明　細　書

発明の名称 ： 制限増殖型アデノウイルス

技術分野

[0001] 本発明は、新規制限増殖型アデノウイルス及びこれを含む癌細胞の検出用試薬又は癌の診断用試薬に関する。

背景技術

[0002] 現在、癌の診断方法としては、主に(i) MRIなど大型検査機器を用いる手法と、(ii) 血液中の腫瘍マーカーなどを測定する方法が用いられており、簡便かつ患者負担の少ない(ii)の方法に期待が集まっている。特に、癌患者の末梢血中に循環する癌細胞 （循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC））は、全身転移の危険性を高めることや、CTCが認められた患者の予後が著しく低いことなど臨床症状と密接な関係を示すことから、予後の予測因子やサロゲートマーカーとして、CTCを簡便かつ高感度に検出する手法の開発が期待されている。

CTCを検出する手法としては、EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) やCytokeratin-8などの癌関連抗原で検出する方法 (CellSearch systemなど) やRT-PCRなどで検出する方法が用いられている。しかし、これらの癌関連抗原は正常な上皮細胞でも発現しているため偽陽性を検出する可能性が高く、また、PCR法では癌細胞に特徴的な細胞形態を同時に観察できないなど、感度や簡便性、正確性、コストの観点から、新たな手法が求められている。

他方、本発明者は以前、癌細胞特異的に増殖し、かつGFPを発現する制限増殖型アデノウイルス (GFP-expressing Conditionally Replicating Adenovirus: GFP-CRAd) （テロメスキャン（登録商標）、OBP-401又はテロメライシン-GFPと称する）を開発した（特許文献１： WO 2006/036004）。そして、このテロメスキャンを用いて、CTCを簡便に検出する方法を開発した（非特許文献１：Kojima T., et al, J. Clin. Invest., 119; 3172, 2009）。

しかしながら、テロメスキャンは5型アデノウイルスのファイバータンパク

質を有し、標的細胞のCoxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)を介して感染するため、CARを発現していない細胞には感染しない可能性がある。特に、浸潤、転移及び増殖能が高く、悪性度の高い癌細胞はCARの発現が低下することが知られているが（非特許文献２：Okegawa T., et al, Cancer Res., 61: 6592-6600, 2001）、テロメスキャンはこれら悪性度の高い癌細胞を検出できない可能性がある。また、可能性は低いものの、テロメスキャンが正常の血液細胞（例えば白血球）に感染して増殖し、GFPを発現することにより、偽陽性を生じることも想定される。

そのため、CAR陰性を含むほぼ全ての癌細胞を検出し、かつ正常の血液細胞において偽陽性を生じない癌細胞の検出用試薬及び癌の診断用試薬が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：WO 2006/036004

[0004] 非特許文献1：Kojima T., et al, J. Clin. Invest., 119: 3172, 2009

非特許文献2：Okegawa T., et al, Cancer Res., 61: 6592-6600, 2001

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、CAR陰性細胞を含むほぼ全ての癌細胞を検出し、かつ血液細胞において偽陽性を生じない、癌細胞の検出用試薬及び癌の診断用試薬を提供すること、並びにこのような試薬として有用な制限増殖型組換えアデノウイルスを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、テロメスキャンにおける5型アデノウイルスのファイバーを、ほぼ全てのヒト細胞、特に癌細胞全般で高発現しているCD46に結合するアデノウイルスのファイバ

ーに置換することにより、CAR陽性細胞だけでなく、CAR陰性細胞を検出できることを見出した。また、テロメスキャンにマイクロRNA（miRNA）による遺伝子制御系を組み込むことにより、血液細胞において偽陽性を生じないようにすることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[0007] （１）ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含み、かつ、第一のマイクロRNAの標的配列を含むポリヌクレオチド。

（２）第一のマイクロRNAが非癌細胞で発現するものである、上記（１）に記載のポリヌクレオチド。

（３）第一のマイクロRNAが、miR-142、miR-15、miR-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296、miR-125、miR-143、miR-145、miR-199及びlet-7からなる群から選択される少なくとも１つである、上記（１）又は（２）に記載のポリヌクレオチド。

（４）上記（１）～（３）のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む複製カセットがアデノウイルスゲノムのE1領域に組み込まれた組換えアデノウイルス。

（５）レポーター遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含む標識カセットが、アデノウイルスゲノムのE3領域にさらに組み込まれた、上記（４）に記載の組換えアデノウイルス。

（６）標識カセットがさらに第二のマイクロRNAの標的配列を含むものである、上記（５）に記載の組換えアデノウイルス。

（７）細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含む細胞死誘導カセットが、アデノウイルスゲノムのE3領域にさらに組み込まれた、上記（４）に記載の組換えアデノウイルス。

（８）細胞死誘導カセットがさらに第二のマイクロRNAの標的配列を含むものである、上記（７）に記載の組換えアデノウイルス。

（９）第二のマイクロRNAが非癌細胞で発現するものである、上記（６）又は（８）に記載の組換えアデノウイルス。

（１０）第二のマイクロRNAが、miR-142、miR-15、miR-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296、miR-125、miR-143、miR-145、miR-199及びlet-7からなる群から選択される少なくとも１つである、上記（９）に記載の組換えアデノウイルス。

（１１）レポーター遺伝子が、蛍光を発するタンパク質をコードする遺伝子又は酵素反応により発光物質若しくは発色物質を生じる酵素タンパク質をコードする遺伝子である、上記（５）又は（６）に記載の組換えアデノウイルス。

（１２）前記プロモーターが、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター又はサイトメガロウイルスプロモーターである、上記（５）～（１０）のいずれかに記載の組換えアデノウイルス。

（１３）CD46に結合するファイバータンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、上記（４）～（１２）のいずれかに記載の組換えアデノウイルス。

（１４）CD46に結合するファイバータンパク質が、34型又は35型アデノウイルスのファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むものである、上記（１３）に記載の組換えアデノウイルス。

（１５）上記（４）～（１４）のいずれかに記載の組換えアデノウイルスを含む、癌細胞の検出用試薬。

（１６）上記（４）～（１４）のいずれかに記載の組換えアデノウイルスを含む、癌の診断用試薬。

（１７）癌細胞が、被検者から採取された生体試料由来のものである、上記（１５）に記載の試薬。

（１８）生体試料が血液である、上記（１７）に記載の試薬。

（１９）癌細胞が循環腫瘍細胞である、上記（１５）又は（１８）に記載の試薬。

（２０）癌細胞が薬物耐性癌細胞である、上記（１５）及び（１７）～（１

９）のいずれかに記載の試薬。

（２１）癌細胞が癌幹細胞である、上記（１５）及び（１７）～（２０）のいずれかに記載の試薬。

（２２）癌細胞が上皮間葉移行又は間葉上皮移行を起こした癌細胞である、上記（１５）及び（１７）～（２１）のいずれかに記載の試薬。

（２３）上記（１１）に記載の組換えアデノウイルスを癌細胞に接触させ、当該癌細胞が発する蛍光又は色を検出することを特徴とする、癌細胞の検出方法。

（２４）癌細胞が、被検者から採取された生体試料由来のものである、上記（２３）に記載の方法。

（２５）生体試料が血液である、上記（２４）に記載の方法。

（２６）癌細胞が循環腫瘍細胞である、上記（２５）に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明により、正常の血液細胞（白血球等）を検出することなく、CAR陰性の癌細胞を簡便かつ高感度に検出することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の組換えアデノウイルスの構造の一例を示す模式図である。

[図2]フローサイトメトリーによる組換えアデノウイルスの活性測定結果を示す図である。

[図3]血液試料に含まれるH1299細胞の検出結果を示す図である。

[図4]血液試料に含まれるA549細胞の検出結果を示す図である。

[図5]各種癌細胞における本発明の組換えアデノウイルスの活性測定結果を示す図である。

[図6]上皮間葉移行（EMT）を起こした癌細胞の検出結果を示す図である。

[図7]癌幹細胞の検出結果を示す図である。

[図8]血液試料に含まれるH1299細胞及びT24細胞を赤色蛍光タンパク質を用いて検出した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。また、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる2011年8月23日に出願された日本国特許出願（特願2011-181414号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

[0011] １．概要

本発明者が以前開発したテロメスキャン（5型アデノウイルスのE1欠損領域にhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、及びE1B遺伝子がこの順に組み込まれ、かつ、E3欠損領域にサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター及びGFPがこの順に組み込まれた制限増殖型アデノウイルス）においては、(i) CARの発現が低下している悪性度の高い癌細胞を検出できない可能性があること、及び(ii) 正常の血液細胞を偽陽性として検出する可能性があることが課題であった。本発明者は、これらの課題を解決するために鋭意検討を行った結果、テロメスキャンにおける5型アデノウイルスのファイバーを、ほぼ全てのヒト細胞、特に癌細胞全般で高発現しているCD46に結合するアデノウイルスのファイバーに置換することにより、悪性度の高いCAR陰性の癌細胞を検出できることを見出した。また、miRNAであるmiR-142-3pの標的配列を、テロメスキャンの増殖カセット及び標識カセットに組み込むことにより、正常の血液細胞においてウイルスの増殖及び標識タンパク質の発現が抑制され、正常の血液細胞において偽陽性の発生を抑制できることを見出した。

すなわち、本発明の好ましい態様において、本発明の組換えアデノウイルスは、hTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子及びマイクロRNAの標的配列を含む複製カセットがアデノウイルスゲノムのE1領域に組み込まれるとともに、レポーター遺伝子、該遺伝子の発現を制御しうるプロモーター及びマイクロRNAの標的配列を含む標識カセットがアデノウイルスゲノムのE3領域に組み込まれ、かつ、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含む組換えアデノウイルスであり（図１）、

以下の特徴を有する。

(i) CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含むことにより、CAR陰性細胞を含むほぼ全ての細胞に感染することができる。

(ii) hTERTプロモーターを含むことにより、hTERTを発現する癌細胞で特異的に増殖し、また増殖によってレポーター遺伝子の発現が増加し、標識タンパク質や発色物質等の生成量を検出可能なレベルまで増加させることができる。

(iii) miRNAの標的配列を含むことにより、ウイルスが仮にhTERTプロモーター活性を有する正常細胞に感染した場合であっても、miRNAの発現により、当該ウイルスの増殖は抑制され、またレポーター遺伝子の発現は抑制されるため、偽陽性の発生を抑制することができる。特に、血液細胞特異的に発現するmiRNAの標的配列を含むことにより、ウイルスが仮にhTERTプロモーター活性を有する正常血液細胞に感染した場合であっても、当該miRNAの発現により、当該ウイルスの血液細胞での増殖は抑制され、またレポーター遺伝子の発現は抑制されるため、偽陽性の発生を抑制することができる。

本発明はこれらの知見に基づき完成されたものである。

[0012] ２．組換えアデノウイルス

（１）複製カセット

本発明は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）プロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含み、かつマイクロRNAの標的配列を含むポリヌクレオチドに関する。また、本発明は、前記ポリヌクレオチドを含む複製カセットがアデノウイルスゲノムのE1領域に組み込まれた組換えアデノウイルスに関する。

