかになった。*in vitro* 感染細胞 (株AD169、TB40EおよびVR1814) からのcDNA調製物または単核球症を有する7名のウイルス血症患者からのcDNA調製物は、cDNAプローブを使用して陽性であった。3つの*in vitro* 感染細胞培養物 (株AD169、TB40EおよびVR1814) から調製したDNAは、cDNAプローブを使用して陰性であった。

【0099】

CMV IEΔi2変異体の検出の感度および特異性を増すために、本発明者らはシーケンスキャプチャーPCR法を開発した。この方法を用いてCMV IEΔi2 DNAを首尾よく捕捉し、ネステッドPCR法またはTaqMan PCRアッセイによるビオチン化捕捉DNAの増幅に使用した (表1)。

【0100】

【表1】

ドナー	CD34			VGEF2R			CD34 & VGEF2R			PBMC		CD34- & VGEF2R-	
	DNA	cDNA	% of ppp.	DNA	cDNA	% of ppp.	DNA	cDNA	% of ppp.	DNA	cDNA	DNA	cDNA
1	陽性	陽性	0.02	陽性	陽性	0.005	n/a	n/a	n/a	陰性	陰性	n/a	n/a
2	陽性	陽性	0.07	陽性	陽性	0.25	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	陽性	陰性	1.4	陽性	陰性	0.2	陽性	陽性	0.01	陽性	陰性	陰性	陰性
4	陽性	陰性	0.03	陽性	陽性	0.04	陽性	陰性	0.00	陽性	陰性	陽性	陰性
5	陽性	陰性	0.11	陽性	陽性	1.15	陽性	陰性	0.05	陽性	陰性	n/a	n/a
6	陽性	陰性	0.29	陽性	陽性	3.68	陰性	陰性	0.03	陽性	陰性	n/a	n/a

【0101】

表1: テンプレートとして健常ドナーの末梢血単核細胞を選別した蛍光活性化細胞選別 (FACS: fluorescent-activated cell sorting) からのDNAを使用するTaqMan PCR結果の要約。野生型またはIEΔi2いずれかのヒトサイトメガロウイルスは、主として、CD34、VGEF2Rまたは両方を発現する細胞によって保有される。

【0102】

潜在CMVが、骨髄におけるCD34陽性細胞 (これらの幹細胞は造血細胞を生じさせる)、成熟血液細胞および内皮細胞によって保有されることは公知である。したがって、本発明者らは、CD34または血管内皮成長因子2 (VEGFR2: Vascular endothelial growth factor 2、循環内皮細胞について) に対して産生された抗体を使用してフローサイトメトリーまたは磁性ビーズ (MiniMA

CS、Miltenyi Biotec Inc.、カリフォルニア州)により患者または健常保有者の血液試料からこれらの細胞を選別することによって、これらの細胞を選出した。本発明者らは、CMV IEΔi2 DNAが、血液中のCD34陽性細胞およびVEGFR2陽性細胞に存在することを発見した。これは、CMV IEΔi2 DNAが、造血幹細胞または内皮細胞の幹細胞集団中に含有されることを含意する。本発明者らは、膠芽腫のCD133陽性細胞中でもCMV IEΔi2 DNAを同定した。CD133は、膠芽腫および髄芽腫の仮定幹細胞マーカーである。

【0103】

したがって、このシーケンスキャプチャーPCR法ばかりでなく、潜伏感染細胞を選択するこれら2つの方法を用いて、健常保有者および癌患者におけるCMV IEΔi2 DNAの検出を最適化することができる。

