

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年3月25日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/032696 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) C07K 14/15 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/065955
- (22) 国際出願日: 2009年9月11日(11.09.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-239943 2008年9月18日(18.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 工藤 千恵 (KUDO, Chie) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人(ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: DIAGNOSIS METHOD AND THERAPEUTIC METHOD FOR CANCER

(54) 発明の名称: がんの診断方法及び治療方法

(57) Abstract: Disclosed are a diagnosis method and a therapeutic method for cancer, both of which utilize HERV-H env gene and protein. Particularly, cancer can be diagnosed by detecting the expression of HERV-H env gene, and a reagent used for the detection of the expression can be used as a diagnosing agent. Cancer can be treated by inhibiting the function of HERV-H env gene, and a reagent used for the inhibition of the function can be used as an anti-cancer agent. Alternatively, cancer can be treated by administering a peptide having a specific sequence contained in HERV-H env protein or the like, and the peptide or the like can be used as a cancer vaccine.

(57) 要約: 本発明の目的は、HERV-H env 遺伝子及びタンパク質を利用したがんの診断方法及び治療方法を提供することである。特に HERV-H env 遺伝子の発現を検出することによりがんを診断し、発現検出に用いる試薬を診断剤とする。また、HERV-H env 遺伝子の機能を抑制することによりがんを治療し、機能抑制に用いる試薬を抗がん剤とする。さらに、HERV-H env タンパク質の特定の配列を有するペプチドなどを投与することによりがんを治療し、そのペプチドなどをがんワクチンとする。



WO 2010/032696 A1

明 細 書

発明の名称： がんの診断方法と治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、がんの診断方法とそれに用いる診断剤、がんの治療方法とそれに用いる抗がん剤及びがんワクチンに関する。

背景技術

[0002] ヒト内因性レトロウイルス (Human endogenous retrovirus; HERV) やその他のウイルスLTR様配列は、ゲノムの約8%ものDNAを構成する。ヒトゲノム中には、20種類以上のHERVが同定されているが、gag、pol、envの各遺伝子中に変異が生じているものがほとんどであるが、胎盤、テラトカルシノーマ細胞株、生殖細胞由来の腫瘍、乳がん細胞株などで発現が検出されている遺伝子もある。

[0003] 中でも、HERV-H遺伝子群は最大のグループを形成しており、約100コピーの完全長配列、800-900コピーの欠失変異を有する配列、約1000コピーのLTR配列が存在する。

[0004] HERV-H遺伝子群のうち、HERV-H env遺伝子は、胎盤、骨格筋、脾臓、胸腺で発現が高く、そのほかの正常組織での発現は検出されないと報告されている。また、さまざまな組織由来の腫瘍細胞株において、広範に発現が検出されている (Yi, J-M, Kim, H-M, and Kim, H-S (2006) Cancer Letters vol. 231, pp. 228-239)。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、HERV-H env遺伝子及び遺伝子産物を利用したがんの診断方法及びがんの治療方法、特に、HERV-H env遺伝子の発現を検出することによりがんを診断する方法とそれに用いる診断剤、HERV-H env遺伝子の機能を抑制することによりがんを治療する方法とそれに用いる抗がん剤、HERV-H envタンパク質の特定の配列を有するペプチドなどを投与することによりがんを治療

- ・ 予防する方法とそれに用いるがんワクチンを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] Zinc-finger転写因子Snailは、がんの悪性化因子であり、Snailの発現が高くなるほど、がんが悪性化することが知られていた (Nature Rev Cancer 7, 415-428, 2007)。
- [0007] その理由の一つとして、Snailが、E-cadherinなどの細胞間接着分子の発現を抑制することにより、個体発生における原腸陥入や組織および器官の発生過程、正常組織や細胞が失われた際の修復過程、がん細胞が転移する転移過程などが起きる際の上皮-間充織転換 (EMT: Epithelial-mesenchymal transition) を制御するためであり (Nature Rev Cancer 7, 415-428, 2007)、従って、がんにおけるSnailの過剰発現は、がん細胞の転移や浸潤を促進し、がんを悪性化すると考えられている。
- [0008] そこで、本発明者らは、Snailの過剰発現によるがんにおけるEMTのメカニズムを鋭意研究していたところ、Snailの作用がHERV-H envタンパク質を介していることを見出した。このことから、HERV-H env遺伝子及びその産物を利用してがんの診断及び治療ができることを実証し、本発明の完成に至った。
- [0009] 本発明にかかるがんの診断剤は、HERV-H env遺伝子の発現を検出し得るPCR用プライマー・ペアまたは抗HERV-H env抗体を含有する。前記PCR用プライマー・ペアが、配列番号1及び配列番号2を有していてもよい。また、前記がんが、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肺癌、白血病、食道癌であってもよい。本発明にかかるがんの診断キットは上記いずれかの診断剤を含む。
- [0010] 本発明にかかる医薬組成物は、HERV-H env遺伝子の機能を抑制する機能抑制物質を含有する。前記機能抑制物質がHERV-H env遺伝子の発現を抑制してもよい。また、前記機能抑制物質がsiRNAであってもよい。本発明にかかる抗がん剤は、上記いずれかの医薬組成物を含む。
- [0011] 本発明にかかるペプチドは、配列番号3～5のいずれかの配列を有する。本発明にかかる抗原提示細胞は配列番号3～5のいずれかの配列を有するペプチドを細胞表面に提示した細胞である。また、本発明にかかるT細胞は、

前記抗原提示細胞によって誘導され、HERV-H env抗原を発現しているがん細胞を認識し、細胞障害性T細胞であってもよい。

[0012] 本発明にかかるがんワクチンは、配列番号3～5から選択される一つ以上のペプチド、前記ペプチドを発現する発現ベクター、上記いずれかの抗原提示細胞、または上記いずれかのT細胞を含有する。Snailタンパク質またはHERV-H env抗原を発現するがん細胞に対するがんワクチンであってもよい。また、配列番号3～5から選択される一つ以上のペプチド、及び前記ペプチド以外のがん抗原ペプチドを含有するがんワクチンとしてもよい。

[0013] 本発明にかかるがんの治療・予防方法は、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物に対し、上記いずれかのがんワクチンを用いた方法である。

[0014] なお、本明細書では、Accession番号AJ289710に記載のHuman endogenous retrovirus H HERV-H/env60 proviral copy clone 734E12（アミノ酸配列：配列番号1、塩基配列：配列番号2）をHERV-H env遺伝子と称する。

[0015] また、本明細書で「がん」という用語は、上皮細胞由来の癌、非上皮細胞由来の肉腫、血液のがんなど、一般に悪性腫瘍と呼ばれる腫瘍を意味するものとし、特にがん細胞の由来は問わない。

[0016] ==関連出願へのクロスリファレンス==

本出願は、平成20年9月18日付で出願した日本国特許出願第2008-239943に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]本発明の一実施例において、ヒトの正常組織（A）、腫瘍細胞株（A）、及びヒト進行性大腸癌組織（B）におけるHERV-H env遺伝子の発現をRT-PCRで調べた結果を示す図である。

[図2]本発明の一実施例において、snail遺伝子を強制発現させたPanc-1細胞の表現型をまとめた表である。

[図3]本発明の一実施例において、snail遺伝子を強制発現させたPanc-1細胞におけるHERV-H env遺伝子発現抑制の効果を示す図である。

[図4]本発明の一実施例において、HLA-A24発現遺伝子改変マウスで、HERV-H envペプチドによって誘導されたHERV-H env特異的CTLを、HERV-H envペプチドで再刺激したときのガンマ・インターフェロン産生量を測定した結果を示すグラフである。

[図5-1]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球を用いてHERV-H envペプチドによって誘導されたHERV-H env特異的CTLに、HERV-H envを発現する腫瘍細胞を接触させたときの腫瘍細胞の殺傷率（A及びC）を測定した結果を示すグラフである。

[図5-2]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球を用いてHERV-H envペプチドによって誘導されたHERV-H env特異的CTLを、HERV-H envペプチドで再刺激したときのガンマ・インターフェロン産生量（B及びD）を測定した結果を示すグラフである。

[図5-3]本発明の一実施例において、HLA-A02陽性健常人末梢血単核球を用いてHERV-H envペプチドによって誘導されたHERV-H env特異的CTLに、HERV-H envを発現する腫瘍細胞を接触させたときの腫瘍細胞の殺傷率（E）を測定した結果を示すグラフである。