本発明の組換えアデノウイルスは、前記ポリヌクレオチド（又はこれを含む複製カセット）の機能により、癌細胞で特異的に増殖することが可能であり、また目的のmiRNAが発現する細胞においてウイルスの増殖を抑制することができる。例えば、本発明の複製カセットに含まれるmiRNAの標的配列が、血

液細胞で特異的に発現するmiRNAの標的配列である場合、本発明の組換えアデノウイルスは、hTERTを発現する癌細胞で特異的に増殖し、かつ血液細胞で増殖が抑制される。

[0013] ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）プロモーターは、ヒトテロメラーゼの構成成分である逆転写酵素のプロモーターである。ヒトテロメラーゼ活性の上昇には、hTERT mRNAのスプライシングやhTERTタンパク質の翻訳後修飾などが関与しているが、hTERT遺伝子発現の増強、すなわち、hTERTプロモーター活性の上昇が最も重要な分子機構と考えられている。ヒトテロメラーゼは、ヒトの癌の85%以上で活性の上昇が確認されている一方で、ほとんどの正常細胞で活性を示さないため、hTERTプロモーターを使用することにより、癌細胞特異的にその下流の遺伝子を発現させることができる。本発明においては、hTERTプロモーターを、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子の上流に配置することにより、hTERTを発現している癌細胞で特異的にウイルスを増殖させることができる。

[0014] hTERTは、その5’末端の上流1.4kbpの領域において多くの転写因子結合配列が確認されており、その領域がhTERTプロモーターと考えられる。中でも、翻訳開始部位の上流181bpの配列が下流の遺伝子発現に重要なコア領域である。本発明においては、このコア領域を含むものであれば、限定されずに使用することができるが、このコア領域を完全に含む上流378bp程度の配列をhTERTプロモーターとして使用するのが好ましい。この378bp程度の配列は、181bpのコア領域単独の場合と比べて、その遺伝子発現効率が同等であることが確認されている。455bpの長さのhTERTプロモーターの塩基配列を配列番号１に示す。

hTERTプロモーターの塩基配列は、配列番号1に示されるもののほか、配列番号1からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつhTERTプロモーター活性を有するポリヌクレオチドの塩基配列も含まれる。このようなヌクレオチドは、配列番号１で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、又はその断片をプローブとして、

コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

cDNAライブラリーの作製方法については、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

上記ハイブリダイゼーションにおいてストリンジェントな条件としては、たとえば、1×SSC～2×SSC、0.1%～0.5%SDS及び42℃～68℃の条件が挙げられ、より詳細には、60～68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、2×SSC、0.1%SDS中、室温で5～15分の洗浄を4～6回行う条件が挙げられる。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection9.47-9.58)等を参照することができる。

[0015] E1A遺伝子及びE1B遺伝子は、アデノウイルスのE1遺伝子に含まれる遺伝子であるが、このE1遺伝子とは、ウイルスの有するDNA複製に関する初期遺伝子（early:E）と後期遺伝子（late:L）のうちの初期遺伝子の一つをいい、ウイルスゲノムの転写の制御に係わるタンパク質をコードしている。アデノウイルスのE1A遺伝子によりコードされるE1Aタンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群（E1B、E2、E4等）の転写を活性化する。アデノウイルスのE1B遺伝子によりコードされるE1Bタンパク質は、後期遺伝子（L遺伝子）のmRNAが、感染した宿主細胞の細胞質へ蓄積するのを助け、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。E1A遺伝子、E1B遺伝子の塩基配列を、それぞれ配列番号２及び配列番号３に示す。E1A遺伝子及びE1B遺伝子の塩基配列は、それぞれ配列番号２及び配列番号３に示されるもののほか、配列番号２及び配列番号３からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ各々E1A及

びE1B活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。ハイブリダイゼーションの方法及びストリンジェントな条件等については上記hTERTプロモーターと同様である。

[0016] IRES(Internal Ribosome Entry Site)配列は、ピコルナウイルス科に特異的なタンパク質合成開始シグナルであり、18SリボソームRNAの3’末端と相補的な配列があるためリボソーム結合部位としての役割を果たすと考えられている。ピコルナウイルス科のウイルス由来mRNAはこの配列を介して翻訳されることが知られている。IRES配列からの翻訳効率は高く、mRNAの途中からでもキャップ構造非依存的にタンパク質合成が行われる。したがって、本発明のウイルスでは、hTERTプロモーターによりE1A遺伝子とIRES配列の下流にあるE1B遺伝子の両方が独立に翻訳される。IRES配列を使用することにより、hTERTプロモーターの発現制御がE1A遺伝子、E1B遺伝子に独立して及ぶために、E1A遺伝子又はE1B遺伝子のいずれか一方をhTERTプロモーターで制御する場合に比べて、ウイルスの増殖をより厳格にテロメラーゼ活性を有する細胞に限定することができる。また、IRES配列をE1A遺伝子とE1B遺伝子との間に挿入することにより、宿主細胞におけるウイルスの増殖能を高めることができる。IRES配列の塩基配列を配列番号４に示す。IRES配列の塩基配列は、配列番号４に示されるもののほか、配列番号４からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつIRES活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。ハイブリダイゼーションの方法及びストリンジェントな条件等については上記hTERTプロモーターと同様である。

[0017] miRNAは、一般に15～25塩基程度の短い１本鎖RNAと言われており、mRNAに存在する標的配列に結合することにより、様々な遺伝子の翻訳制御を行うと考えられている。従って、例えば、miRNAを発現する細胞に、目的遺伝子と当該miRNAの標的配列を含む組換えアデノウイルスを感染させた場合、その細胞において目的遺伝子の発現は抑制される。miRNAの標的配列の挿入箇所としては、目的遺伝子の発現を抑制することができれば特に制限はないが、目的遺

伝子の非翻訳領域に挿入することが好ましく、目的遺伝子の下流に挿入することがより好ましい。

[0018] 本発明に使用されるmiRNAの標的配列としては、非癌細胞で発現するmiRNAの標的配列が挙げられる。非癌細胞は、悪性腫瘍細胞ではない細胞を意味し、例えば、正常細胞、良性腫瘍細胞などが含まれる。正常細胞には、例えば正常の血液細胞、正常の内皮細胞、正常の繊維芽細胞、正常の幹細胞などが含まれる。一方、循環腫瘍細胞は、悪性腫瘍に由来する細胞であると考えられており、本発明においては、悪性腫瘍細胞に含まれる。

また、本発明に使用されるmiRNAの標的配列としては、血液細胞で特異的に発現するmiRNAの標的配列が挙げられる。本発明において、「血液細胞」は、正常の血液細胞だけでなく癌化した血液細胞を含んでいてもよい。すなわち、本発明において、「血液細胞で特異的に発現するmiRNA」は、正常血液細胞で特異的に発現していてもよく、正常の血液細胞及び癌化した血液細胞の両方に特異的に発現していてもよい。正常の血液細胞及び癌化した血液細胞の両方に特異的に発現する場合においても、循環腫瘍細胞を検出する際に正常血液細胞の偽陽性を減らし、固形癌から遊離した循環腫瘍細胞を正確に検出することができる。本発明において、「血液細胞で特異的に発現するmiRNA」としては、正常の血液細胞で発現するが癌化した血液細胞では発現しないmiRNAがより好ましい。

本発明において、血液細胞としては、限定されるものではないが、白血球（好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球（T細胞及びB細胞）、単球、樹状細胞）、CD34陽性細胞、造血細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、末梢血単核球（PBMC）などが挙げられる。また、癌化した血液細胞としては、白血病細胞、リンパ腫細胞などが挙げられる。本発明において、ある細胞で「特異的に発現する」とは、その細胞のみで発現することを意味するだけではなく、他の細胞に比べてその細胞で発現量が高いことも意味する。例えば、「血液細胞で特異的に発現する」とは、血液細胞のみで発現することを意味するだけではなく、血液細胞以外の細胞に比べて血液細胞で発現量が高いことも意味

する。

血液細胞で特異的に発現しているmiRNAとしては、例えば、miR-142、miR-15、miR-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296などが挙げられるが、好ましくはmiR-142、miR-15及びmiR-16である。

miRNAは一本鎖RNAであるが、prematureの二本鎖RNAのうち目的遺伝子の発現を抑制することができる限り、どちら側の一本鎖RNAの標的配列を使用してもよい。例えば、miR-142にはmiR-142-3p及びmiR-142-5pが存在するが、本発明においてはどちらの標的配列を使用してもよい。すなわち、本発明において、「miR-142」には、miR-142-3p及びmiR-142-5pの両者が含まれ、好ましくはmiR-142-3pである。また同様に、本発明において、「miR-15」には、prematureの二本鎖RNAのうち、センス鎖（「miR-15S」と表記）及びアンチセンス鎖（「miR-15AS」と表記）が含まれる。他のmiRNAについても同様である。

miR-142-3pの遺伝子は、B細胞白血病（aggressive B cell leukemia）において転座が起こる部位に存在しており、造血組織（骨髄、脾臓、胸腺等）で発現しているが、その他の組織では発現していないことが知られている。また、miR-142-3pは、マウス胎児肝臓（胎児の造血組織）において発現が認められ、造血系の分化に関与していると考えられている（Chang-Zheng Chen, et al., Science, 2004）。

本態様においては、hTERTプロモーターの作用により癌細胞における特異的な遺伝子発現が行なわれ、miRNAの作用により血液細胞での遺伝子発現が制御されるため、二段階の選択的な遺伝子発現制御が行なわれる。

[0019] また、別の態様において、本発明に使用されるmiRNAの標的配列としては、癌細胞において発現が抑制されているmiRNAの標的配列が挙げられる。癌細胞において発現が抑制されているmiRNAとしては、例えば、miR-125、miR-143、miR-145、miR-199、let-7などが挙げられる。本態様においては、hTERTプロモーターとmiRNAの作用により癌細胞における特異的な遺伝子発現が二重に制御される。

[0020] miRNAは、当初、線虫、酵母などから発見されたが、現在はヒトやマウスで

数百個発見されている。これらの配列は公知であり、公共のDB（例えばmiRBase sequence database (http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml, http://www.mirbase.org/))にアクセスすることにより、配列情報等を取得することができる。