10

【0104】

20の原発性膠芽腫、11の膠芽腫細胞培養物、11の神経芽腫、4つの卵巣癌、6つの乳癌および5つの結腸癌腫瘍試料の細胞溶解産物をウエスタンブロットによって調査し、様々なサイズのCMV IEタンパク質を検出した(図13、図14、図15)。膠芽腫患者の腫瘍検体と初代培養物の細胞培養検体の両方において、IE CMVタンパク質に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて様々なサイズのIEタンパク質を検出した。CMV特異的抗体は、腫瘍細胞において次の重量:150、125、86、76、72、55、53、50、40、38、36、30、31、26、25、19、18、14、12、10kDaのIEタンパク質、およびin vitro感染線維芽細胞において125、86、72、55、47、38、18kDaのタンパク質を認識した。タンパク質パターンは、異なる腫瘍タイプ間では異なったが、異なる腫瘍内ではかなり類似しており、また膠芽腫腫瘍の初代細胞培養物間で異なった(図13、図14、図15)。最も一般的なIEタンパク質IE86、IE72およびIE55についての腫瘍試料内での存在量は、腫瘍内で同定された125、53、50、40、38、31、25、18、14、10kDaの他のCMVタンパク質と比較して一般に非常に低かった。これらの結果は、腫瘍細胞がin vitroで野生型CMVに感染させた細胞と比較して異なるサイズのIEタンパク質を生産したことを実証する。最も一般的なIE反応性タンパク質は、腫瘍によって生産される最も一般的なIEタンパク質であるようである約53、50、38および25、19および14および10kDといったより小さいサイズのタンパク質であった。図5において設計し、図18において実証するように、様々なIEプライマーを使用するプライマー伸長に付した膠芽腫初代細胞において観察された新規IE転写産物からこのタンパク質を合成することができる。

20

30

【0105】

全CMVゲノムをプローブとして使用する蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法を開発した。第一継代培養物(n=5)における微量コルセミド処理原発性膠芽腫細胞は、様々な染色体へのウイルスゲノムの組み込みを明示した(17)。ウイルスDNAは、様々な染色体に組み込まれるようであった(本発明者らは、染色体1、3、9、17への組み込みを観察した)。有糸分裂を受けない細胞において、本発明者らは、in vitro感染細胞において観察される往々にしてフクロウの目の形状で中央位置とは対照的に、CMV DNAが腫瘍細胞の細胞核の辺縁に位置することを観察した(図16)。かくて、CMVのcDNAおよびまたはDNA変異体は、染色体に組み込まれ、欠陥ウイルス粒子を生産した。

40

【0106】

これらの観察により、以下のことが実証される:

1) 前初期遺伝子のイントロン2が欠如しているCMVの新規遺伝子変異体(CMV IEΔi2)は、調査した試料の84%で存在する、癌患者におけるCMVの最も一般的な変異体である。この株は、健常ドナーの15%で存在し、ウイルス血症患者の10%で血漿中に存在し、臨床CMV単離物間でのその出現率は3%である。

2) 多数のCMVタンパク質が、腫瘍細胞におけるCMV IEΔi2変異体から生産さ

50

れた。

3) CMV IEΔi2変異体は、ヒトのCD34陽性細胞において検出される。

4) CMV IEΔi2変異体は、ヒトの内皮成長因子-2 (VEGFR2) 陽性細胞において検出される。

5) CMV IEΔi2変異体は、ヒトのCD133陽性細胞において検出される。

6) CMV IEΔi2 DNAは、FISHによって実証されるように、wt感染細胞におけるまたは野生型CMV DNAを保有する健常ドナーにおける中央位置とは対照的に、癌細胞の核の辺縁に位置した。

7) 癌細胞におけるCMV IEΔi2感染は、腫瘍細胞では許容されず、標的細胞へのウイルスRNAおよびタンパク質の伝達を媒介するエキソソーム／微粒子／濃密体と同様の欠陥ウイルス粒子の生産を生じさせる結果となった。

【0107】

参考資料

1.Rahbar A, Stragliotto G, Orrego A, Peredo I, Taher C, Willems J, et al. Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma Multiforme associates with patient survival; –a case-control study. *Herpesviridae*. 2012 Mar 16; 3(1): 3.

2.Ranganathan P, Clark PA, Kuo JS, Salamat MS, Kalejta RF. Significant Association of Multiple Human Cytomegalovirus Genomic Loci with Glioblastoma Multiforme Samples. *J Virol*. 2011 Nov 16.