[図6]本発明の一実施例において、HERV-H envペプチドを他のがん抗原ペプチドに混合してがんワクチンとして用いた場合、免疫活性が相乗的に増強された結果を示すグラフである。

[図7]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球を用いてHERV-H env特異的CTLを誘導する際に抗HLA抗体を添加した場合の、誘導されたHERV-H env特異的CTLの腫瘍細胞に対する殺傷率（%）を測定した結果を示すグラフである。

[図8]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球を用いてHERV-H envペプチドによって誘導されたHERV-H env特異的CD8+CTL、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球、およびHERV-H envペプチドを免疫不全マウスに共投与した場合の、脾臓および末梢血内のCD8+細胞の増殖を示すフローサイトメトリーの結果である。

[図9]本発明の一実施例において、内因性HERV-H envとSnailを発現するヒト大腸癌細胞株C0L0320細胞において、HERV-H env遺伝子発現およびSnail遺伝子発現を抑制した場合の、上皮-間充織転換制御遺伝子群の発現量の変化（A）、および、細胞膜浸潤細胞数（B）を示す図である。

[図10]本発明の一実施例において、内因性HERV-H envを発現するヒト大腸癌細胞株SW837細胞において、HERV-H env遺伝子発現を抑制した場合の、上皮-間充織転換制御遺伝子群の発現量の変化（A）、および、細胞膜浸潤細胞数（B）を示す図である。

[図11]本発明の一実施例において、内因性HERV-H envとSnailを発現するヒト膵癌細胞株MIAPaca細胞において、HERV-H env遺伝子発現およびSnail遺伝子発現を抑制した場合の、上皮-間充織転換制御遺伝子群の発現量の変化（A）、および、細胞膜浸潤細胞数（B）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、実施例を挙げながら、本発明の実施形態を詳細に述べる。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0019] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。

い。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0020] ==がんの診断方法==

HERV-H env遺伝子は、正常組織には、ほとんど発現が検出されず、一部の組織で弱い発現があるだけである。しかしながら、ヒト腫瘍細胞株では広範ながん種と腫瘍株において強い発現が検出され、実際、臨床患者のがん組織においてもHERV-H envが高率に発現するため、生検などによって採取された組織や細胞で、HERV-H env遺伝子の発現を調べ、強いHERV-H env遺伝子の発現が検出された場合に、がんという診断をすることができる。

[0021] 診断できるがんの種類は特に限定されず、神経腫、腎癌、肝癌、膵癌、肉腫、大腸癌、メラノーマ、肺癌、食道癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫など、固形癌でも血液の癌でもかまわないが、正常組織では発現が検出されない組織に由来する癌である、脳腫瘍、神経腫、腎癌、胸腺腫、脾臓腫瘍、肝癌、骨肉腫、リンパ腫、骨髄腫などであることが好ましい。正常組織で発現が検出されるがん種であっても、正常組織と発現の強さを比較し、発現が増強されていることで、がんを診断することができる。

[0022] 診断方法は特に限定されず、HERV-H env遺伝子の発現を検出できる方法であれば、タンパク質を検出してもRNAを検出しても良いが、簡便さの点から、抗体を用いる方法（例えばELISA）やPCRを用いる方法（例えばRT-PCR）などが好ましい。そこで、手軽に検出できるようにした診断キットとして、HERV-H envタンパク質を検出し得る抗HERV-H env抗体やHERV-H env遺伝子発現を検出し得るPCR用プライマー・ペアなどの診断剤を含んだキットを作製してもよい。このキットには、抗体やプライマー以外に、ELISA用試薬やプレート、PCR用試薬等を添付してもよい。

[0023] ==医薬組成物と抗がん剤、それらを用いたがんの治療方法==

上述したように、がんにおけるSnailの過剰発現は、EMT関連遺伝子（例えば、E-カドヘリン）の発現を増強させ、がん細胞の転移や浸潤を促進し

、がんを悪性化すると考えられている。Snailを過剰発現したがんにおいては、HERV-H env遺伝子の発現も亢進しているが、ここでHERV-H envタンパク質の機能を抑制すると、Snailの過剰発現による下流遺伝子発現の増強が抑制される。従って、遺伝子発現制御の流れの中で、Snail遺伝子が最も上流にあり、その下流にHERV-H env遺伝子があり、さらに下流にEMT関連遺伝子が存在する。

[0024] Snailを過剰発現したがんにおいて、HERV-H envの機能を抑制すると、EMT関連遺伝子の機能が抑制され、その結果、がんの転移能や増殖能を抑制することができる。実際、Snailを過剰発現したがんにおいて、HERV-H envの機能を抑制すると、浸潤細胞数が減少し、増殖が抑制される。従って、HERV-H envタンパク質の機能を抑制する機能抑制物質を含有する医薬組成物を抗がん剤として用いることが可能になる。

[0025] ここで、HERV-H envタンパク質の機能を阻害する機能抑制物質は特に限定されず、抗HERV-H env抗体、siRNA、アンチセンスRNAなどであってよく、そのメカニズムとしてHERV-H env遺伝子発現を転写レベルで阻害しても、翻訳レベルで阻害しても、タンパク質の機能を抑制しても構わない。

[0026] 治療対象のがんは、Snailタンパク質またはHERV-H env抗原を発現しているがんであれば特に限定されず、神経腫、腎癌、肝癌、膵癌、肉腫、大腸癌、メラノーマ、肺癌、食道癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫など、固形がんでも血液のがんでもかまわないが、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肺癌、白血病、食道癌であることが好ましく、大腸癌や膵癌であることが最も好ましい。

[0027] 抗がん剤の使用方法は適宜決定されればよいが、患者において、全身投与または腫瘍部位やその近辺に直接投与されることが好ましい。

[0028] ==がんワクチンとそれを用いたがんの治療・予防方法==

HERV-H envタンパク質の有するアミノ酸配列の一部である配列番号3~5を有するペプチドを抗原提示細胞である樹状細胞に添加したとき、HLAクラスI分子に結合することにより細胞表面に提示され、細胞障害性T細胞に

認識されることで、HERV-H env特異的な細胞障害性T細胞を誘導できる。また各ペプチドの刺激により樹立された細胞障害性T細胞がHERV-H envタンパク質を発現するがん細胞を効率よく認識することから、配列番号3～5から選択される一つ以上のペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、抗原提示細胞によって誘導され、HERV-H env抗原を発現しているがん細胞を認識する細胞障害性T細胞は、がんワクチンとして、がんの治療・予防に利用することができる。

[0029] 現在、がんワクチンとして、腫瘍特異的ながん抗原、がん抗原提示抗原提示細胞、またはがん抗原反応性細胞障害性T細胞を腫瘍患者に投与する方法が開発されている。本発明においては、HERV-H envの部分ペプチドを用いているので、治療または予防対象となる腫瘍は、HERV-H envを発現しているがんであれば特に限定されず、神経腫、腎癌、肝癌、膵癌、肉腫、大腸癌、メラノーマ、肺癌、食道癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫など、固形がんでも血液のがんでもかまわない。主な治療対象は、こうした腫瘍を有するヒト患者であるが、腫瘍を有するヒト以外の脊椎動物でもかまわない。

[0030] ==がんワクチンの使用方法==

まず、本発明のがんワクチンは、配列番号3～5を有するペプチドを含有してもよい。この場合、治療対象となる腫瘍を有する患者に対してがんワクチンを投与する際、あらかじめ患者のHLAクラスIのタイプを調べるのが好ましい。ここでは、患者のHLAクラスIタイプがA24またはA02である場合に、配列番号3～5のペプチドを投与する。投与するペプチドは、一種類であっても複数種類であってもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されることはない。また、投与する際には、免疫誘導能を高めるアジュバントなどとともにペプチドを投与してもよい。また、投与されるペプチドは、生体内で分解されにくくするような修飾が施されていてもよい。さらには、ペプチドそのものではなく、これらのペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクター

などを用いた遺伝子ワクチンとして投与してもよい。

[0031] また、上記がんワクチンは、配列番号3～5を有するペプチドを提示した抗原提示細胞を含有してもよい。ここで、細胞表面に提示されているペプチドは、配列番号3～5を有するペプチドそのものでもよく、糖やリン酸などで修飾されてもよい。また、その作製には、化学合成してもよく、これらのペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターなどを用いて発現させてもよい。抗原提示細胞としては、樹状細胞の他にマクロファージ、B細胞、また、B7や4-1BBLなどのT細胞刺激因子などを遺伝子導入等で強制的に発現させた腫瘍細胞（偽抗原提示細胞）等が考えられるが、抗原提示能の高さなどから、樹状細胞が好ましい。以下、樹状細胞の単離方法の例を記述する。

[0032] まず、脊椎動物個体の末梢血から単核球を単離する。この単核球は、治療対象となる個体自身から分離することが好ましいが、他の個体から単離してもよい。また、この単核球はCD14陽性またはCD11c陽性であることが好ましい。単離した単核球を、GM-CSF とIL-4 で7日前後培養すると、未熟な樹状細胞に分化誘導することができる。このようにして分化誘導された樹状細胞は、抗原提示分子であるMHC分子を高発現している。この未熟な樹状細胞のHLAクラスIタイプを調べ、A24またはA02である場合は、配列番号3～5の下記ペプチドを添加する。

HERV-H#1 : SYLHHTINL (配列番号3)

HERV-H#2 : FYSLLLYSL (配列番号4)

HERV-H#3 : NYAEPWPL (配列番号5)

[0033] 添加するのは、人工合成ペプチドに限らず、ペプチドを発現させた細胞の抽出物 (extractやlysate) や精製物などでもよい。こうして得られた抗原提示樹状細胞を、腫瘍を有する個体に投与する。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、樹状細胞の抗原提示を含む生理的な抗腫瘍免疫反応が、腫瘍組織内ならびに所属リンパ節等の腫瘍近傍で行なわれることを考えると、腫瘍組織内またはリンパ節内への直接投与が好ましい。

[0034] また、がんワクチンは、配列番号3～5由来のペプチドを提示した抗原提示細胞の刺激によって樹立されたT細胞を含有してもよい。配列番号3～5由来のペプチドを提示した抗原提示細胞と共にT細胞を共培養し、抗原提示細胞で刺激する。このようにして樹立されたT細胞を腫瘍を有する個体に投与してもよい。ここでのT細胞は、細胞障害性T細胞が好ましいが、ヘルパーT細胞等でもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腫瘍内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、細胞障害性T細胞の場合、抗原を発現する細胞を直接攻撃できるため、腫瘍内投与が好ましい。

[0035] なお、これらのがんワクチンは、他のがんワクチンと共に投与しても良い。特に、配列番号3～5由来のペプチドをがんワクチンとして用いる場合、これらのペプチドはウイルス由来抗原であるため、がんワクチンとして作用し得る他のがん抗原ペプチドなどと共投与した場合、その抗原性を増強するアジュバントとしての作用効果も併せ持つため、相乗的な効果を発揮し得る。

実施例

[0036] 以下に、本発明を実施例によって具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の技術的範囲を限定するものではない。

[0037] [実施例1] ヒトの正常組織及び腫瘍細胞におけるHERV-H env遺伝子の発現

本実施例では、内因性レトロウイルスHERV-H env遺伝子が、ヒト正常組織にはほとんど発現していないが、腫瘍細胞株及び腫瘍組織では高発現していることを示す。

[0038] ==RT-PCRによる遺伝子発現解析法==

RNeasykit(Qiagen社)を用いて、ヒト正常組織、種々のヒト腫瘍細胞株、及びヒト大腸癌(図1参照)からRNAを抽出し、AMVで逆転写してcDNAを得た。次に、下記のプライマーを用いてiCycler(Biorad社)で遺伝子を増幅し、電気泳動にて遺伝子発現を検出した。

[0039] 図1の上段はHERV-H env遺伝子の発現、下段は発現レベルの対照としてGAPDH遺伝子の発現を示す。

HERV-H env用プライマー:

Forward 5' - GGATCCTCTACCTACATGTGTC -3' (配列番号6)

Reverse 5' - TCAAGGGAATTAGTGGAATAAC -3' (配列番号7)

GAPDH用プライマー:

Forward 5' - GTCAACGGATTTGGTCGTATT -3' (配列番号8)

Reverse 5' - ATCACTGCCACCCAGAAGACT -3' (配列番号9)

[0040] 図1Aに示すように、ヒト正常組織においては、心臓 (Heart)、脾臓 (Spleen)、膵臓 (Pancreas)、精巣 (Testis)、胎盤 (Placenta) で弱いHERV-H env遺伝子の発現が検出できたが、脳 (Brain)、腎臓 (Kidney)、肝臓 (Liver)、胸腺 (Thymus)、骨格筋 (Muscle)、骨髄 (BM) では発現は検出できなかった。ヒト腫瘍細胞株では広範ながん種 (膵癌、大腸癌、メラノーマ、肺癌、白血病、食道癌) とそれぞれの腫瘍株において、強いHERV-H env発現が検出された。また、図1Bに示すように、大腸癌の癌組織 (Tu) においては、正常組織 (N) より高レベルの発現が認められた。

[0041] このように、HERV-H env遺伝子の発現ががんの診断に利用できると同時に、HERV-H envをがん抗原として標的とした治療法は、各種臓器に対する副作用が少なく、広範ながん種の患者に対して適用できる。

[0042] [実施例2] 腫瘍細胞に発現するHERV-H envの機能とその抑制

本実施例では、HERV-H envががん細胞の浸潤に関与することを示し、HERV-H env遺伝子の発現抑制によってがん細胞の浸潤を抑制できることを示す。

[0043] (1) Panc-1細胞におけるsnail遺伝子の強制発現

まず、EMT誘導剤の一つとして知られるTGF-betaで刺激したPanc-1細胞からsnail cDNA (CDS 71-865, 795 bp)をPCRで増幅し、G418耐性遺伝子を有するp cDNA3.1(+)プラスミドベクター (Invitrogen社) の制限酵素EcoR I-Xho Iサイトに挿入した。これを腫瘍細胞株にエレクトロポレーションによって導入し、2週間培養した後、G418 (2 mg/mL) で薬剤耐性細胞を選択し、細胞をク

ローニングした。

[0044] 図2に、snail遺伝子導入細胞株の表現型を表にまとめた。

[0045] 親細胞株であるPanc-1細胞においてもSnailタンパク質の固有の発現は観察されるが、snail遺伝子の強制発現ベクターを導入することにより、クローンD6、D10、F3、F5でSnailタンパク質の発現レベルが亢進していた。その結果として、いずれのクローンにおいても、細胞形状は球状(round)から扁平な紡錘形(spindle/spreading)に変化し、in vitro 及びin vivoにおいて細胞増殖能(proliferation)は低下し、E-カドヘリン(E-cadherin)のタンパク質レベル及び細胞接着能(Adhesion)が低下し、細胞移動能(Migration)及び細胞浸潤能(Invasion)は亢進した。特に、クローンF3において、上皮-間充織転換(EMT)に関する顕著な効果が観察されたので、以下の実施例においてF3を用いた。

[0046] (2) クローンF3におけるHERV-H env遺伝子発現抑制の効果

ここでは、クローンF3において、HERV-H env遺伝子発現を抑制し、細胞浸潤能及び増殖能を測定した。

[0047] まず、 5×10^4 個のF3細胞、及び、PEI complex法(Polyplus社)にて下記4種のHERV-H env遺伝子特異的なsiRNAを導入した2~3日後のF3細胞(#1~#4、Invitrogen社)を計数した。このときの細胞数を図3Aにグラフ化し、増殖能の指標とした。

[0048] ==細胞浸潤能の測定法==

次に、回収した細胞をメンブレンがmatrigelでコートされたInvasion Chamber(ポアサイズ $8 \mu\text{m}$, BD Bioscience社)の上層に入れて4時間培養した(37°C, 5%CO₂)。メンブレン上の細胞を完全に除去後、下層へ浸潤した細胞をクリスタルバイオレット溶液で固定・染色して顕微鏡下で計数することにより、細胞浸潤能を測定した。

[0049] なお、コントロールとして、Invitrogen社製のコントロールオリゴヌクレオチドを導入したF3細胞(Control)と、下記のsnail遺伝子特異的なsiRNA(SiRNA-snail#1)を導入したF3細胞(SiRNA-snail)、及び、Panc-1細胞株(Par

ent) を用いた。

siRNA-HERVH#1:

Sense: CCAAUCUUAUGCCACCCUdTdT (配列番号 10)

Antisense: AAGGGUGGCAUAAGAUUGGdTdT (配列番号 11)

siRNA-HERVH#2:

Sense: CCAAUUCUUAGUCCUUUAdTdT (配列番号 12)

Antisense: UUAAGGACUAAGAAUUGGdTdT (配列番号 13)

siRNA-HERVH#3:

Sense: CCAGGCCAUCACCGAUCAUdTdT (配列番号 14)

Antisense: AUGAUCGGUGAUGGCCUGGdTdT (配列番号 15)

siRNA-HERVH#4:

Sense: GGAGGACUCUGUAUAUUCUdTdT (配列番号 16)

Antisense: AGAAUAUACAGAGUCCUCCdTdT (配列番号 17)

siRNA-snail#1:

Sense: GCGAGCUGCAGGACUCUAdTdT (配列番号 18)

Antisense: UUAGAGUCCUGCAGCUCGCdTdT (配列番号 19)

コントロールオリゴヌクレオチド:

Sense: GGAUCAGUCUAUUAGGUCUdTdT (配列番号 20)

Antisense: AGACCUAAUAGACUGAUCCdTdT (配列番号 21)

[0050] 図3Aに示すように、無処置の場合(図では「None」)やControl siRNAを導入した場合(図では「Control」)に比較して、F3を抑制した場合(図では#1~#4)には、Snailに特異的なsiRNAを導入した場合(図では「siRNA-snail」)と同様に、細胞増殖が強く抑制された。

[0051] また、図3Bに示すように、Panc-1親株(図では「Parent」)に比較してF3細胞株では浸潤能が亢進しているが、HERV-H env遺伝子特異的なsiRNAを導入することによって、Snailに特異的なsiRNAを導入した場合と同様に、F3細胞株の細胞浸潤能は顕著に低下した。

[0052] このように、細胞増殖能及び細胞浸潤能という細胞機能について、HERV-H

envタンパク質は、snailタンパク質の下流で機能するため、HERV-H envタンパク質の機能を抑制することにより、snail遺伝子の強制発現の効果を打ち消すことができる。つまり、snail遺伝子が過剰発現したがん細胞で、HERV-H envの機能を抑制することにより、細胞増殖能及び細胞浸潤能を低下させることができるため、HERV-H envの機能を抑制することができる機能抑制物質は抗がん剤（増殖抑制剤や抗転移剤）として有用である。

[0053] [実施例 3] HLA-A24発現遺伝子改変マウスを用いたHERV-H env特異的CTLの誘導

本実施例では、HLA-A24拘束性HERV-H envペプチドでHLA-A24を発現する遺伝子改変マウス（A24-Tg）（SLC社より購入、参考文献：International J. Cancer 100: 5565-5570, 2002）を免疫し、HERV-H envが免疫原性を有すること、すなわち、HERV-H env特異的CTLが誘導可能であることを示す。

[0054] まず、A24-Tgマウスの骨髄細胞からLineagePanel Streptavidin Plus Magnetic Particles-DM（BD Biosciences社）を用いて樹状細胞前駆細胞を分離し、GM-CSF（10ng/mL、Peptotech社）存在下で6日間培養して分化させた。この樹状細胞を、下記配列を有するペプチド（10 μ g/mL、合成はInvitrogen社）の存在下で6時間培養した後、HLA-A24発現遺伝子改変マウスの皮下に、マウス1匹あたり5x10⁶個を接種して免疫した。なお、癌精巢抗原として既に同定されており、HLA-A24拘束性ペプチドも樹立されているSAGEをポジティブコントロールとして用い（Cancer Research 60:3848-3855, 2000）、ペプチドで刺激していない樹状細胞を用いた場合をネガティブコントロールとした。

HERV-H#1 : SYLHHTINL（配列番号3）

HERV-H#2 : FYSLLLYSL（配列番号4）

HERV-H#3 : NYAEPWPL（配列番号5）

SAGE : LYKPDSNEF（配列番号22）

[0055] ペプチドで免疫した一週間後のマウスから脾臓細胞を採取し、10 μ g/mLの同じペプチドで6日間刺激培養した後、Miltenyi社の抗体結合MACS磁気ビーズ法によってCD8⁺細胞を分離した。より強いサイトカイン産生を得るため、APC

(HLA-A24発現遺伝子改変マウスから採取した新鮮な脾臓細胞をマイトマイシンCで不活性化した細胞、 1×10^7 個)の存在下で、CD8+細胞 (1×10^6 個)を0.08~10 μ g/mLの同じペプチドでさらに24時間刺激した。その培養上清中に含まれるガンマ・インターフェロン値をマウス用Cytometric Bead Arrayキット (BD Biosciences社)を用いて測定した。

- [0056] 図4Aには、CD8+細胞を、10 μ g/mLのペプチドで刺激した場合のガンマ・インターフェロン産生量を示す。免疫したA24-Tgマウスにおいて、用いた3種のHERV-H envペプチドいずれもが、HERV-H env抗原に反応してガンマ・インターフェロンを高産生するCD8+細胞を誘導でき、しかも、その活性はSAGEペプチドよりも優れていた。
- [0057] 図4Bには、CD8+細胞を、各ペプチド0.08~10 μ g/mLの濃度で刺激した場合のガンマ・インターフェロン産生量を示す。また、その図中の左上に、10 μ g/mLのペプチド刺激で産生されたガンマ・インターフェロン量を100%として、それぞれのペプチド濃度で刺激して産生されたガンマ・インターフェロン量を換算(標準化)した図を示す。各HERV-H envペプチド間を比較すると、HERV-H#2の活性がもっとも高いものの、HERV-H#2とHERV-H#3は2 μ g/mL以下の低濃度になるとその活性が極端に低下しまう一方、HERV-H#1は低濃度になってもその活性は一定に保たれた。このことから、HERV-H#1のTCR結合親和性は他ペプチドに比較して有意に ($P < 0.001$, t-test検定)高いことが示された。
- [0058] [実施例4] 健常人末梢血単核球を用いたHERV-H env特異的CTLの誘導
- 配列番号3~5のいずれかを有するHERV-H envペプチドが、HLA-A24発現遺伝子改変マウスにおいてのみならず、ヒトにおいてもHERV-H env特異的CTLを誘導できることを示す。
- [0059] まず、二人のHLA-A24陽性健常人から1/10量の4%クエン酸ナトリウムを加えて採血し、Ficoll-Paque (Amersham社)に重層して遠心(1500rpm、20分、室温)して、その中間層に分離された単核球分画(PBMC)を10 μ g/mLの各ペプチドで6日間刺激培養し、Miltenyi社の抗体結合MACS磁気ビーズ法でCD8+細胞を分

離した。細胞傷害活性を評価するため、標的細胞としてのヒト大腸癌細胞株COL0320 (HLA-A24⁺ SAGE⁺ HERV-H env⁺) と分離したCD8⁺細胞とを、CD8⁺細胞:COL0320腫瘍細胞 = 50:1の割合で6時間混合培養し、Immunocyto Cytotoxicity Detection Kit (MBL社)を用いて殺傷された腫瘍細胞を検出した。添付プロトコールに準じて腫瘍特異的傷害率を算出し、その結果を図5 Aにグラフ化した。

[0060] 図5 Aに示されるように、どちらの健常人由来のPBMCにおいても、SAGEペプチドと同等またはそれ以上に、HERV-H envペプチドによってCOL0320腫瘍細胞を十分に殺傷し得るCD8⁺細胞を誘導できた。なお、その腫瘍細胞傷害活性は、HERV-H#1誘導CTLが最も高かった。

[0061] 一方、ガンマ・インターフェロン産生能も評価し、 1×10^6 個のCD8⁺細胞をIL-2 (100 U/mL、Peprtech社)とAPC(健常人から採取した新鮮なPBMCをマイトマイシンCで不活性化した細胞、 5×10^6 個)の存在下で1または10 μ g/mLの各ペプチドで24時間刺激し、その培養上清中に含まれるガンマ・インターフェロン値をヒトCytometric Bead Arrayキット(BD Biosciences社)を用いて測定し、その結果を図5 Bにグラフ化した。