[0021] miR-142、miRNA-15、miRNA-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296、miR-125、miR-143、miR-145、miR-199、let-7の各配列を以下に示す。

miR-142-3p：5'-UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA（配列番号５）

miR-142-5p：5'-CAUAAAGUAGAAAGCACUACU（配列番号６）

miR-15S　：5'-UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG（配列番号７）

miR-15AS　：5'-CAGGCCAUAUUGUGCUGCCUCA（配列番号８）

miR-16S　：5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG（配列番号９）

miR-16AS　：5'-CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA（配列番号１０）

miR-21S　：5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA（配列番号１１）

miR-21AS　：5'-CAACACCAGUCGAUGGGCUGU（配列番号１２）

miR-126S　：5'-UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG（配列番号１３）

miR-126AS　：5'-CAUUAUUACUUUUGGUACGCG（配列番号１４）

miR-181　：5'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU（配列番号１５）

miR-223S　：5'-UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA（配列番号１６）

miR-223AS　：5'-CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU（配列番号１７）

miR-296-3p：5'-GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC（配列番号１８）

miR-296-5p：5'-AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU（配列番号１９）

miR-125　：5'-UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA（配列番号２０）

miR-143S　：5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC（配列番号２１）

miR-143AS　：5'-GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU（配列番号２２）

miR-145S　：5'-GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU（配列番号２３）

miR-145AS　：5'-GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU（配列番号２４）

miR-199　：5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC（配列番号２５）

let-7　：5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU（配列番号２６）

[0022] 本発明において、miRNAの標的配列１単位はmiRNAの全部又は一部に対して相補的な配列からなり、塩基長は７～３０塩基長であり、好ましくは１９～２５塩基長であり、より好ましくは２１～２３塩基長である。本発明において、miRNAの標的配列１単位とは、あるmiRNAが標的としうる最低限の長さの塩基配列をいう。具体的には、配列番号５～２６のいずれかの塩基配列の相補配列から選択される少なくとも７塩基長のオリゴヌクレオチドをいい、いずれかの箇所において、１又は数個のヌクレオチドが置換、欠失、付加又は削除されていてもよい。

[0023] 本発明のポリヌクレオチド又は組換えアデノウイルスに組み込まれる標的配列全体としては、miRNAと標的配列の相互作用を効果的に発揮させるために、１単位の標的配列を複数含むものであってもよい。組換えアデノウイルスに組み込む標的配列全体の長さは、当該ウイルスゲノムに組み込み可能な長さであればよく、特に限定されない。例えば、１単位の標的配列を１～１０コピー、好ましくは２～６コピー、より好ましくは２コピー又は４コピー含んでいてもよい（John G. Doench, et al., Genes Dev. 2003 17:438-442）。標的配列全体の中に含まれる標的配列１単位の配列と配列との間には、適当な長さのオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。適当な長さのオリゴヌクレオチドの長さは特に限定されないが、標的配列全体として組換えアデノウイルスゲノムに組み込み可能な長さであればよく、例えば０～８塩基長のオリゴヌクレオチドであってもよい。また、複数単位のmiRNAの標的配列を含む場合には、それぞれの単位の標的配列が同じmiRNAに対する標的配列であってもよく、異なるmiRNAに対する標的配列であってもよい。さらに、同じmiRNAに対する標的配列を含む場合においても、それぞれの単位の標的配列の長さや標的配列の塩基配列が異なっていてもよい。

本発明のポリヌクレオチド（又はこれを含む複製カセット）に含まれるmiRNAの標的配列については、当該ポリヌクレオチドが組換えアデノウイルスに組み込まれた場合に、組換えアデノウイルスに存在する他のmiRNAの標的配列と区別するために、「第一のマイクロRNAの標的配列」と称することもできる

。

[0024] 本発明において、miRNAとしてmiR-142-3pを使用する場合、その標的配列としては、例えば以下の配列を含む配列が挙げられる。

(i) miR-142-3pの標的配列２単位を含む配列：

5’-gcggcctccataaagtaggaaacactacacagctccataaagtaggaaacactacattataagcggtac

（配列番号２７、下線はmiR-142-3pの標的配列１単位を示す。）

(ii) miR-142-3pの標的配列４単位を含む配列：

5’-ggcctccataaagtaggaaacactacacagctccataaagtaggaaacactacattaattccataaagtaggaaacactacaccactccataaagtaggaaacactacagtac

（配列番号２８、下線はmiR-142-3pの標的配列１単位を示す。）

[0025] 本発明においては、hTERTプロモーター-E1A遺伝子-IRES配列-E1B遺伝子のコンストラクトの下流にmiRNAの標的配列を配置し、hTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子及びmiRNAの標的配列をこの順に含むポリヌクレオチド（複製カセットという）をアデノウイルスゲノムに組み込むことにより、当該miRNAを発現する細胞において、E1遺伝子の発現を抑制し、ウイルスの増殖を抑制することができる。

本発明において、E1B遺伝子又は後述するレポーター遺伝子の下流にmiRNAの標的配列を組み込むことにより、その上流に存在する遺伝子の発現は抑制される。このメカニズムの詳細は明らかではないが、以下のような機構が考えられる。まず、miRNA-RISC (RNA-induced silencing complex)がmRNA上の標的配列を切断することにより、mRNAのポリAが除去される。これにより、mRNAの安定性が低くなり、mRNAが分解され、遺伝子の発現が抑制されると考えられる。あるいは、miRNA-RISCが、通常のmiRNAと同様にポリA分解酵素をリクルートし、ポリAが分解された結果、mRNAの安定性が低くなり、遺伝子の発現が抑制されるものと考えられる。

なお、従来、IRES配列の下流に挿入された遺伝子の発現（翻訳）に対しては、miRNAによる遺伝子発現の抑制効果が得られなかったことが報告されていたが（Ramesh S. Pillai et al., Science 309, 1573(2005); Geraldine Mathonnet, et al., Science 317, 1764 (2007)）、本発明者が本発明のhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子及びmiRNAの標的配列をこの順に含む組換えアデノウイルスについて遺伝子発現を確認したところ、miRNAによりIRES配列の下流に挿入されたE1B遺伝子の発現は充分に抑制された。このことは、本発明における新たな知見である。

[0026] 本発明の複製カセットに含まれる遺伝子は、通常の遺伝子工学的手法により得ることができる。例えば、遺伝子工学的手法として一般的に用いられているDNA合成装置を用いた核酸合成法を使用することができる。また、鋳型となる遺伝子配列を単離又は合成した後に、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを設計し、PCR装置を用いてその遺伝子配列を増幅するPCR法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)又はクローニングベクターを用いた遺伝子増幅法を用いることができる。上記方法は、Moleculer cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に従い、当業者ならば容易に行うことができる。得られたPCR産物の精製には公知の方法を用いることができる。必要に応じて、慣用の配列決定法により期待された遺伝子が得られていることを確認することができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当なDNAシークエンサー（例えば、ABI PRISM(アプライドバイオシステムズ社)）を利用して配列を解析することも可能である。

本発明において、miRNAの標的配列は、標的配列1単位毎にmiRNAの全部又は一部の塩基配列に対し相補的になるように設計し、合成することにより取得することができる。例えば、miR-142-3pの標的配列は、miR-142-3pの塩基配列に相補的になるようにDNAを合成することにより取得することができる。

[0027] その後、上記のようにして得られた各々の遺伝子を所定の順序となるよう

に連結させる。まず、上記各々の遺伝子を公知の制限酵素等で切断し、切断した当該遺伝子のDNA断片を公知のベクターに公知の方法に従って挿入し、連結する。公知のベクターとしては、例えば、pIRESベクターを使用することができる。pIRESベクターは、脳心筋炎ウイルス（ECMV）のIRES（Internal Ribosome Entry Site）配列が含まれており、1種類のmRNAから2箇所のオープンリーディングフレーム（ORF）を翻訳することが可能なベクターである。pIRESベクターを用いると、マルチクローニングサイトに、順次必要な遺伝子を挿入することにより、「hTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含み、かつマイクロRNAの標的配列を含むポリヌクレオチド」を作製することができる。miRNAの標的配列の挿入箇所は特に制限はないが、hTERTプロモーター-E1A-IRES-E1Bのコンストラクトの下流に挿入することがより好ましい。DNAの連結には、DNAリガーゼを用いることができる。また、必要に応じて、pShuttleなどの公知ベクターに含まれるCMVプロモーターを公知の制限酵素により取り除き、その部位にhTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B-miRNA標的配列から適当な制限酵素を用いて切り出した配列を挿入することができる。hTERTプロモーターの制御下にアデノウイルスの増殖に必要なE1遺伝子を発現させることによって、ウイルスを癌細胞特異的に増殖させることができる。

[0028] （２）標識カセット

また別の態様において、本発明は、アデノウイルスゲノムのE1領域に前記複製カセットが組み込まれ、E3領域にさらに標識カセットが組み込まれた組換えアデノウイルスに関する。標識カセットは、レポーター遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含むものであり、さらにmiRNAの標的配列を含んでいてもよい。

アデノウイルスE3領域には11.6 kDaのADP (adenovirus death protein)が存在し、ADPは細胞障害及びウイルスの拡散を促進する機能を有している。本発明の組換えアデノウイルスは、ADPを含むE3領域のような細胞障害及びウイルスの拡散を促進する機能を有するタンパク質をコードするウイルスゲノム

領域が除去されているため、細胞死のタイミングが遅れ、GFP等の蛍光発現による癌組織の同定が容易となっている。このことは、後述する循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC）を長時間生きたまま検出できる点でも有効である。

[0029] 本発明の組換えアデノウイルスの標識カセットに含まれるレポーター遺伝子としては、限定されるものではないが、例えば、蛍光を発するタンパク質をコードする遺伝子、酵素反応により発光物質若しくは発色物質を生じる酵素タンパク質をコードする遺伝子、抗生物質をコードする遺伝子、タグ融合タンパク質をコードする遺伝子、細胞表面に発現し特定の抗体に結合するタンパク質をコードする遺伝子、膜輸送タンパク質をコードする遺伝子などが挙げられる。蛍光を発するタンパク質（標識タンパク質）としては、例えば、オワンクラゲ（Aequorea victorea)などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)、それを改変したEGFP（Enhanced-humanized GFP)、rsGFP（red-shift GFP)、黄色蛍光タンパク質（yellow fluorescent protein: YFP)、藍色蛍光タンパク質（cyan fluorescent protein: CFP)、 青色蛍光タンパク質（blue fluorescent protein: BFP)、ウミシイタケ（Renilla reniformis）由来のGFPなどが挙げられ、これらをコードする遺伝子を本発明に使用することができる。上記蛍光を発するタンパク質としては、GFP又はEGFPが好ましい。

また、酵素反応により発光物質若しくは発色物質を生じる酵素タンパク質としては、例えば、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。β-ガラクトシダーゼは、酵素反応により、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（X-gal)から、青色の発色物質を生じる。また、ルシフェラーゼは、ルシフェリンと酵素反応し、発光物質を生じる。ルシフェラーゼとしては、ホタルルシフェラーゼやバクテリアルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼなどが知られており、当業者は公知のルシフェラーゼから適宜選択することができる。

[0030] また、上記遺伝子の発現を制御しうるプロモーターとは、目的とする上記

遺伝子の発現に用いるウイルスに対応しうる適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、CMVプロモーター、hTERTプロモーター、SV40後期プロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTR プロモーター、SRαプロモーター、βアクチンプロモーター、PGKプロモーター、EF-1aプロモーター等が挙げられるがこれに限定されるものではない。好ましくはCMVプロモーター又はhTERTプロモーターを用いることができる。