3.Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res*. 2002 Jun 15; 62(12): 3347–50.

4.Mitchell DA, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2007 Oct 19.

5.Dziurzynski K, Wei J, Qiao W, Hatiboglu MA, Kong LY, Wu A, et al. Glioma-associated cytomegalovirus mediates subversion of the monocyte lineage to a tumor propagating phenotype. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 15; 17(14): 4642–9.

6.Slinger E, Maussang D, Schreiber A, Siderius M, Rahbar A, Fraile-Ramos A, et al. HCMV-encoded chemokine receptor US28 mediates proliferative signaling through the IL-6-STAT3 axis. *Sci Signal*. 2010 Aug 3; 3(133): ra58.

7.Straat K, Liu C, Rahbar A, Zhu Q, Liu L, Wolmer-Solberg N, et al. Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Apr 1; 101 (7): 488–97.

8.Baryawno N, Rahbar A, Wolmer-Solberg N, Taher C, Odeberg J, Darabi A, et al. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J Clin Invest*. 2011 Oct 3; 121 (10): 4043–55.

9.Johnsen JI, Baryawno N, Soderberg-Naucler C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget*. [Research Support, Non-U.S.Gov't], 2011 Dec; 2(12): 1329–38.

10.Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res*. 2011 May; 157(2): 193–203.

11.Geder L, Rapp F. Evidence for nuclear antigens in cytomegalovirus-transformed human cells. *Nature*. 1977 Jan 13; 265(5590): 184–6.

12.Geder L, Sanford EJ, Rohner TJ, Rapp F. Cytomegalovirus and cancer of the prostate: in vitro transformation of human cells. *Cancer Treatment Reports*. 1977; 61 (2): 139–46.

13.Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia*. 2009 Jan; 11(1): 1–9.

10

20

30

40

50

- 14.Cinatl J, Scholz M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW. Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends Mol Med.* 2004 Jan; 10(1): 19–23.
- 15.Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med.* 2006 Mar; 259(3): 219–46.
- 16.Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Crit Rev Immunol.* 2006; 26(3): 231–64.
- 17.Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9; 100(25): 14976–81. 10
- 18.Maussang D, Langemeijer E, Fitzsimons CP, Stigter-van Walsum M, Dijkman R, Borg MK, et al. The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 2009 Apr 1; 69(7): 2861–9.
- 19.Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, et al. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 29; 103(35): 13068–73.
- 20.Bongers G, Maussang D, Muniz LR, Noriega VM, Fraile-Ramos A, Barker N, et al. The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes intestinal neoplasia in transgenic mice. *J Clin Invest.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U. S. Gov't]. 2010 Nov 1; 120(11): 3969–78. 20
- 21.Rahbar A, Stragliotto G, Peredo I, Orrego A, Willems J, Soderberg-Naucler C. Low levels of Human Cytomegalovirus infection in glioblastoma multiforme associates with high patient survival; –a case control study Submitted. 2011.
- 22.Wolmer-Solberg N, Baryawno N, Odeberg J, Fuchs D, Rahbar A, Taher C, et al. Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? Submitted. 2011.
- 23.Powers C, DeFilippis V, Malouli D, Fruh K. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:333–59. 30
- 24.Soderberg-Naucler C, Fish K N, Nelson J A. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell.* 1997; 91 (October 3): 119–26.
- 25.Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15; 100(12): 3154–63.
- 26.Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19; 99(6): 3932–7. 40
- 27.Hooks JJ, Chin MS, Srinivasan K, Morita Y, Hooper LC, Nagineni CN, et al. Human cytomegalovirus induced cyclooxygenase-2 in human retinal pigment epithelial cells augments viral replication through a prostaglandin pathway. *Microbes Infect.* 2006 Jul; 8(8): 2236–44.
- 28.Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998 Jul 27; 83(2): 210–6.
- 29.Qiu H, Straat K, Rahbar A, Wan M, Soderberg-Naucler C, Haeggstrom JZ. Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in 50

vascular smooth muscle cells. J Exp Med. 2008 Jan 21; 205(1): 19–24.