[0062] 図5 Bに示されるように、低濃度(1 μ g/mL)刺激では、各ペプチド間でほとんど差は見られなかったが、高濃度(10 μ g/mL)で刺激すると、HERV-H#1が他ペプチドに比較して極めて高い産生を示した。

[0063] また、上記とまったく同様の方法に基づいて、二人のHLA-A02陽性健常人から採取したPBMCを用いた場合にも、図5 Eに示すように、配列番号3~5のHERV-H envペプチド刺激によって、ヒト膵癌細胞株Panc-1 (HLA-A24⁻ HLA-A02⁺ SAGE⁺ HERV-H env⁺) を十分に殺傷し得るCD8⁺細胞を誘導でき、その際の腫瘍細胞傷害活性もまた、HERV-H#1誘導CTLで最も高く認められた。

[0064] このように、配列番号3~5のいずれかを有するHERV-H envペプチドは、HLA-A24陽性、HLA-A02陽性のどちらのタイプのヒトにおいてもHERV-H env特異的CTLを誘導できるが、腫瘍細胞傷害活性においてもガンマ・インターフェロン産生能においても、配列番号3のペプチドHERV-H#1が最も効果が高かった

。

[0065] そこで、腫瘍細胞傷害活性及びガンマ・インターフェロン産生能について、配列番号3のペプチドHERV-H#1を、下記のHLA-A24拘束性がん抗原ペプチドと比較した。これらは、臨床で、最新のペプチドワクチン療法において使用されているペプチドである。

NY-ESO-1 : LLMWITQCF (配列番号23)

CEA : TYACFWSNL (配列番号24)

WT1 : CMTWNQMNL (配列番号25)

[0066] 腫瘍細胞傷害活性については、CD8+細胞:COL0320腫瘍細胞の割合を6.25:1、12.5:1、25:1、50:1で行い、その結果を図5Cにグラフ化した。図5Cに示されるように、CD8+細胞:COL0320腫瘍細胞=25:1よりも低い比率のときは、SAGEやWT1などと同等の活性であったが、25:1以上のE:T比では、ペプチドHERV-H#1誘導CTLが最も高い活性を示した。

[0067] また、ガンマ・インターフェロン産生能については、CD8+細胞をIL-2とAPC存在下で0.1、1または10 μ g/mLの各ペプチドで刺激し、その結果を図5Dにグラフ化した。図5Dに示されるように、1 μ g/mL以上の高濃度では、NY-ESO-1誘導CTLが最も高い産生を示したが、低濃度(0.1 μ g/mL)になると、NY-ESO-1誘導CTLの活性は極端に低下した。一方、1 μ g/mL以上の高濃度では、HERV-H#1誘導CTLの活性はNY-ESO-1に次ぐものであったが、低濃度(0.1 μ g/mL)でもまだ十分にガンマ・インターフェロン産生を誘導できた。

[0068] このように、現在、臨床的に使用されているペプチドに対しても、配列番号3のペプチドHERV-H#1は優れた効果を示した。

[0069] [実施例5] HERV-H envペプチドの、アジュバントとしての有用性

本実施例では、他のがん抗原ペプチドにHERV-H envペプチドを混合してがんワクチンとして用いた場合、相乗的に増強された免疫活性が発揮されることを示す。

[0070] 健常人から実施例4と同様にしてPBMCを採取し、HERV-H#1、NY-ESO-1、CEA、WT1各ペプチド(最終濃度10 μ g/mL)で6日間刺激した後に分離したCD8+細

胞(1×10^6 個)を、IL-2とAPCの存在下で、HERV-H#1、NY-ESO-1、CEA、WT1各ペプチド(最終濃度 $1.0 \mu\text{g/mL}$)にさらにHERV-H#1(最終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$)を添加して24時間刺激し、その培養上清中に含まれるガンマ・インターフェロン値をヒト用Cytometric Bead Arrayキットで測定した(つまり、HERV-H env群ではHERV-H#1単独の刺激であり、その他の群も含め、ペプチド濃度としては最終濃度 $1.5 \mu\text{g/mL}$ となる)。その結果を図6にグラフ化した。なお、コントロールとして、HERV-H#1だけを $0.5 \mu\text{g/mL}$ になるように添加したものをを用いた。

[0071] 図6に示されるように、各ペプチド単独で刺激したときと比べ、それらにHERV-H envペプチドを加えることによって、ガンマ・インターフェロンの産生能は相乗的に増強した。このように、HERV-H envペプチドが既存のペプチドワクチン療法で付加的に追加されたとき、アジュバントとして有用であることが示される。

[0072] [実施例6] 抗HLA抗体によるHERV-H env特異的CTL誘導の阻害

本実施例では、HERV-H envペプチドによる特異的CTL誘導が抗HLA抗体によって阻害されることを示す。

[0073] 実施例4と同様にして健常人から採取したPBMCを、抗HLA抗体(最終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$)を添加した培地を用いて、HERV-H#1(最終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$)で6日間刺激培養した。その後、Miltenyi社の抗体結合MACSビーズ法でCD8+細胞を分離した。このCD8+細胞の細胞障害性を評価するため、標的細胞としてのヒト大腸癌細胞株COL0320とCD8+細胞とを、CD8+細胞:COL0320腫瘍細胞 = 6.25:1、12.5:1、25:1、50:1の割合で6時間混合培養し、Immunocyto Cytotoxicity Detection Kit(MBL社)を用いて殺傷された腫瘍細胞を検出し、添付プロトコールに準じて腫瘍特異的障害率を算出した。なお、抗HLA抗体非添加の培地を用いて刺激培養した以外は同様に処理をした抗HLA抗体非添加群を対照とした。

[0074] 図7に示されるように、刺激培養の際に抗HLA抗体を添加した群においては非添加群(対照)に比較して殺傷された腫瘍細胞率が顕著に低下した。

[0075] 抗HLA抗体を添加してPBMC上のHLA抗原に対するHERV-H env抗原ペプチドの

結合を阻害することにより、殺傷された腫瘍細胞率が顕著に減少したことは、HERV-H envペプチドによって誘導されたCD8+細胞の多くが、腫瘍細胞上でHLAとともに提示されるHERV-H env抗原を特異的に認識し、腫瘍細胞を殺傷するCD8+陽性細胞障害性T細胞であることを示す。

[0076] [実施例7] HERV-H env ペプチドによるCD8+細胞のin vivoでの増殖

本実施例では、HERV-H envペプチドの刺激によって、免疫不全マウス体内において、CD8+細胞が自己増殖することを示す。

[0077] まず、実施例4に記載の方法に従い、PBMCをHERV-H#1(最終濃度10 μ g/mL)で刺激培養することによりCD8+細胞を得た。対照群のCD8+細胞は同濃度のHERV-H#1の代わりにNY-ES0-1ペプチド(配列番号23)で刺激培養することにより得た。このCD8+細胞を蛍光色素PKH67(Sigma社)と混合し、10分間インキュベートすることにより蛍光標識した。

[0078] 2x10⁶個のPKH67標識CD8+細胞、同一健常人より採取したPBMC(2x10⁷個)、およびペプチド(HERV-H envまたはNY-ES0-1(対照群)、共に一匹当たり100 μ g)を、免疫不全マウス(SCIDマウス、日本クレア社)の尾静脈から投与した。投与から5日後、マウスの脾臓細胞と末梢血細胞を採取し、フローサイトメトリー(BD社)によってPKH67標識CD8+細胞の割合を測定した。なお、ペプチドを投与しない以外、同じ処理をしたマウスを対照とした。

[0079] 図8に示すように、HERV-H envペプチドあるいはNY-ES0-1ペプチドのいずれの場合においても、ペプチドを投与したマウス群では、ペプチド非投与のマウス群に比較して、体内でCD8+細胞の割合が高く、ペプチドの投与によってCD8+細胞の増殖が促進されていたことが示された。さらに、ペプチドをマウスに投与しない場合、HERV-H envペプチドで誘導されたCD8+細胞では、NY-ES0-1ペプチドで誘導されたCD8+細胞と比べ、細胞の自己増殖が低く、なおかつ、ペプチドを投与することによって、HERV-H envペプチドで誘導されたCD8+細胞は、NY-ES0-1ペプチドで誘導されたCD8+細胞と比べ、より増殖活性が強かった。つまり、HERV-H envペプチドで誘導されたCD8+細胞は、NY-ES0-1ペプチドで誘導されたCD8+細胞と比較して、より抗原特異的に増殖すると考え