[0031] 標識カセットに組み込まれるmiRNAの標的配列は、複製カセットに組み込まれるmiRNAの標的配列と同じであってもよいし、異なるものであってもよい。

本発明においては、miRNAの標的配列を、レポーター遺伝子の非翻訳領域、好ましくは当該遺伝子の下流に配置することにより、レポーター遺伝子の発現を抑制することができる。すなわち、本発明において、標識カセットは、レポーター遺伝子を制御しうるプロモーター、レポーター遺伝子及びマイクロRNAの標的配列をこの順に含むことが好ましい。標識カセットに組み込まれるmiRNAの標的配列は、複製カセットに含まれるmiRNAの標的配列と区別するために、「第二のマイクロRNAの標的配列」と称する。miRNAに関するその他の説明は上記と同様である。

本発明の標識カセットに含まれる組換え遺伝子の取得方法、精製方法、配列決定方法等については上記複製カセットの場合と同様である。

[0032] （３）細胞死誘導カセット

さらに別の態様において、本発明は、アデノウイルスゲノムのE1領域に前記複製カセットが組み込まれ、E3領域に細胞死誘導カセットが組み込まれた組換えアデノウイルスに関する。細胞死誘導カセットは、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含むものであり、さらにマイクロRNAの標的配列を含んでいてもよい。

[0033] 本発明の組換えアデノウイルスに用いられる細胞死誘導カセットには、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子と該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターが含まれる。従って、例えば本発明の組換えアデノウイルスを癌細胞に感染させると、癌細胞で特異的にウイルスが増殖する結果、細胞死

誘導関連タンパク質の細胞内発現量が高まり、他の正常細胞を傷つけることなく、癌細胞でのみ細胞死を誘導することができる。

細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子とは、特定の細胞の細胞死の誘導に関連するタンパク質をコードする遺伝子をいう。細胞死誘導関連タンパク質としては、例えば、免疫関連タンパク質として、PA28が挙げられる。PA28は細胞内のプロテアソームを活性化するタンパク質であり、過剰発現により免疫反応を惹起するとともに細胞死も誘導するタンパク質である。また、アポトーシス誘導タンパク質として、TRAILが挙げられる。TRAILは、細胞表面の受容体と結合することでアポトーシス細胞死を誘導する分子をいう。

[0034] また、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子としては、癌抑制遺伝子が挙げられる。癌抑制遺伝子は癌細胞の増殖を抑える機能を有する。癌抑制遺伝子としては、例えば従来の遺伝子治療で用いられている以下のものが挙げられる。各遺伝子の塩基配列の配列番号及びGenBank Accession No.を以下に示す。

p53(配列番号２９；Accession No.M14694)：多種の癌

p15(配列番号３０；Accession No. L36844)：多種の癌

p16(配列番号３１；Accession No.L27211)：多種の癌

APC（配列番号３２；Accession No.M74088)：大腸癌、胃癌、すい臓癌

BRCA-1（配列番号３３；Accession No.U14680)：卵巣癌、乳癌

DPC-4（配列番号３４；Accession No.U44378）：大腸癌、すい臓癌

FHIT（配列番号３５；Accession No. NM 112012)：胃癌、肺癌、子宮癌

p73（配列番号３６；Accession No.Y11416）：神経芽細胞種

PATCHED（配列番号３７；Accession No. U59464）：基底細胞癌

Rbｐ110（配列番号３８；Accession No.M15400）：肺癌、骨肉種

DCC（配列番号３９；Accession No.X76132）：大腸癌

NF1（配列番号４０；Accession No.NM 000267）：神経繊維腫症１型

NF2（配列番号４１；Accession No.L11353）：神経繊維腫症２型

WT-1（配列番号４２；Accession No.NM 000378）：ウィルムス腫瘍

[0035] 細胞死誘導カセットに含まれるmiRNAの標的配列は、複製カセットに組み込まれるmiRNAの標的配列と同じであってもよいし、異なるものであってもよい。本発明においては、miRNAの標的配列を、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子の非翻訳領域、好ましくは当該遺伝子の下流に配置することにより、当該細胞死誘導関連タンパク質の発現を抑制することができる。すなわち、本発明において、細胞死誘導カセットは、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子を制御しうるプロモーター、細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子及びマイクロRNAの標的配列をこの順に含むことが好ましい。miRNAに関するその他の説明は上記と同様である。

本発明の細胞死誘導カセットに含まれる組換え遺伝子の取得方法、精製方法、配列決定方法等については上記複製カセットの場合と同様である。

[0036] 細胞死が誘導されたか否かを判断するには、以下の形態学的観察により行うことができる。すなわち、培養容器の底面に付着した細胞に本発明の組換えウイルスを感染させ一定の時間を経ると、倒立顕微鏡下で細胞は円形化し、底面からはがれて光沢を持った細胞として培養液中に浮遊する。この時点で細胞はその生命を維持する機構に破綻を来たしており、細胞死が誘導されたと判断できる。また、テトラゾリウム塩（MTT、XTTなど）を用いた市販の生細胞アッセイキットでも、細胞死を確認することができる。

[0037] （４）CD46に結合するファイバータンパク質

さらに別の態様において、本発明の組換えアデノウイルスは、CD46に結合するアデノウイルスファイバータンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。

現在、一般に使用されているアデノウイルスベクターは、51種類の血清型のヒトアデノウイルスのうち、Subgroup Cに属する５型（若しくは２型）アデノウイルスを基本骨格として作製されている。５型アデノウイルスは、その優れた遺伝子導入特性から広く使用されているが、標的細胞のCoxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)に結合して感染するため、CARの発現の

低い細胞には感染することが困難であるという課題がある。特に、浸潤、転移及び増殖能が高く、悪性度の高い癌細胞はCARの発現が低下しているため、５型アデノウイルスのファイバータンパク質を有するアデノウイルスは、このような悪性度の高い癌細胞に感染できない可能性がある。

[0038] これに対し、CD46は、ヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞で発現しており、悪性度の高い癌細胞においても発現している。従って、CD46に結合するアデノウイルスファイバータンパク質をコードする遺伝子を含む組換えアデノウイルスは、CAR陰性で悪性度の高い癌細胞にも感染することができる。例えば、34型及び35型アデノウイルスは、受容体としてCD46に結合し、細胞に感染する(Marko Marttila, et al., J. Virol. 2005, 79(22):14429-36)。前記の通り、CD46はヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞で発現していることから、34型及び35型アデノウイルスは、CAR陰性細胞を含め、広汎の細胞に対し、感染することが可能である。また、アデノウイルスのファイバーは、ノブ領域、シャフト領域及びテイル領域からなり、アデノウイルスはファイバーノブ領域が受容体に結合することにより細胞に感染することから、ファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を5型アデノウイルス由来のものから34型又は35型アデノウイルス由来のものに置換することにより、当該ウイルスはCD46を介してCAR陰性細胞に感染することができる。

[0039] 本発明の組換えアデノウイルスは、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含むことにより、赤血球を除くほぼ全ての感染することができるため、浸潤、転移及び増殖能が高く、悪性度の高いCAR陰性の癌細胞に感染することが可能である。本発明において、「CAR陰性」細胞とは、CARの発現が低い細胞又は全く発現していない細胞を意味する。

[0040] 現在、ヒトアデノウイルスは57種類の血清型が同定されており、それらはA～F群の6つのグループに分類されている。そのなかで、B群に属するアデノウイルスは、CD46に結合することが報告されている。B群に属するアデノウイルスとしては、34型及び35型アデノウイルスのほか、例えば、3型、7型、11型

、16型、21型、50型のアデノウイルスが挙げられる。

本発明のCD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質としては、B群に属するアデノウイルスのファイバータンパクが好ましく、3型、7型、34型、35型、11型、16型、21型及び50型アデノウイルスのファイバータンパクがより好ましく、34型及び35型アデノウイルスのファイバータンパクがさらに好ましい

34型、35型、3型、7型、11型、16型、21型又は50型アデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子の塩基配列は、それぞれ、NCBI (The National Center for Biotechnology Information) のGenBankなど公知の遺伝子情報データベースから入手することができる。また、本発明において、34型、35型、3型、7型、11型、16型、21型又は50型アデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、上記データベースから入手した各遺伝子の塩基配列のほか、当該塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつCD46への結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。

CD46への結合活性は、当該塩基配列を含むDNAを有する組換えアデノウイルスのCD46発現細胞への感染性を測定することにより、評価することができる。組換えアデノウイルスの感染性の測定は、例えばCD46発現細胞に感染したウイルスが発現するGFPを蛍光顕微鏡やフローサイトメトリー等で検出するなど、公知の方法を用いて行うことができる。ハイブリダイゼーションの方法及びストリンジェントな条件等については上記と同様である。

[0041] 本発明の組換えアデノウイルスは、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質の全部又は一部の領域を含むものであってもよく、当該ファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域がCD46に結合するものであればよい。すなわち、本発明において、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質は、B群に属するアデノウイルスのファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むものであればよく、34型、35型、3型、7型、11型、16型、21型及び50型からなる群から選択される型のアデ

ノウイルスのファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むものがより好ましく、34型又は35型アデノウイルスのファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むことがさらに好ましい。また、本発明の技術的思想は、CD46に結合するものであれば、ファイバータンパク質に限定されず、CD46に結合可能な様々なタンパク質やCD46に結合可能なモチーフを有するタンパク質にまで及ぶ。

[0042] また、本発明において、CD46に結合するファイバータンパク質は、B群に属するアデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域からなる領域を含むものであってもよく、34型、35型、3型、7型、11型、16型、21型及び50型からなる群から選択される型のアデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域からなる領域を含むものがより好ましく、34型又は35型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域からなる領域を含むことがさらに好ましい。

[0043] 本発明において、CD46に結合するファイバータンパク質は、B群に属するアデノウイルスのファイバータンパク質のファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むものであれば、前記型以外の型（例えば2型、5型）のアデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーシャフト領域又はファイバーテイル領域を含むものであってもよい。

このようなファイバータンパク質としては、例えば、34型、35型、3型、7型、11型、16型、21型及び50型からなる群から選択される型のアデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域並びに5型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーテイル領域からなる領域を含むファイバータンパク質が挙げられるが、これに限定されない。

[0044] 34型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域をコードする遺伝子、ファイバーシャフト領域をコードする遺伝子、並びにファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域からなる領域をコードする遺伝子

の塩基配列を、それぞれ配列番号４７、４８及び４９で示す。

また、34型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域並びに5型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーテイル領域からなる領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号５０で示す。本発明において、前記遺伝子の塩基配列には、配列番号５０で示される塩基配列のほか、当該塩基配列からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつCD46への結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。CD46への結合活性の評価方法、ハイブリダイゼーションの方法及びストリンジェントな条件等については上記と同様である。