30. Cinatl J, Jr., Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, Driever PH, Kabickova H, et al. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. Cancer Res. 1998 Jan 15; 58(2): 367–72.

31. Awasthi S, Isler JA, Alwine JC. Analysis of splice variants of the immediate-early 1 region of human cytomegalovirus. J Virol. 2004 Aug; 78(15): 8191–200.

32. Taher C, Yaiw K–C, Rahbar A, Mohammad A–A, Assinger A, Khan Z, et al. High Prevalence of a Novel Genetic Variant of Cytomegalovirus in Cancer Patients submitted. 2011.

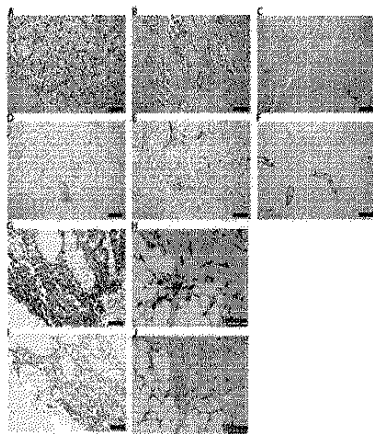
33. Soderberg C, Larsson S, Bergstedt–Lindqvist S, Moller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. J Virol. 1993; 67(6): 3166–75.

34. Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranel J, Lecossier D, van Embden J, et al. Sequence capture–PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. J Clin Microbiol. [Comparative Study Research Support, Non–U.S. Gov't]. 1996 May; 34(5): 1209–15.