られた。なお、この傾向は、脾臓内、末梢血内ともに、同様に観察された。

[0080] 以上の結果は、HERV-H envペプチドで誘導されたCD8+細胞が、生体内で増殖することを示し、さらに、その増殖におけるHERV-H envペプチド抗原特異性が高いことを示している。よって、HERV-H envペプチドは、生体におけるワクチン療法に、より有効である。

[0081] [実施例 8] 内因性HERV-H envとSnailを発現する腫瘍細胞におけるHERV-H envとSnailの機能とその抑制

本実施例は、内因性HERV-H envとSnailを発現する腫瘍細胞において、HERV-H envとSnailが細胞浸潤に関与することを示し、HERV-H env遺伝子またはSnail遺伝子の発現抑制によって大腸癌細胞の浸潤を抑制できることを示す。

[0082] まず、PEI complex法 (Polyplus 社) により、ヒト大腸癌細胞株COL0320細胞に、HERV-H envまたはsnailを特異的に阻害するsiRNA (配列番号 10~19)、あるいはInvitrogen社製のコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号 20、21) を導入し、2~3日間培養した。なお、COL0320細胞は、内因性のHERV-H envとSnailを発現する細胞株である。

[0083] 実施例 1 の「RT-PCRによる遺伝子発現解析法」に従って下記のプライマーを用いてRT-PCRを行い、HERV-H env、Snail、Slug、Twist、E-cadherin、Fibronectin、GAPDH (内部標準) の各遺伝子発現を検出した。

HERV-H env用プライマー :

Forward 5' - GGATCCTCTACCTACATGTGTC -3' (配列番号 6)

Reverse 5' - TCAAGGGAATTAGTGGAATAAC -3' (配列番号 7)

Snail用プライマー :

Forward 5' -CAGATGAGGACAGTGGGAAAGG -3' (配列番号 26)

Reverse 5' -ACTCTTGGTGCTTGTGGAGCAG -3' (配列番号 27)

Slug用プライマー :

Forward 5' -AGCGAACTGGACACACATAC -3' (配列番号 28)

Reverse 5' -TCTAGACTGGGCATCGCAG -3' (配列番号 29)

Twist用プライマー :

Forward 5' -GCAAGCTTAGAGATGATGCAGGACG -3' (配列番号 30)

Reverse 5' -GACTCGAGGTGGGACGGGACATGGA -3' (配列番号 31)

E-cadherin用プライマー:

Forward 5' -TTCCTCCCAATACATCTCCCTTCACAGCAG -3' (配列番号 32)

Reverse 5' -CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA -3' (配列番号 33)

Fibronectin用プライマー:

Forward 5' -CCGTGGGCAACTCTGTC -3' (配列番号 34)

Reverse 5' -TGCGGCAGTTGTCACAG -3' (配列番号 35)

GAPDH用プライマー:

Forward 5' -GTCAACGGATTTGGTCGTATT -3' (配列番号 8)

Reverse 5' -ATCACTGCCACCCAGAAGACT -3' (配列番号 9)

- [0084] さらに、各siRNAの導入後2～3日間培養したヒト大腸癌細胞株COL0320細胞を回収し、実施例1の「細胞浸潤能の測定法」に従い、細胞膜が下層に浸潤している細胞数(膜浸潤細胞数)を計数した。
- [0085] 図9Aに示されるように、siRNA非導入群(None)においてHERV-H envの発現が検出され、COL0320細胞が内因性のHERV-H envを発現していることが確認された。また、HERV-H env発現をsiRNAによって阻害した場合に(HERV#1～4)、HERV-H envの遺伝子発現量が減少し、同時にSnail、Slug、Twist、Fibronectinの発現量が低下し、E-cadherinの発現量は増加した。これらは上皮-間充織転換を制御することが知られる遺伝子群であって、HERV-H env発現を阻害することによって、腫瘍の悪性度が減少することを示している。また図9Bに示されるように、HERV-H envあるいはSnailの発現を阻害するsiRNAを導入した場合、膜浸潤細胞数が減少した。
- [0086] このように、HERV-H envおよびSnailを発現しているがん細胞において、HERV-H envあるいはSnailの発現を阻害することにより、がん細胞の細胞浸潤能は顕著に低下する。従って、HERV-H envの機能を抑制することができる機能抑制物質は、抗がん剤として有用である。
- [0087] [実施例9]内因性HERV-H envを発現する腫瘍細胞におけるHERV-H envの機能

とその抑制

本実施例は、内因性HERV-H envを高発現するがSnailを発現しない腫瘍細胞において、HERV-H envが細胞浸潤に関与することを示し、HERV-H env遺伝子の発現抑制によって大腸癌細胞の浸潤を抑制できることを示す。

[0088] まず、PEI complex法 (Polyplus 社) により、ヒト大腸癌細胞株SW837細胞に、HERV-H envを特異的に阻害するsiRNA (配列番号10~19)、あるいはInvitrogen社製のコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号20、21) を導入し、2~3日間培養した。なお、SW837細胞は、Snailは発現しないが、HERV-H envを発現する細胞株である。

[0089] 実施例1の「RT-PCRによる遺伝子発現解析法」に従って、実施例8に記載の配列番号6~9、26~35のプライマーを用いてRT-PCRを行い、HERV-H env、Snail、Slug、Twist、E-cadherin、Fibronectin、GAPDH (内部標準) の各遺伝子発現を検出した。

[0090] さらに、上記のように各siRNAの導入後2~3日間培養したヒト大腸癌細胞株SW837細胞を回収し、実施例1の「細胞浸潤能の測定法」に従い、細胞膜が下層に浸潤している細胞数 (膜浸潤細胞数) を計数した。

[0091] 図10Aに示されるように、siRNA非導入群 (None) においてHERV-H envの発現が検出され、SW837細胞がHERV-Hを発現していることが確認された。また、HERV-H発現をsiRNAによって阻害した場合に (HERV#1~4)、HERV-H envの遺伝子発現量が減少し、同時にSlug、Twist、Fibronectinの発現量が低下し、E-cadherinの発現量は増加した。これらは上皮-間充織転換を制御することが知られる遺伝子群であって、HERV-H env発現を阻害することによって、腫瘍の悪性度が減少することを示している。また図10Bに示されるように、HERV-H env発現を阻害するsiRNAを導入した場合、対照と比較して膜浸潤細胞数が減少した。

[0092] このように、HERV-H envを発現しているがん細胞において、HERV-H envの発現を阻害することにより、がん細胞の細胞浸潤能が顕著に低下する。従って、HERV-H envの機能を抑制することができる機能抑制物質は、抗がん剤と

して有用である。

[0093] [実施例 10] 内因性HERV-H envとSnailを発現する腫瘍細胞におけるHERV-H envとSnailの機能とその抑制

本実施例は、内因性HERV-H envとSnailを発現する腫瘍細胞において、HERV-H envとSnailが細胞浸潤に関与することを示し、HERV-H env遺伝子またはSnail遺伝子の発現抑制によって膀胱癌細胞の浸潤を抑制できることを示す。

[0094] まず、PEI complex法 (Polyplus 社) により、ヒト膀胱癌細胞株MIAPaca細胞に、HERV-H envを特異的に阻害するsiRNA (配列番号10~19) またはsnailを特異的に阻害するsiRNA (siRNA-snail#2) (配列番号36、37)、あるいはInvitrogen社製のコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号20、21) を導入し、2~3日間培養した。なお、MIAPaca細胞は、内因性のHERV-H envとSnailを発現する細胞株である。

siRNA-snail#2:

Sense: CCCACUCAGAUGUCAAGAAAdTdT (配列番号36)

Antisense: UUCUUGACAUCUGAGUGGGdTdT (配列番号37)

[0095] 実施例1の「RT-PCRによる遺伝子発現解析法」に従って、実施例8に記載の配列番号6~9、26~35のプライマーを用いてRT-PCRを行い、HERV-H env、Snail、Slug、Twist、E-cadherin、Fibronectin、GAPDH (内部標準) の各遺伝子発現を検出した。

[0096] さらに、上記のように各siRNAの導入後2~3日間培養したヒト膀胱癌細胞株MIAPaca細胞を回収し、実施例1の「細胞浸潤能の測定法」に従い、細胞膜が下層に浸潤している細胞数 (膜浸潤細胞数) を計数した。