[0045] 本発明の組換えアデノウイルスは、複製カセット、標識カセット及び／又は細胞死誘導カセットを含むポリヌクレオチドを、適当な制限酵素を用いて切り出し、適当なウイルス発現ベクターに挿入することにより作製することができる。ウイルス発現ベクターとしては、アデノウイルスベクターが好ましく、５型アデノウイルスベクターがより好ましく、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質（例えば34型又は35型アデノウイルスのファイバータンパク質）をコードする遺伝子を含む５型アデノウイルスベクターが特に好ましい。

なお、後記する実施例２で示すように、複製カセットの下流にmiRNA標的配列を挿入した場合及び標識カセットの下流にmiRNA標的配列を挿入した場合のそれぞれにおいて血液細胞におけるGFPの発現は充分に抑制されるが、複製カセットの下流及び標識カセットの下流の両方に同時に挿入した場合には血液細胞におけるGFPの発現が予期しないほどに著しく抑制された。このことは、本発明における新たな知見である。

[0046] 本発明において、組換えアデノウイルスは、例えば以下の方法により取得することができる。

まず、pHMCMV5（Mizuguchi H. et al., Human Gene Therapy, 10; 2013-2017, 1999）を制限酵素処理してmiRNAの標的配列を挿入し、miRNAの標的配列

を有するベクターを作製する。次に、hTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B のコンストラクトを含むpSh-hAIB（WO 2006/036004）を制限酵素処理し、得られたhTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B のコンストラクトを含む断片を、上記miRNAの標的配列を有するベクターに挿入し、hTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B-miRNA標的配列を含むベクターを得る。他方、pHMCMVGFP-1（EGFP遺伝子が挿入されたpHMCMV5）を制限酵素処理し、CMVプロモーター及びEGFP遺伝子を含む断片を取得し、この断片を、上記miRNAの標的配列を有するベクターに挿入し、CMV-EGFP-miRNA標的配列のコンストラクトを含むベクターを得る。そして、hTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B-miRNA標的配列を含むベクターとCMV-EGFP-miRNA標的配列を含むベクターをそれぞれ制限酵素処理し、ライゲーションすることにより、アデノウイルスゲノムのE1欠損領域にhTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B-miRNA標的配列が組み込まれ、かつE3欠損領域にCMV-EGFP-miRNA標的配列が組み込まれたベクターを得ることができる。また、コンストラクトを含むDNA断片を挿入するベクターとして、CD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含むベクターを使用することにより、アデノウイルスゲノムのE1欠損領域にhTERTプロモーター-E1A-IRES-E1B-miRNA標的配列が組み込まれるとともに、E3欠損領域にCMV-EGFP-miRNA標的配列が組み込まれ、かつCD46に結合するアデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含むベクターを得ることができる。そして、このベクターを公知の制限酵素で線状化した後、293細胞等の培養細胞にトランスフェクションすることで、感染性のある組換えアデノウイルスを作製することができる。なお、当業者であれば、上記製造方法をわずかに改変することで、本発明に係る全てのウイルスを容易に作製することができる。

[0047] ３．癌細胞の検出用試薬又は癌の診断用試薬

上記の通り、本発明の組換えアデノウイルスは、以下の特徴を有する。

(i)赤血球を除くほぼ全ての細胞に感染し、悪性度の高いCAR陰性の癌細胞にも感染することが可能であり、

(ii) hTERTを発現する癌細胞で特異的に増殖し、また増殖によってレポータ

一遺伝子の発現量を増加させ、標識タンパク質や発色物質等の生成量を検出可能なレベルまで増加させることができ、

(iii)仮にhTERTプロモーター活性を有する正常細胞に感染した場合であっても、miRNAの発現により、当該ウイルスの増殖は抑制され、またレポーター遺伝子の発現は抑制されるため、偽陽性の発生を抑制することができる。特に、血液細胞特異的に発現するmiRNAの標的配列を含むことにより、ウイルスが仮にhTERTプロモーター活性を有する正常血液細胞に感染した場合であっても、当該miRNAの発現により、当該ウイルスの血液細胞での増殖は抑制され、またレポーター遺伝子の発現は抑制されるため、偽陽性の発生を抑制することができる。

従って、本発明の組換えアデノウイルスは、癌細胞の検出用試薬又は癌の診断用試薬として使用することができる。特に、本発明の組換えウイルスは、上記のような特徴を有するため、血中に存在する循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC））の検出に極めて有効である。

[0048] ところで、2004年にNew England Journal of Medicine (Cristofanilli M. et al., The New EnglandJournal of Medicine, 2004, 781-791) に血液中に存在する癌細胞であるCTCが術後乳癌患者の予後因子になるということが報告されて以降、欧米では既に多くの臨床試験でCTCがバイオマーカーとして測定され、特に乳癌、前立腺癌及び皮膚癌ではCTCがその予後を決定する独立した因子であることが証明されている。また、欧州では、前立腺癌のAjuvant Settingによる臨床試験（SUCCESS）において、計数されたCTCの個数がInclusion Criteriaに入れられ、1個以上検出された患者のみが組み入れられることになっている。この試験は2000例以上が組み入れられる大規模臨床試験であり、その結果が注目されている。また、CTCの増減そのものがClinical Endpointの一つになっている臨床試験（MDV3100）も存在する。

[0049] 近年では米国のFDAから分子標的抗癌剤の許認可に関するガイドラインが出され、癌の診断におけるCTC検査の重要性が一層高まっている。FDAから出されたガイドラインには、分子標的抗癌剤を選択する際に、腫瘍における分子

標的の遺伝子変化などを検査する必要があることが規定されている。このガイドラインを従来の技術で達成しようとすれば、外科的に患者の腫瘍組織から生検（Biopsy）を行なって遺伝子検査を行なう必要が生じ、患者に非常に強い負担を強いることとなる。これを解決するために、血液中から採取したCTCについて遺伝子検査を行なうことが検討されており、従来の「Biopsy」に対して「Liquid Biopsy」と呼ばれている。これが達成されれば、血液を採取するだけで腫瘍組織の遺伝子検査を行なうことができ、患者への負担が大幅に軽減されるので、CTC検査は非常に有用性の高い検査技術であるとして臨床現場において高く注目されている。

[0050] 現在、CTC検出機器でFDAの承認を受けているのはVeridex社のCellSearch Systemのみであり、臨床試験で用いられているCTC検出方法のほとんどは、CellSearch Systemによるものである。CellSearch Systemは、癌細胞をEpCAM抗体及びCytokeratin抗体で検出することを基本技術とする。

しかしながら、CTC検出技術は、血液細胞10億個の中から数個～数十個の細胞を検出する方法であるため、感度及び精度を向上させることが極めて困難であり、CellSearch Systemを利用したCTC検出方法にもいくつかの課題が指摘されている。例えば、CellSearch SystemによるCTC検査で陰性の癌細胞が別の検査で陽性として検出されたり、癌種により感度や精度に大きな差があることなどが指摘されている（Allard W.J. et al., Clinical Cancer Research, 2004, 6897-6904）。また、CellSearch Systemは、臨床現場において肺癌のCTC検出率が低いことも課題として挙げられている（同）。

また、CellSearch Systemは、上皮間葉移行（EMT：Epithelial-Mesenchymal Transition）を起こした癌細胞でEpCAMを含む細胞表面抗原の発現が低下するので、CTC検出率が低下することも課題として挙げられている（Anieta M. et.al., J Natl Cancer Inst, 101, 2009, 61-66、Janice Lu et.al., Int J Cancer, 126(3), 2010, 669-683）。

さらに、上記「Liquid Biopsy」を行なうには、CTCを濃縮しPhenotypingやGenotypingを行なう工程が必要となるため、単にCTCの数を計数するよりも更

に高い感度及び高い精度のCTC検出技術が要求される。

これに対し、本発明の組換えアデノウイルスは、上記(i)～(iii)の特徴を有するため、血液中のCTCを、白血球等の正常血液細胞を検出することなく、簡便、高感度かつ高精度に検出することが可能である。さらに、本発明の試薬は、CTCを生きたまま検出できることから、CTCの細胞表面上に存在する表面抗原等を解析することで、検出されたCTCがどの臓器由来のものであるか等を明らかにすることができる。従って、本発明の組換えアデノウイルスは、CTCの検出及び癌の診断に有用である。

[0051] また、本発明の組換えアデノウイルス又は癌細胞の検出用試薬を用いることにより、EMT又は間葉上皮移行（MET：Mesenchymal-Epithelial Transition）を起こした癌細胞を検出することができる。EMTは、癌細胞が上皮としての特性を失い、周辺組織に移動しやすい間葉系細胞としての特徴を獲得する現象であり、癌細胞の浸潤や転移にも関与している。他方、間葉上皮移行（MET）は、間葉化した細胞が上皮としての特徴を獲得する現象をいう。上記の通り、CellSerch Systemなどの公知の手法では、EMTを起こした癌細胞を検出することが困難であるのに対し、本発明ではEMT又はMETを起こした癌細胞を検出することができるため、本発明の組換えアデノウイルスは、癌細胞の検出及び癌の診断に有用である。

さらに、本発明の組換えアデノウイルスを用いることにより、薬物耐性癌細胞を検出することができる。本発明において薬物とは、癌の化学療法に使用される薬物を意味する。そのような薬物としては、例えば、アドリアマイシン、カルボプラチン、シスプラチン、５－フルオロウラシル、マイトマイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、メトトレキセート、パクリタキセル、ドセタキセル及びアクチノマイシンＤなどが挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の組換えウイルスを用いることにより、癌幹細胞（cancer stem cells）を検出することができる。本発明において、癌幹細胞は、癌細胞の起源となる細胞（幹細胞）をいう。癌幹細胞には薬物耐性を有するものも含まれる。

[0052] 本発明において検出又は診断の対象となる癌又は腫瘍の種類は、限定されるものではなく、あらゆる種類の癌の細胞を用いることができる。例えば、固形癌又は血液腫瘍が挙げられ、具体的には、脳腫瘍、頚癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、膵癌、胃癌、小腸の癌、十二指腸癌、大腸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、甲状腺癌、胆嚢癌、咽頭癌、肉腫、メラノーマ、白血病、リンパ腫及び多発性骨髄腫（MM）が挙げられる。ヒトの組織由来の癌細胞のほとんど（85%以上）はテロメラーゼ活性の上昇を示しており、本発明はそのようなテロメラーゼを発現する癌細胞を全般的に検出することが可能である。

また、本発明において、CTCは、血液中に存在する癌細胞であれば限定されず、固形癌から遊離した癌細胞だけではなく、上記白血病細胞やリンパ腫細胞などの血液腫瘍細胞も含まれる。ただし、CTCが血液腫瘍細胞の場合、本発明のアデノウイルスに含まれるmiRNA標的配列としては、正常血液細胞特異的に発現するmiRNAの標的配列であることが好ましい。