10

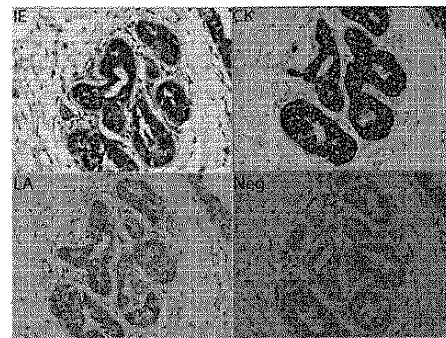
【図 1】

Figure 1



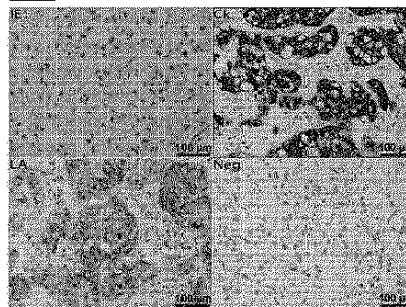
【図 2】

Figure 2



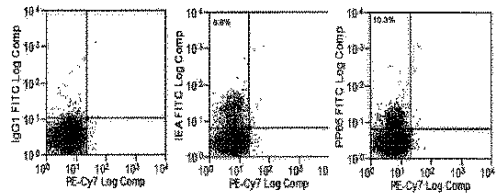
【図 3】

Figure 3



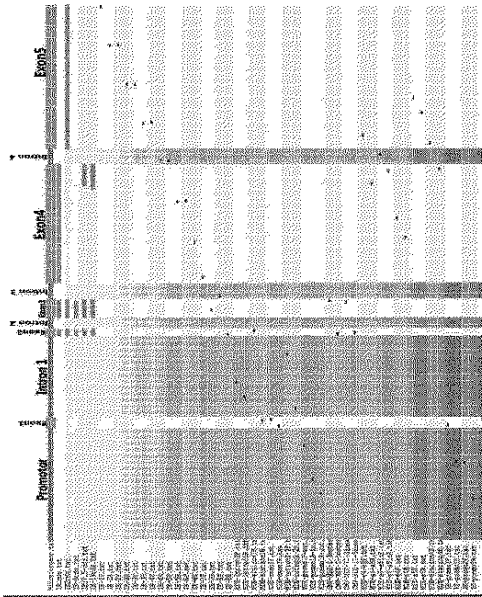
【図 4】

Figure 4



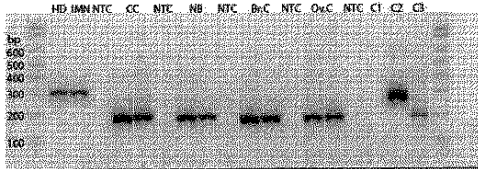
【図 5】

Figure 5



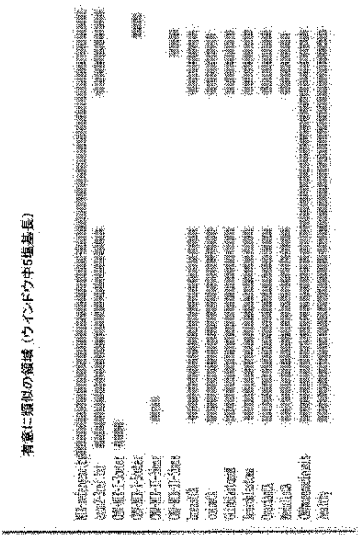
【図 6】

Figure 6

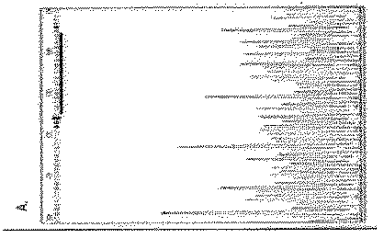


【図 8 A】

Figure 8
A)



【図 7 A】

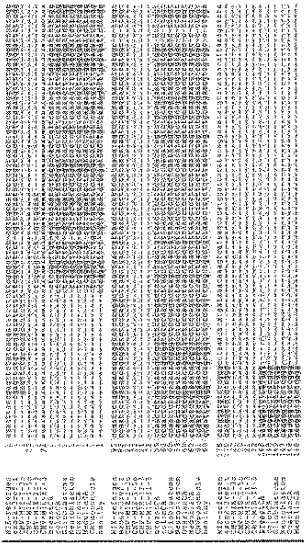


【図 7 B】



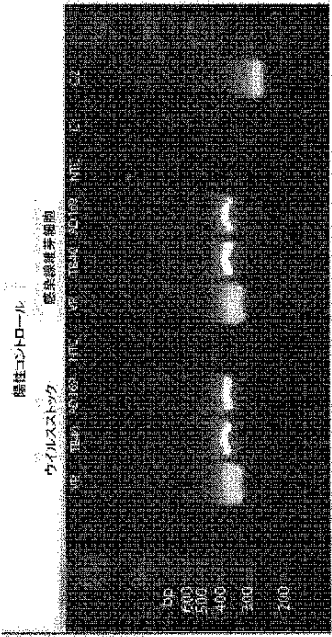
【図 8 B】

Figure 8
B)