[0097] 図11Aに示されるように、siRNA非導入群 (None) においてHERV-H envおよびSnailの発現が検出され、MIAPaca細胞が内因性のHERV-H envおよびSnailを発現していることが確認された。また、HERV-H envあるいはSnailの発現をsiRNAによって阻害した場合に (HERV#1~4)、HERV-H envの遺伝子発現量が減少し、同時に上皮-間充織転換を制御することが知られる遺伝子群 (Snail、Slug、Twist、Fibronectin) の発現量が低下し、E-cadherinの発現量は

増加した。これらは上皮-間充織転換を制御することが知られる遺伝子群であって、HERV-H env発現を阻害することによって、腫瘍の悪性度が減少することを示している。また図11Bに示されるように、HERV-H envまたはSnailの発現を阻害するsiRNAを導入した場合、対照と比較して膜浸潤細胞数が減少した。

[0098] このように、HERV-H envおよびSnailを発現しているがん細胞において、HERV-H envあるいはSnailの発現を阻害することにより、がん細胞の細胞浸潤能が顕著に低下する。従って、HERV-H envの機能を抑制することができる機能抑制物質は、抗がん剤として有用である。

産業上の利用可能性

[0099] 本発明によって、HERV-H env遺伝子及びタンパク質を利用したがんの診断方法及び治療方法、特に、HERV-H env遺伝子の発現を検出することによりがんを診断する方法とそれに用いる診断剤、HERV-H env遺伝子の機能を抑制することによりがんを治療する方法とそれに用いる抗がん剤、HERV-H envタンパク質の特定の配列を有するペプチドなどを投与することによりがんを治療する方法とそれに用いるがんワクチンを提供することができるようになった。

請求の範囲

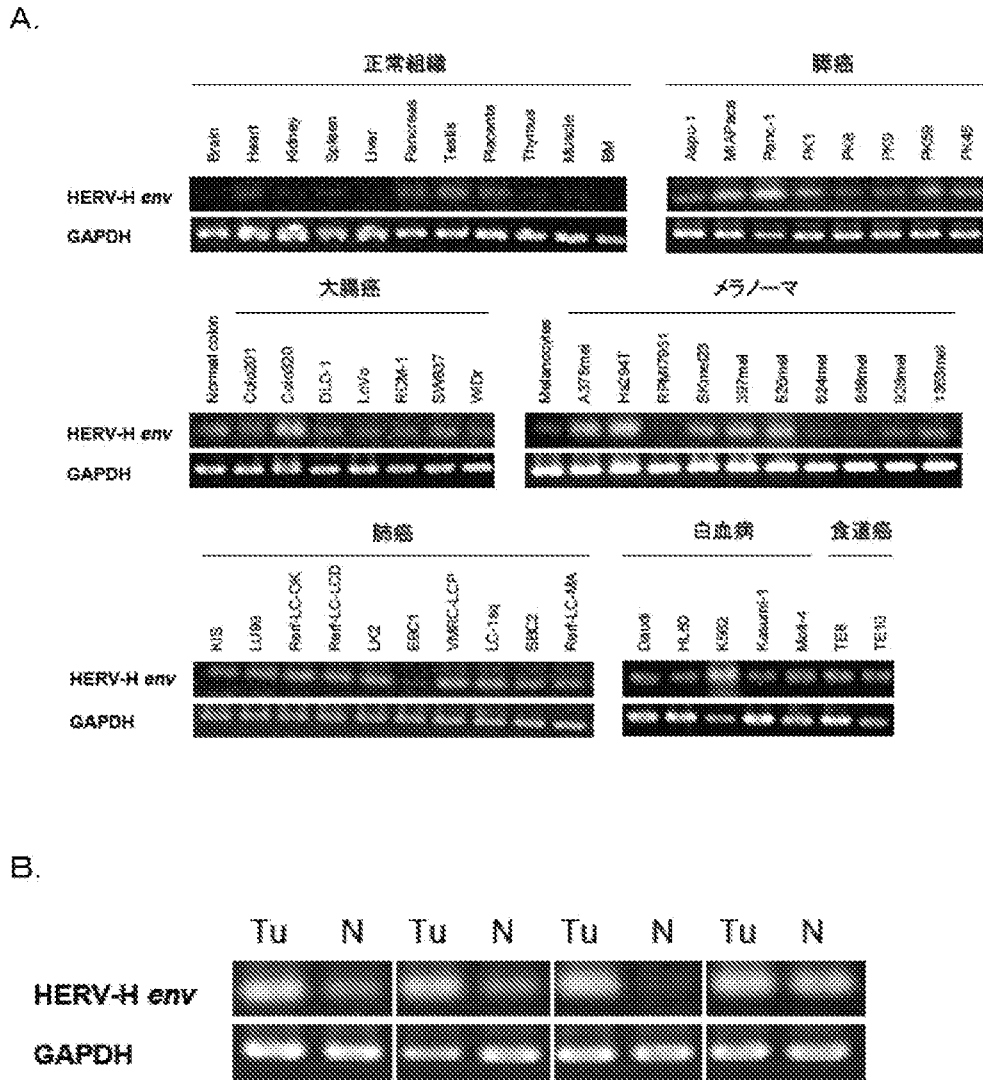
- [請求項1] HERV-H env遺伝子の機能を抑制する機能抑制物質を含有することを特徴とする医薬組成物。
- [請求項2] 前記機能抑制物質がHERV-H env遺伝子の発現を抑制することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記機能抑制物質がsiRNAであることを特徴とする請求項2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかの医薬組成物を含む抗がん剤。
- [請求項5] 配列番号3～5のいずれかの配列を有するペプチド。
- [請求項6] 配列番号3～5のいずれかの配列を有するペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞。
- [請求項7] 請求項6に記載の抗原提示細胞によって誘導され、HERV-H env抗原を発現しているがん細胞を認識するT細胞。
- [請求項8] 細胞障害性T細胞であることを特徴とする請求項7に記載のT細胞。
- [請求項9] 配列番号3～5から選択される一つ以上のペプチド、前記ペプチドを発現する発現ベクター、請求項6に記載の抗原提示細胞、または請求項7または8に記載のT細胞を含有するがんワクチン。
- [請求項10] Snailタンパク質またはHERV-H env抗原を発現するがん細胞に対するがんワクチンであることを特徴とする請求項9に記載のがんワクチン。
- [請求項11] 配列番号3～5から選択される一つ以上のペプチド、及び前記ペプチド以外のがん抗原ペプチドを含有するがんワクチン。
- [請求項12] ヒト以外の脊椎動物に対し、請求項9～11のいずれか1項に記載のがんワクチンを用いたがんの治療・予防方法。
- [請求項13] HERV-H env遺伝子の発現を検出し得るPCR用プライマー・ペアまたは抗HERV-H env抗体を含有するがんの診断剤。
- [請求項14] 前記PCR用プライマー・ペアが、配列番号6及び配列番号7を有す

ることを特徴とする請求項 13 に記載の診断剤。

[請求項15] 前記がんが、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肺癌、白血病、食道癌であることを特徴とする請求項 13 または 14 に記載の診断剤。

[請求項16] 請求項 13 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の診断剤を含むがんの診断キット。

[図1]

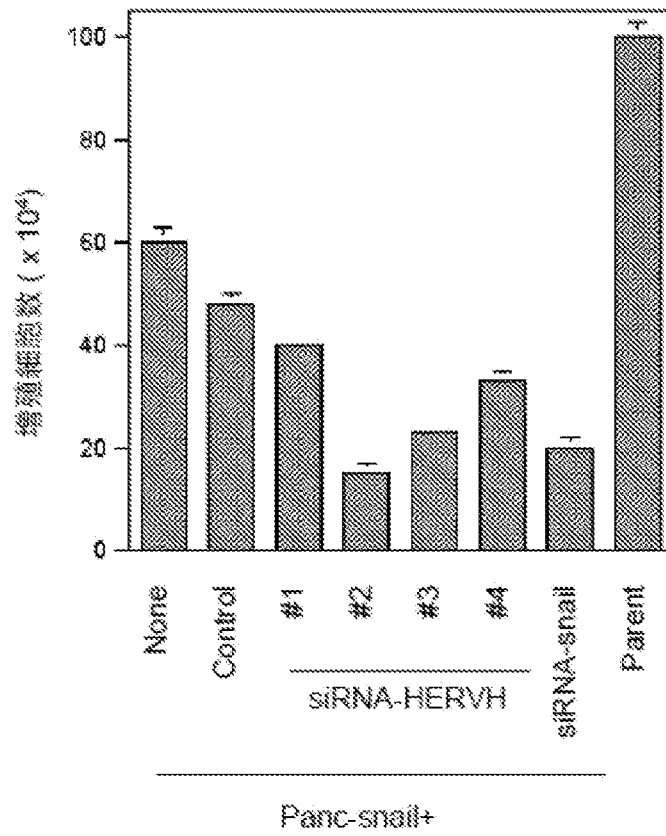


[図2]