[0053] 本発明の試薬は、組換えアデノウイルスを、例えば凍結などの方法により扱いやすくした後、そのまま若しくは賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤等公知の薬学的に許容される担体、公知の添加剤（緩衝剤、等張化剤、キレート剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等が含まれる）などと混合することにより、製造することができる。

[0054] ４．癌細胞の検出方法又は癌の診断方法

さらに、本発明の組換えアデノウイルスを癌細胞に接触させ、当該癌細胞が発する蛍光又は色を検出することにより、癌細胞の検出又は癌の診断をすることができる。

本発明において、「接触」とは、癌細胞と本発明の組換えアデノウイルスとを同一の反応系に存在させることを意味し、例えば、癌細胞を含む試料中に本発明の組換えアデノウイルスを添加すること、癌細胞と当該組換えアデノウイルスとを混合すること、組換えアデノウイルスの存在下で癌細胞を培養することなどが挙げられ、当該組換えアデノウイルスを癌細胞に感染させ

ることが含まれる。また、本発明において、「蛍光又は色」は、レポーター遺伝子から発現したタンパク質によって生じた光又は色であれば、特に限定されるものではなく、例えば、GFPなどの標識タンパク質が発する蛍光、ルシフェラーゼによる酵素反応により生成された発光物質が発する光、β-ガラクトシダーゼとX-galとの酵素反応により生成された発色物質が発する青色などが挙げられる。

癌細胞の検出方法又は癌の診断方法に使用する癌細胞は、被験者から採取された生体試料由来のものであってもよい。被験者から採取された生体試料は、癌細胞を含む可能性がある組織であれば限定されるものではなく、例えば、血液、腫瘍組織、リンパ組織等が挙げられる。また、癌細胞は、血液中の循環腫瘍細胞（CTC）であってもよく、CTCについての説明は上記と同様である。

[0055] 本発明の試薬を用いた癌細胞の検出及び癌の診断は、例えば以下の通り行うことができる。

被験者から採取された生体試料が血液の場合、その血液試料から赤血球溶血試薬を添加して赤血球を除き、その他の細胞浮遊液に一定の比率（0.01～1000 MOI(multiplicity of infection)、好ましくは0.1～100 MOI、より好ましくは1～10 MOI）の本発明の試薬を試験管内で混合する。室温または37℃で一定の時間（例えば4～96時間、好ましくは12～72時間、より好ましくは18～36時間）放置または旋廻培養し、癌細胞へのウイルスの感染及び増殖を促す。その細胞分画におけるGFP蛍光発現をフローサイトメトリーにて定量的に解析する。または、蛍光顕微鏡にてGFP発現細胞を観察して形態的に解析する。このシステムを用いて、末梢血中に存在するCTCを高感度に検出することが可能となる。この方法は、末梢血中にごく微量にしか存在しないCTCを検出するために用いることができる。

CTCの検出にフローサイトメトリーを用いる場合、例えば以下の基準によりGFPの陽性又は陰性を判定し、CTCを検出することができる。

まず、ウイルスを感染させていないサンプル中の細胞群を解析し、バック

グラウンドの蛍光値を得る。その蛍光最大値に対して閾値を設定し、次に本発明のウイルスを感染させたサンプル中の細胞群を解析し、閾値以上の蛍光値を示すサンプル中の細胞群をGFP陽性と判定する。被験者から採取した血液試料を使用する場合、GFP陽性細胞はCTCとして検出することができる。さらに、GFP陽性細胞(CTC)を濃縮し、PhenotypingやGenotypingを行なうこともできる。

本発明において、被験者としては、例えば、ヒト、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ハムスター、ネコ、イヌ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、サルなどの哺乳動物が挙げられる。

本発明の試薬の使用量は、検出に用いる生体試料の状態及び量、並びに使用する検出方法等に応じて適宜選択される。例えば、血液試料の場合、血液試料1～50 ml、好ましくは3～25 ml、より好ましくは5～15 mlあたり、約0.01～1000 MOI、好ましくは0.1～100 MOI、より好ましくは1～10 MOIの範囲で使用することができる。MOIとは、一定量の培養細胞に一定量のウイルス粒子を感染させる場合のウイルス量（感染単位）と細胞数の比をいい、ウイルスを細胞に感染させる際の指標として用いられる。

[0056] 組換えウイルスを細胞に感染させるには、例えば、以下の方法がある。まず、細胞を適当な培養液が入った培養プレートに播き、炭酸ガス存在下で、37℃で培養する。培養液は、動物細胞培養に一般的に使用されるDMEM、MEM、RPMI-1640などが採用され、必要に応じて血清、抗生物質、ビタミン等を添加することができる。培養した細胞に一定量のウイルス、例えば、0.1～10 MOIを接種することにより感染させる。

ウイルス増殖を確認するには、ウイルス感染細胞を回収し、DNAを抽出し、本発明のウイルスが有する適当な遺伝子を標的とするプライマーを用いてリアルタイムPCRを行うことで定量的に解析することができる。

レポーター遺伝子としてGFP遺伝子を使用する場合、標識された細胞の検出については、ウイルス増殖がみられる細胞は励起光をあてることにより所定の蛍光（例えばGFPの場合は緑色蛍光）を発するため、それにより癌細胞を可

視化することができる。例えば、ウイルス感染細胞を蛍光顕微鏡下に観察すると、細胞でGFP蛍光発現が見られる。またウイルス感染細胞を経時的に観察するには、CCDカメラを用いて、経時的にGFP蛍光発現を観察することができる。

[0057] また、本発明の試薬は、生体内に存在する癌細胞をリアルタイムで検出することも可能である。生体内において細胞をリアルタイムで標識及び検出するには、本発明の組換えアデノウイルスを生体内に投与すればよい。

本発明の試薬はそのまま患部に適用することもできるし、あらゆる公知の方法、例えば、静脈、筋肉、腹腔内又は皮下等への注射、鼻腔、口腔又は肺からの吸入、経口投与、カテーテルなどを用いた血管内投与等により生体（対象となる細胞や臓器）に導入することもできる。好ましくは、筋肉、腹腔等への局部注射、静脈への注射等が例示される。

本発明の試薬を被験者に投与する場合、その投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象、患者の年齢、体重、性別、症状その他の条件により適宜選択されるが、一日投与量として、通常有効成分である本発明ウイルスの量を10^{6}～10^{11}PFU(plaque forming units)程度、好ましくは10^{9}～10^{11}PFU程度とするのがよく、１日１回投与することもでき、数回に分けて投与することもできる。

生体内においてリアルタイムで癌細胞の蛍光を観察することは、体内診断薬に用いるメリットがある。これは、いわゆるナビゲーション手術などに有用である。ナビゲーション手術の詳細については、国際公開公報WO 2006/036004に記載されている。

[0058] さらに、本発明の試薬はバイオマーカーとしてのCTCの検出に有用であることから、本発明の試薬を使用することにより予後の判定をすることができる。

例えば、本発明のウイルスにおいて標識タンパク質としてGFPを使用する場合、まず、任意の癌治療方法（例えば、化学療法、放射線療法、外科手術等）で癌患者を処置する前の患者から採取した生体試料と、処置から一定期間

（例えば１～90日）経過後の時点で採取した生体試料にそれぞれ本発明のウイルスを感染させる。次に、処置前に採取した試料に含まれるGFP陽性細胞と、処置後のある時点で採取した試料に含まれるGFP陽性細胞の数を同一条件で比較する。その結果、処置後のGFP陽性細胞の数が、処置前よりも減少していれば予後が向上したと判定することができる。

[0059] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0060] Ad34 fiber 142-3pTの作製

（１）pHMCMV5-miR-142-3pTの作製

pHMCMV5 (Mizuguchi H. et al., Human Gene Therapy, 10; 2013-2017, 1999) をNotI/KPnI処理したフラグメントを、下記の合成オリゴDNAをアニーリングすることにより作製したダブルストランドオリゴとライゲーションすることによりpHMCMV5-miR-142-3pT(pre)を作製した。

miR-142-3pT-S1：

5´-GGCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACACAGCTCCATAAAGTAGGAAACACTACATTAATTAAGCGGTAC-3´（配列番号４３、下線はmiR-142-3p標的配列）

miR-142-3pT-AS1：

5´-CGCTTAATTAATGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAGCTGTGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA-3´（配列番号４４、下線はmiR-142-3p標的配列）

次に、pHMCMV5-miR-142-3pT(pre)をPacI/KpnI処理したフラグメントを、以下の合成オリゴDNAをアニーリングすることにより作製したダブルストランドオリゴとライゲーションすることにより、miR-142-3p標的配列の4回繰返し配列を有するpHMCMV5-miR-142-3pTを得た。

miR-142-3pT-S2：

5´-TCCATAAAGTAGGAAACACTACAGGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAGTAC-3´（配列番号４５、下線はmiR-142-3p標的配列）

miR-142-3pT-AS2：

5´-TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAGTCCTGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAAT-3´（配列番号４６、下線はmiR-142-3p標的配列）

[0061] （２）E1 shuttle plasmidであるpHM5-hAIB-miR-142-3pTの作製

pSh-hAIB（WO 2006/036004）をI-CeuI/PmeIで消化し、消化産物をアガロースゲルを用いて電気泳動した。約4.5kbp(hAIB cassette)のバンドをゲルから切り出し、GENECLEANII（Q-Biogene社）を用いてDNA断片を精製回収した。精製したDNA断片(hAIB cassette)とpHMCMV5-miR-142-3pTをNheIで消化した後、Klenow Fragmentで処理し、さらにI-CeuIで消化したフラグメントをライゲーションすることによりhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES(internal ribosomal entry site)配列、E1B遺伝子及びmiR-142-3pT標的配列を有するpHM5-hAIB-miR-142-3pTを得た。

[0062] （３）E3 shuttle plasmidであるpHM13CMV-EGFP-miR-142-3pTの作製

pEGFP-N1（Clontech社）をApaI及びNotIで消化し、得られた消化産物をpHMCMV5のApaI/NotIサイトに挿入し、pHMCMVGFP-1を得た。pHMCMVGFP-1をPmeI/HindIIIで消化し、消化産物をアガロースゲルを用いて電気泳動した。約750bp(EGFP)のバンドをゲルから切り出し、GENECLEANIIを用いてDNA断片を精製回収した。精製したDNA断片(EGFP)とpBluescriptII KS+をHincII/HindIIIで消化したフラグメントをライゲーションすることによりpBSKS-EGFPを作製した。pBSKS-EGFPをApaI/XbaIで消化し、消化産物をアガロースゲルを用いて電気泳動した。約750bp(EGFP)のバンドをゲルから切り出し、GENECLEANIIを用いてDNA断片を精製回収した。精製したDNA断片(EGFP)とpHMCMV5-miR-142-3pTをApaI/XbaIで消化したフラグメントをライゲーションすることによりpHMCMV5-EGFP- miR-142-3pTを取得した。pHMCMV5-EGFP- miR-142-3pTをBglIIで消化し、消化産物をアガロースゲルを用いて電気泳動した。約2kbp(CMV-EGFP-miR-142-3pT)のバンドをゲルから切り出し、GENECLEANIIを用いてDNA断片を精製回収した。精製したDNA断片(CMV-EGFP-miR-142-3pT)とpHM13（Mizuguchi et al., Biotechniques, 30; 1112-1116, 2001）をBamHIで消化した後、CIP（Alka

line Phosphatase, Calf Intest）で処理したフラグメントをライゲーションすることによりpHM13CMV-EGFP-miR-142-3pTを得た。