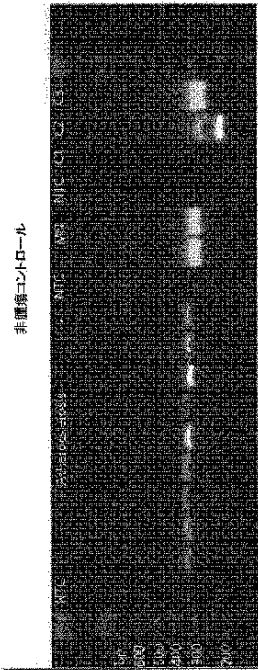
【図 9】

Figure 9



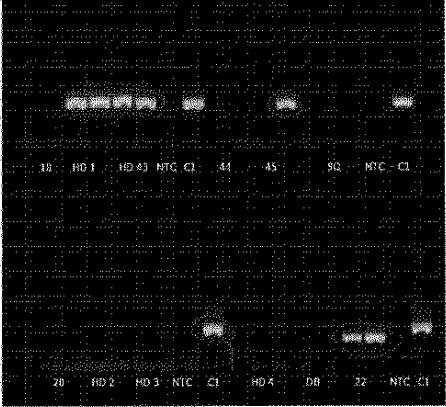
【図 10】

Figure 10



【図 11】

Figure 11



【図 1 2】

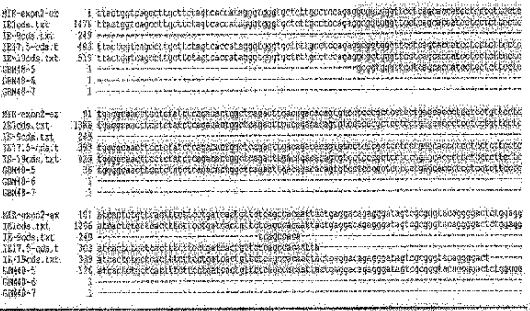
Figure 12

A)

有意に類似の領域 (ウィンドウ中20塩基長)

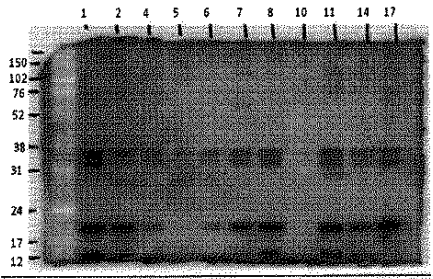


B)



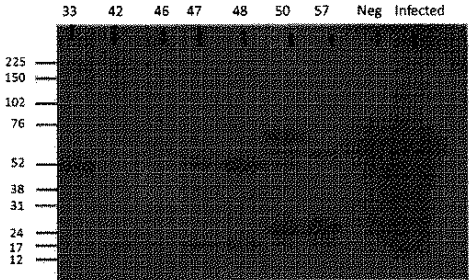
【図 1 3】

Figure 13



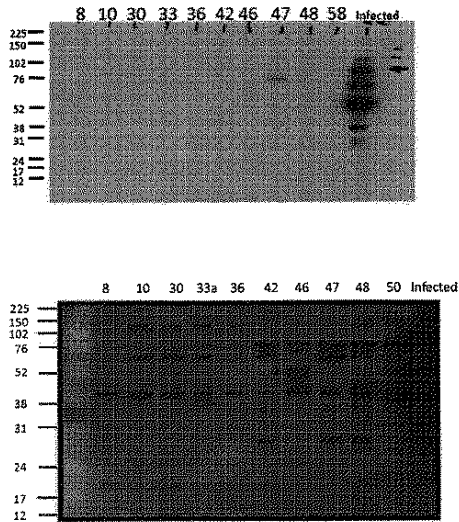
【図 1 4】

Figure 14



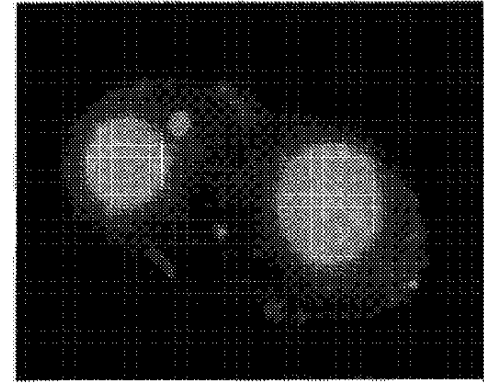
【図 1 5】

Figure 15



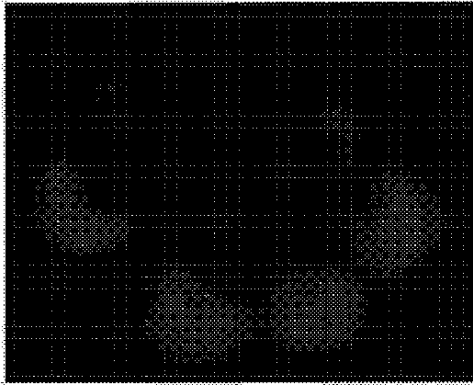
【図 1 6 A】

A)