[0063] （４）pAdHM49-hAIB142-3pT-CG142-3pTの作製

pAdHM49 (Mizuguchi et al, J. Controlled Release 110; 202-211, 2005）をI-CeuI/PI-SceI処理して得られたフラグメントと、同じくI-CeuI/PI-SceI処理したpHM5-hAIB-miR-142-3pTをライゲーションすることにより、AdベクターのE1欠損領域にhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子及びmiR-142-3pT標的配列が組み込まれたpAdHM49-hAIB142-3pTを作製した。pAdHM49は、5型アデノウイルスファイバーのファイバーノブ及びファイバーシャフトをコードする遺伝子を含む領域が、34型アデノウイルスファイバーのファイバーノブ及びファイバーシャフトをコードする遺伝子を含む領域に置換された組換えアデノウイルスであり、34型アデノウイルスのファイバータンパク質のファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域からなる領域をコードする遺伝子の塩基配列（配列番号４９）を含むものである。pAdHM49のファイバータンパク質（34型アデノウイルスファイバーのファイバーノブ領域及びファイバーシャフト領域並びに5型アデノウイルスファイバーのファイバーテイル領域）をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号５０で示す。配列番号５０で示される塩基配列において、5型アデノウイルスファイバーのファイバーテイル領域をコードする遺伝子の塩基配列は１～１３２番目の塩基配列であり、34型アデノウイルスファイバーのファイバーシャフト領域をコードする遺伝子の塩基配列は１３３～４０２番目の塩基配列であり、34型アデノウイルスファイバーのファイバーノブ領域をコードする遺伝子の塩基配列は４０３～９７５番目の塩基配列である。すなわち、配列番号５０で示される塩基配列において、5型アデノウイルスファイバー由来の領域の塩基配列は１～１３２番目の塩基配列であり、34型アデノウイルスファイバー由来の領域の塩基配列は１３３～９７５番目の塩基配列である。

次に、pAdHM49-hAIB142-3pTをCsp45Iで消化したフラグメントとpHM13CMV-EGFP-miR-142-3pTをClaIで消化したフラグメントをライゲーションした。これ

により、アデノウイルスベクターのE1欠損領域にhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子及びmiR-142-3pT標的配列が組み込まれ、E3欠損領域にCMVプロモーター、EGFP及びmiR-142-3pT標的配列が組み込まれ、さらに34型アデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を含む、pAdHM49-hAIB142-3pT-CG142-3pTを得た。

[0064] （５）Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)の作製

pAdHM49-hAIB142-3pT-CG142-3pTの中のアデノウイルスゲノム両末端に認識部位が存在する制限酵素PacIで切断することにより線状にし、Lipofectamine 2000（Invitrogen社）を用いて60mm培養ティッシュに播種した293細胞にトランスフェクションした。約2週間後に、組換えアデノウイルスAd34 fiber 142-3pT(E1,E3)を取得した（図１）。

実施例 2

[0065] Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)の活性測定

（１）細胞

CAR陽性細胞として、HeLa（ヒト子宮癌細胞由来）、LN319（ヒト神経膠腫細胞由来）を使用し、CAR陰性細胞としてLNZ308（ヒト神経膠腫細胞由来）、LN444（ヒト神経膠腫細胞由来）、K562（ヒト骨髄性白血病細胞由来）を使用した。K562はmiR-142-3pを発現している。HeLa、LN319、LNZ308、LN444にはDMEM(10%FCS、抗生物質含有)を用い、K562にはRPMI-1640 Medium (10%FCS、抗生物質含有)を用いて、37℃、飽和蒸気圧、5%CO_2存在下で培養した。

[0066] （２）フローサイトメトリーを用いたAd34 fiber 142-3pT(E1,E3)の活性測定

各細胞を24穴プレートに5x10^4 cells/500ul/wellで播種し、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)を10MOIで作用させた。対照として、テロメスキャン（5型アデノウイルスのE1欠損部位にhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列、E1B遺伝子がこの順に組み込まれ、かつ、E3欠損部位にCMVプロモーター、GFPがこの順に組み込まれた制限増殖型アデノウイルス）を使用した。24時間培養後、細胞を回収し、フローサイトメーター MACSQuant (Miltenyi Biotec)を用いてGFP陽性細胞数を測定した。

その結果を図２に示す。本明細書及び図２において、「TelomeScan(Ad5 fiber)」はテロメスキャンを示し、「Ad34 fiber」は、アデノウイルスゲノムのE1欠損部位にhTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子がこの順に組み込まれるとともに、E3欠損部位にCMVプロモーター、GFPがこの順に組み込まれ、かつ34型アデノウイルス由来のファイバータンパク質をコードする遺伝子を含む組換えアデノウイルスを示す。また、「Ad34 fiber 142-3pT(E1)」は、前記Ad34 fiberのE1欠損領域（E1B遺伝子の下流）にさらにmiR-142-3pの標的配列が組み込まれた組換えアデノウイルスを示し、「Ad34 fiber 142-3pT(E3)」は、前記Ad34 fiberのE3欠損領域（GFP遺伝子の下流）にさらにmiR-142-3pの標的配列が組み込まれた組換えアデノウイルスを示す。また、「Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)」は、前記Ad34 fiberのE1及びE3欠損領域（それぞれE1B遺伝子の下流及びGFP遺伝子の下流）にさらにmiR-142-3pの標的配列が組み込まれた組換えアデノウイルスを示す。また、図２以降の図面において、（GFPを含む）とは、各ウイルスゲノムにGFP遺伝子が挿入されていることを示す。

[0067] 活性測定の結果、CAR陰性細胞であるLNZ308、LN444、K562にTelomeScan(Ad5 fiber)を感染させた場合、GFP陽性細胞は検出されなかったのに対し（図２、パネルk、p及びu）、Ad34 fiberを感染させた場合は、GFP陽性細胞が検出された（LNZ308で85.5%陽性、LN444で58.4%陽性、K562で63.7%陽性）（パネルl、q、v）。

この結果から、34型アデノウイルスのファイバータンパク質をコードする遺伝子を有する本発明の組換えアデノウイルスは、CAR陰性細胞を有意に検出できることが示された。

[0068] また、CAR陰性でmiR-142-3pを発現しているK562細胞において、Ad34 fiberを感染させた場合、GFP陽性細胞は、63.7%であったのに対し（パネルv）、Ad34 fiber 142-3pT(E1)を感染させた場合は12.2%、Ad34 fiber 142-3pT(E3)を感染させた場合は34.8%であり、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)を感染させた場合は検出されなかった（パネルw、x、y）。すなわち、アデノウイルスゲノ

ムのE1又はE3欠損領域のいずれかにmiR-142-3pの標的配列が組み込まれたアデノウイルスを使用した場合、K562細胞の検出率は有意に低下し、さらにE1及びE3欠損領域の双方にmiR-142-3pの標的配列が組み込まれたアデノウイルスを使用した場合、K562細胞は検出されなかった。

この結果から、miR-142-3pの標的配列を含む本発明の組換えウイルスは、miR-142-3pを高発現している細胞、例えば正常の血液細胞を検出しないことが示された。

実施例 3

[0069] Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)を用いた血液試料中の癌細胞の検出

5x10^{4}個のH1299細胞（CAR陽性）を5mL中の血液に懸濁し、赤血球を溶血させてPBMCを回収した。そこに1x10^9、1x10^{10}又は1x10^{11}VP（virus particle）量のウイルスを添加してローテーターで回転させながら37°Cにて24時間感染させた。細胞を回収して抗CD45抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡の下でGFP陽性細胞を観察した。CD45は赤血球及び血小板を除く血球系由来細胞の表面抗原であることが知られている。図３及び図４の縦軸に記載の「GFP Positive Cancer cells(%)」とは、「GFP陽性細胞中に含まれるGFP陽性かつCD45陰性の細胞数（%)」を示す。

その結果、TelomeScan(Ad5 fiber)の感染では多くの偽陽性細胞（GFP陽性かつCD45陽性）が観察されたが、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)の感染では偽陽性が非常に少なく、癌細胞を特異的に検出することができた。

また、H1299細胞の検出特異度の定量的解析を行った結果、TelomeScan(Ad5 fiber)では1x10^{9}VP量のウイルス感染で多数の偽陽性細胞を検出したが、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)ではウイルス感染量を増加しても、検出特異度は90%以上を示し、サンプルによっては100%を示した(図３)。また、A549細胞（CAR陽性）についても同様の手法により定量的解析を行った結果、1x10^{9}VP量のウイルス感染で検出特異度は100%を示した（図４）。これらの結果から、本発明の組換えウイルスを用いることにより、PBMC画分に含まれる癌細胞を特異的に検出することができることが示された。

[0070] 以上より、本発明の検出用試薬及び診断用試薬は、悪性度の高いCAR陰性の癌細胞を検出することができ、他方、miR-142-3pを高発現している正常の血液細胞（白血球等）などを偽陽性として検出しないことが示され、血中の循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC）の検出に極めて有効であることが示された。

実施例 4

[0071] 各種ヒト癌細胞株におけるAd34 fiber 142-3pT(E1,E3)の活性測定

（１）細胞

本実施例では、癌細胞として、ヒト肺非小細胞癌由来H1299細胞、ヒト肺癌由来A549細胞、ヒト乳癌由来MCF7細胞、ヒト乳癌由来MDA-MB-231細胞、ヒト膀胱癌由来KK47細胞、ヒト胃癌由来MKN45細胞、ヒト大腸癌由来SW620、ヒト肝臓癌由来Huh7細胞、ヒト膵臓癌由来PancI細胞、ヒト神経膠腫由来LN319細胞、ヒト膀胱癌由来T24細胞、ヒト神経膠腫由来LNZ308細胞、及びヒト神経膠腫由来LN444細胞を用いた。

（２）フローサイトメトリーを用いたAd34 fiber 142-3pT(E1,E3)の活性測定

$5x10^4$個の各種癌細胞を500μlの培地に懸濁し、そこに$5x10^5$もしくは$5x10^6$ pfu/mlに調製した制限増殖型Ad懸濁液を100μl添加した。細胞と制限増殖型Adの混合液を24ウェルプレートに播種し、37℃で24時間培養した。細胞を回収し、1500rpmで5分間遠心し、培地を除去したのち、2% FCS含有PBS 300μlに懸濁し、フローサイトメーター（MACS Quant Analyzer; Miltenyi Biotec）を用いてGFP陽性率を測定した。データはFCSマルチカラーデータ解析ソフトウェア（Flowjo）により解析した。