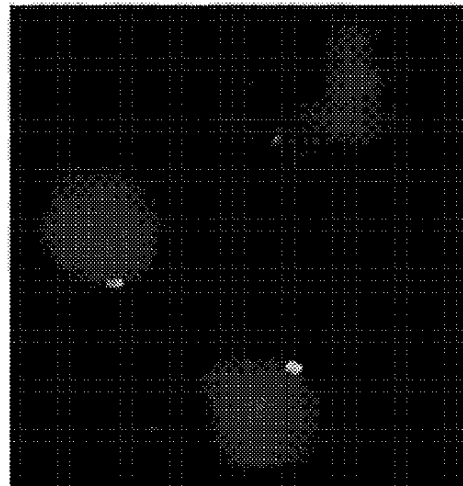
【図 1 6 B】

B)



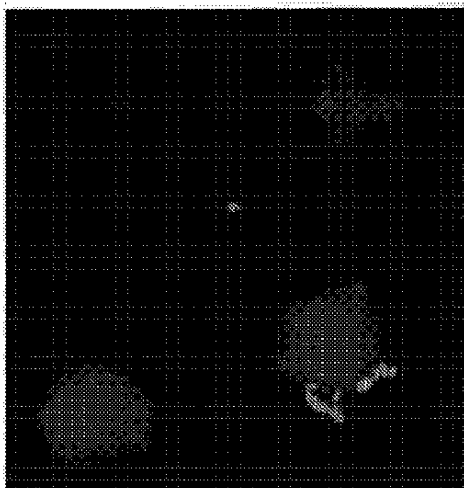
【図 1 6 C】

C)



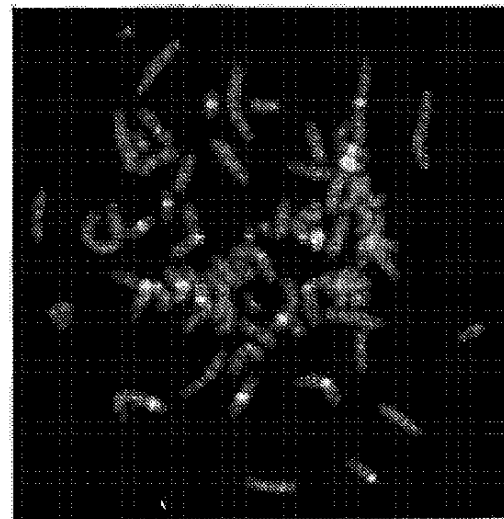
【図 1 6 D】

D)



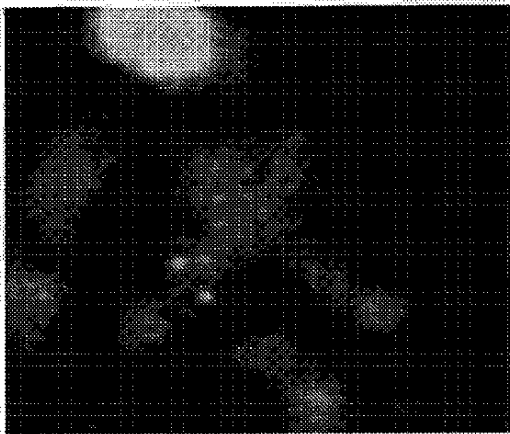
【図 1 7 A) 】

A)

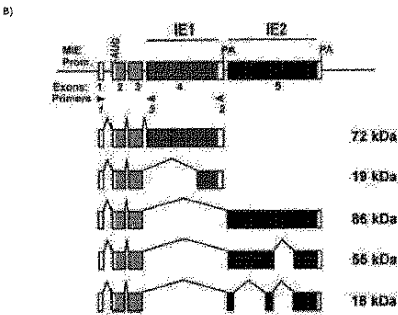


【図 1 7 B）】

B)