その結果、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)はほぼ全ての癌細胞に対し効率良く感染し、60%以上がGFP陽性となった。特にCAR陰性細胞（T24、LNZ308、LN444）については、従来のテロメスキャンに比べて大きくGFP陽性率が向上した(図５)。

この結果から、本発明の組換えウイルスを用いることにより、CAR陽性細胞のみならずCAR陰性細胞を効率良く検出可能であることが示された。

実施例 5

[0072] 上皮間葉移行（EMT）を起こした癌細胞の検出

ヒト膵臓癌PancI細胞を10ng/mLの組換えTGF-β1存在下で6日間培養することにより、上皮間葉移行（EMT）を誘導した。EMTを誘導した後に、E-カドヘリン、EpCAM、hTERT、N-カドヘリン、Slug及びSnailをコードするmRNAの相対的発現をリアルタイムRT-PCRで測定した。さらに、Panc I細胞におけるCAR及びCD46発現をフローサイトメトリーにより解析した。本発明のウイルスの細胞への感染は、実施例４と同様の方法により行った。

その結果、TGF-β含有培地で培養することにより、EMTのマーカー遺伝子であるSlug、Snail及びN-カドヘリンの発現が上昇するとともに、上皮系のマーカーであるE-カドヘリン、EpCAMの発現が減少し、EMTが誘導されていることが示された(図6A)。また、EMTの誘導に伴いCARの発現が減少したが、CD46の発現は全く減少しなかった(図6B)。さらに、EMTを起こしたPancI細胞に対し、従来のテロメスキャンを用いた場合には約35％しかGFP陽性でなかったのに対し、Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)ではほぼ90％以上GFP陽性であった（図6C）。

これらの結果から、本発明の組換えウイルスを用いることにより、上皮間葉移行（EMT）を起こした癌細胞を高感度に検出できることが示された。

実施例 6

[0073] 癌幹細胞の検出

MCF7細胞及びMCF7-ADR（抗癌剤であるアドリアマイシンに耐性を有する癌細胞）を、それぞれ96ウェルプレートに$1x10^3$個/ウェルで播種し、翌日、アドリアマイシンを0.2、1、5、25、125 μg/mLで添加した。アドリアマイシンの添加から24時間後にalamarBlue（登録商標）cell viability reagentを用いて細胞生存率を測定した（値：平均±S.D.(n=6)）。

また、フローサイトメトリーによりMCF7細胞及びMCF7-ADR細胞のCAR、CD46、P-グリコプロテイン（MDR）、CD24及びCD44の発現を解析した。$5x10^5$個のMCF7-ADR細胞を2% FCS含有PBS 100 μlに懸濁し、FITC標識マウス抗ヒトCD24抗

体、PE標識マウス抗ヒトCD44抗体を1μl加え、1時間氷上、遮光で反応させた。2% FCS含有PBSを4mlで洗浄後、1500rpm、5分間遠心し上清を吸引除去した。細胞を再び2% FCS含有PBS 100μlに懸濁し、セルソーター（FACS Aria II cell sorter; BD Biosciences）を用いてCD24陰性CD44陽性細胞画分をソートした。データはFCSマルチカラーデータ解析ソフトウェア（Flowjo）により解析した。ヒト乳癌細胞において、CD24陰性CD44陽性細胞の特徴を持つ画分は、癌幹細胞であることが知られている（Al-Hajj M., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100; 3983-3988, (2003)）また、本発明のウイルスの細胞への感染は、実施例４と同様の方法により行った。

その結果、MCF7-ADR細胞はMCF7細胞と比較してアドリアマイシン存在下においても有意に高い生存率を示し、薬物耐性能を有することが示された(図7A)。また、MCF7-ADR細胞は、MCF7細胞と同様にCARおよびCD46を高発現していた。また薬物排泄能を担う膜たんぱく質であるMDRを高発現していた(図7B)。さらに、MCF-ADR細胞中のCD24陰性CD44陽性細胞に、Ad34 fiber 142-3pT(E1, E3)を作用させたところ80%以上がGFP陽性であった。一方で、従来のテロメスキャンでは、約70%がGFP陽性であった(図7C)。

これらの結果から、本発明の組換えウイルスを用いることにより、薬物耐性の癌細胞を検出できることが示された。また、本発明の組換えウイルスを用いることにより、癌幹細胞を検出できることが示された。

実施例 7

[0074] Ad34 fiber 142-3pT(E1,E3)を用いた血液試料中の癌細胞の検出

H1299細胞、T24細胞に100 MOIで赤色蛍光タンパク（monomeric Red Fluorescent Protein; RFP）発現レンチウイルスベクターを作用させ培養した。その後、クローン細胞を取得するため、96穴プレートに0.1 cells/wellとなるように細胞を播種し、コロニーを形成するまで培養した。蛍光顕微鏡でRFPを発現している細胞を選択し、拡大培養した後、フローサイトメトリーを用いてRFP発現強度を測定した。そしてRFPの発現強度が強い細胞をRFP発現細胞とした。

1.0 mLのヒト末梢血より得られたヒト末梢血単核球(hPBMC)を800μLのRPMI-1640培地（10% FCS、抗生物質含有）に懸濁した。hPBMC懸濁液に1.0x10^5もしくは5.0x10^5 cells/mLに調製した癌細胞を100μL添加した（図８中、「spiked cancer cells」は、hPBMC懸濁液に添加した癌細胞の個数を示す）。さらに2x10^8 pfu/mLに調製した制限増殖型Ad懸濁液を100 μL添加し、合計1 mLの懸濁液とした後、ローテーターでゆっくり回転させながら、37℃で24時間培養した。

ウイルス感染後24時間培養した細胞懸濁液を300 x gで5分間遠心し、上清を除去した。細胞固定液を200μL加え、4℃、遮光状態で15分間反応させた。1 mLのPBSを加え、300 x gで5分間遠心し、上清を除去した。2% FCS含有PBSに懸濁し、フローサイトメーター（MACS Quant Analyzer; Miltenyi Biotec）を用いてGFP陽性率を測定した。データはFCSマルチカラーデータ解析ソフトウェア（Flowjo）により解析した。

[0075] 本検討では、hPBMCにRFP（赤色蛍光タンパク質）で標識した癌細胞を混入させ、hPBMC中の癌細胞を検出可能か検討した。その結果、CAR陽性癌細胞（H1299）の場合、TelomeScan（Ad5 fiber）、Ad34 fiber 143-3pT(E1,E3)ともに80%以上の癌細胞を検出可能であった。一方で、CAR陰性癌細胞（T24）の場合、TelomeScan（Ad5 fiber）では約10%がGFP陽性と極めて検出効率は低いものであったが、Ad34 fiber 143-3pT(E1,E3)では80%以上の癌細胞を検出可能であった（図８）。

この結果より、本発明の組換えアデノウイルスを用いることによりCAR陽性癌細胞のみならず、CAR陰性癌細胞も効率よく検出可能であることが示された。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明の組換えアデノウイルスを含む試薬は、正常の血液細胞（白血球等）を検出することなく、CAR陰性の癌細胞を簡便かつ高感度に検出することができる。

配列表フリーテキスト

[0077] 配列番号４：合成DNA

配列番号５～２６：合成RNA

配列番号２７～２８：合成DNA

配列番号４３～４６：合成DNA

配列番号５０：合成DNA

請求の範囲

[請求項1] ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子をこの順に含み、かつ、第一のマイクロRNAの標的配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項2] 第一のマイクロRNAが非癌細胞で発現するものである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

[請求項3] 第一のマイクロRNAが、miR-142、miR-15、miR-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296、miR-125、miR-143、miR-145、miR-199及びlet-7からなる群から選択される少なくとも１つである、請求項１又は２に記載のポリヌクレオチド。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む複製カセットがアデノウイルスゲノムのE1領域に組み込まれた組換えアデノウイルス。

[請求項5] レポーター遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含む標識カセットが、アデノウイルスゲノムのE3領域にさらに組み込まれた、請求項４に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項6] 標識カセットがさらに第二のマイクロRNAの標的配列を含むものである、請求項５に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項7] 細胞死誘導関連タンパク質をコードする遺伝子及び該遺伝子の発現を制御しうるプロモーターを含む細胞死誘導カセットが、アデノウイルスゲノムのE3領域にさらに組み込まれた、請求項４に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項8] 細胞死誘導カセットがさらに第二のマイクロRNAの標的配列を含むものである、請求項７に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項9] 第二のマイクロRNAが非癌細胞で発現するものである、請求項６又は８に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項10] 第二のマイクロRNAが、miR-142、miR-15、miR-16、miR-21、miR-126、miR-181、miR-223、miR-296、miR-125、miR-143、miR-145、miR-1

99及びlet-7からなる群から選択される少なくとも１つである、請求項９に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項11] レポーター遺伝子が、蛍光を発するタンパク質をコードする遺伝子又は酵素反応により発光物質若しくは発色物質を生じる酵素タンパク質をコードする遺伝子である、請求項５又は６に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項12] 前記プロモーターが、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター又はサイトメガロウイルスプロモーターである、請求項５～１０のいずれか１項に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項13] CD46に結合するファイバータンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、請求項４～１２のいずれか１項に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項14] CD46に結合するファイバータンパク質が、34型又は35型アデノウイルスのファイバータンパク質の少なくともファイバーノブ領域を含むものである、請求項１３に記載の組換えアデノウイルス。

[請求項15] 請求項４～１４のいずれか１項に記載の組換えアデノウイルスを含む、癌細胞の検出用試薬。

[請求項16] 請求項４～１４のいずれか１項に記載の組換えアデノウイルスを含む、癌の診断用試薬。

[請求項17] 癌細胞が、被検者から採取された生体試料由来のものである、請求項１５に記載の試薬。

[請求項18] 生体試料が血液である、請求項１７に記載の試薬。

[請求項19] 癌細胞が循環腫瘍細胞である、請求項１５又は１８に記載の試薬。

[請求項20] 癌細胞が薬物耐性癌細胞である、請求項１５及び１７～１９のいずれか１項に記載の試薬。

[請求項21] 癌細胞が癌幹細胞である、請求項１５及び１７～２０のいずれか１項に記載の試薬。

[請求項22] 癌細胞が上皮間葉移行又は間葉上皮移行を起こした癌細胞である、

請求項１５及び１７～２１のいずれか１項に記載の試薬。

［請求項23］ 請求項１１に記載の組換えアデノウイルスを癌細胞に接触させ、当該癌細胞が発する蛍光又は色を検出することを特徴とする、癌細胞の検出方法。

［請求項24］ 癌細胞が、被検者から採取された生体試料由来のものである、請求項２３に記載の方法。

［請求項25］ 生体試料が血液である、請求項２４に記載の方法。

［請求項26］ 癌細胞が循環腫瘍細胞である、請求項２５に記載の方法。