【図 1 8 B）】



【図 1 8 A）】

A)

```
Exon 2 Exon 3
IE18- MESSAKKNDGPPDPPDGRSKVPEPTTGAATTFLQIMAKYVNSQLSLGDLFFFLAK
IE17.5 MESSAKKNDGPPDPPDGRSKVPEPTTGAATTFLQIMAKYVNSQLSLGDLFFFLAK
IE19 MESSAKKNDGPPDPPDGRSKVPEPTTGAATTFLQIMAKYVNSQLSLGDLFFFLAK

Exon 4
IE18- ESIAKTEHYTESCHNPTKQVLAEISVYVWLIPLSSUIVAKNSIQESRQGRHSRGA
IE17.5 ESIAKTEHYTESCHNPTKQVLAEISVYVWLIPLSSUIVAKNSIQESRQGRHSRGA
IE19 ESIAKTEHYTESCHNPTKQVLAEISVYVWLIPLSSUIVAKNSIQESRQGRHSRGA

IE18- QERRSDVVEVSEPPVSEIEKVAPEEREDGAREPTASGKGRSHAVYRSGADQ
IE17.5 QERRSDVVEVSEPPVSEIEKVAPEEREDGAREPTASGKGRSHAVYRSGADQ
```

【配列表】

0006148666000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/045	(2006.01)	C 0 7 K 14/045
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

(56)参考文献 特表平11-513889 (JP, A)
 特表2009-510092 (JP, A)
 米国特許出願公開第2008/0138354 (US, A1)
 Journal of Virology, 1989年, 63, 6, 2699-2708
 Viruses, 2009年, 1, 760-779
 Journal of Virology, 2001年, 75, 4, 1870-1878

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 15/00
 C 1 2 N 7/00
 C 1 2 Q 1/00
 G 0 1 N 33/00
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
 (STN)

专利名称(译)	巨细胞病毒 (CMV) 的遗传变异		
公开(公告)号	JP6148666B2	公开(公告)日	2017-06-14
申请号	JP2014505106	申请日	2012-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	NAUCLER CECILIA		
申请(专利权)人(译)	没有克莱尔张柏芝		
当前申请(专利权)人(译)	没有克莱尔张柏芝		
[标]发明人	ノークレールセシリア		
发明人	ノークレール セシリア		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/574 C12N7/00 C07K14/045 C12Q1/68		
CPC分类号	C12N7/00 C07K14/005 C12N2710/16121 C12N2710/16122 C12N2800/24 C12Q1/701 G01N33/5091 G01N33/56994 G01N33/57407 G01N2333/045 G01N2800/50		
FI分类号	C12N15/00.A G01N33/68 G01N33/53.M G01N33/574.A C12N7/00.ZNA C07K14/045 C12Q1/68.A		
审查员(译)	智之大久保		
优先权	61/475926 2011-04-15 US		
其他公开文献	JP2014513524A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及CMV的IE区域中缺少内含子2的CMV (CMVIEΔi2) 的遗传变体。本发明涉及该突变体及其RNA剪接体转录的该遗传变体和RNA剪接变体的各种用途，例如CMV相关癌症疾病的诊断，人体样品的癌症发展或CMV的风险鉴定有传播IEΔi2病毒风险的个体，以及通过针对特异性CMV IE蛋白进行免疫治疗和疫苗接种的预防和治疗。

	CD34			VGEF2R			CD34 & VGEF2R			PBMC		CD34- & VGEF2R-	
ドナー	DNA	cDNA	%of ppv	DNA	cDNA	%of ppv	DNA	cDNA	%of ppv	DNA	cDNA	DNA	cDNA
1	陽性	陽性	0.02	陽性	陽性	0.005	n/a	n/a	n/a	陽性	陽性	n/a	n/a
2	陽性	陽性	0.07	陽性	陽性	0.25	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	陽性	陽性	1.4	陽性	陽性	0.2	陽性	陽性	0.01	陽性	陽性	陽性	陽性
4	陽性	陽性	0.03	陽性	陽性	0.04	陽性	陽性	0.00	陽性	陽性	陽性	陽性
5	陽性	陽性	0.11	陽性	陽性	1.15	陽性	陽性	0.05	陽性	陽性	n/a	n/a
6	陽性	陽性	0.29	陽性	陽性	3.88	陽性	陽性	0.03	陽性	陽性	n/a	n/a