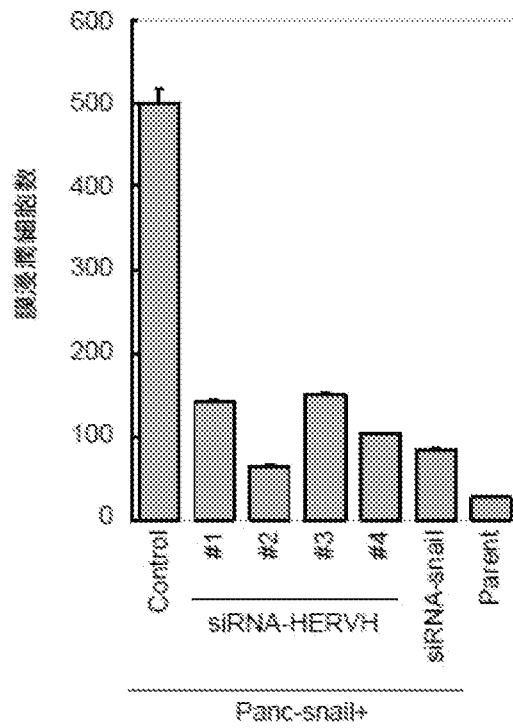
Panc-1 cells	Cellular shape	Snail		E-cadherin		Cellular functions				
		gene	protein	gene	protein	Proliferation		Adhesion	Migration	Invasion
						vitro	vivo			
Parent	round	+/-	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+/-	+/-
D6	spindle/spreading	++	+	+++	+	++	++	+	+	++
D10	spindle/spreading	+++	++	+++	+	++	+	+	+++	+++
F3	spindle/spreading	+++	+++	+	+	+	+	+	++	+++
F5	spindle/spreading	++	++	+++	++	++	+	+	++	++

[図3]

A.

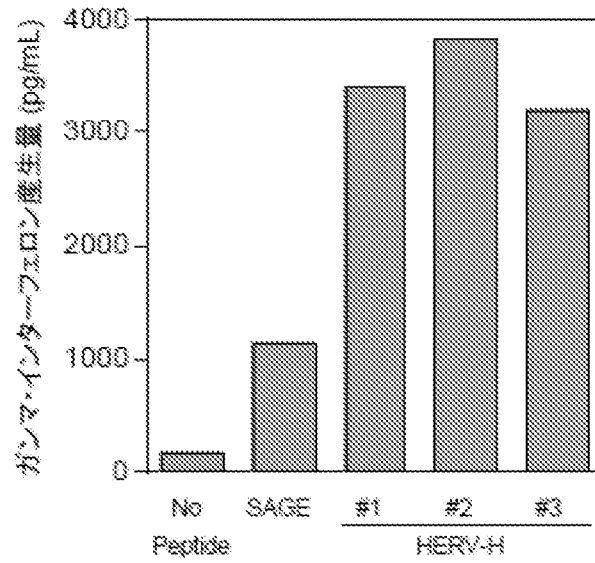


B.

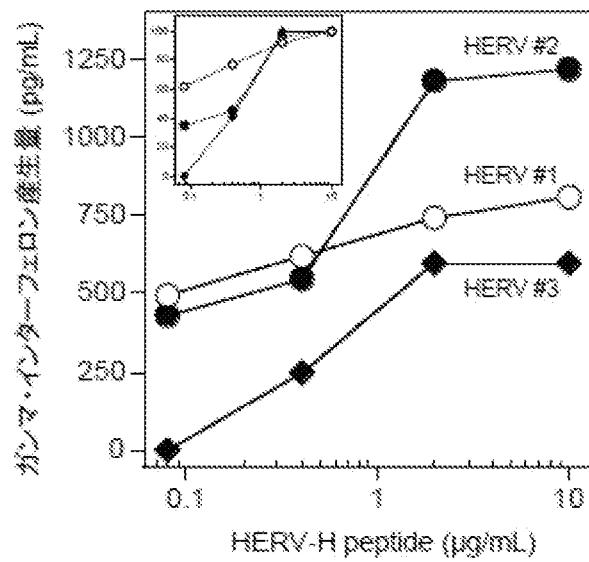


[図4]

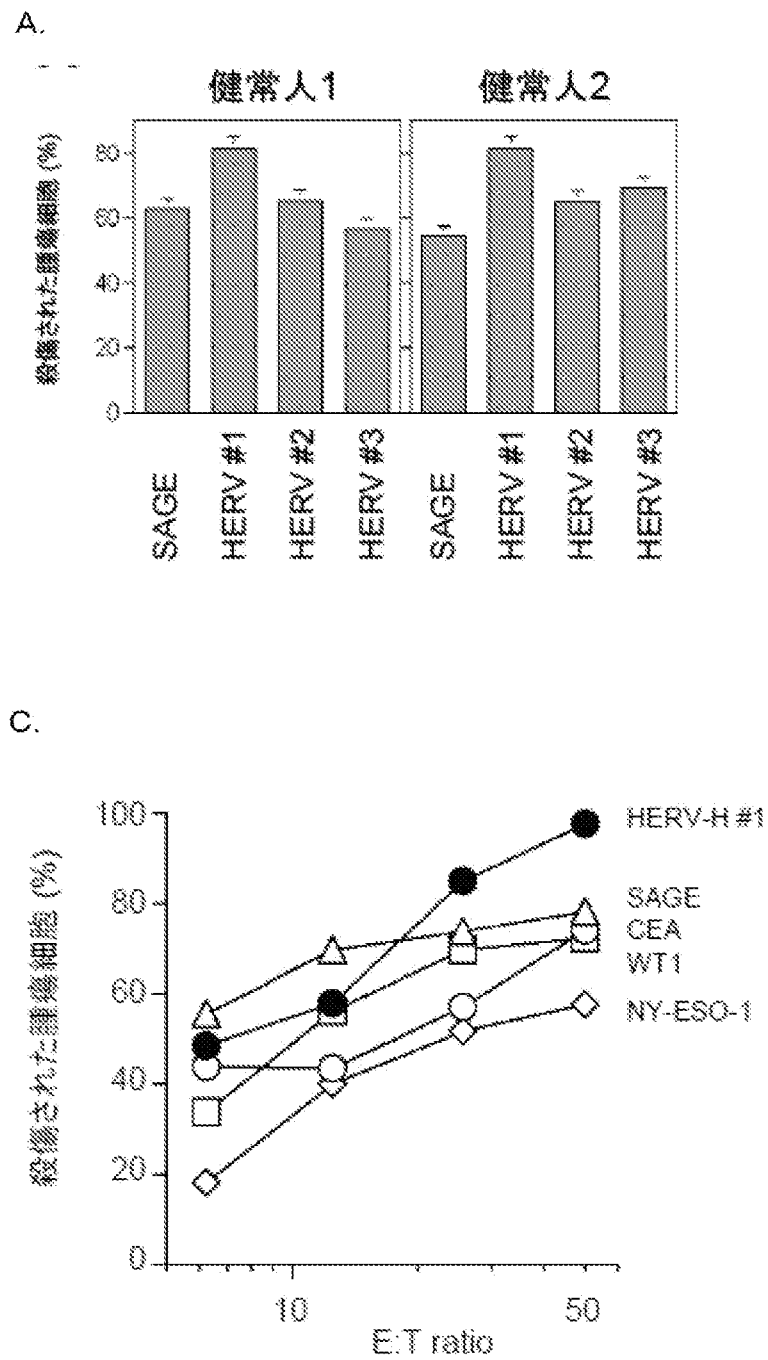
A.



B.

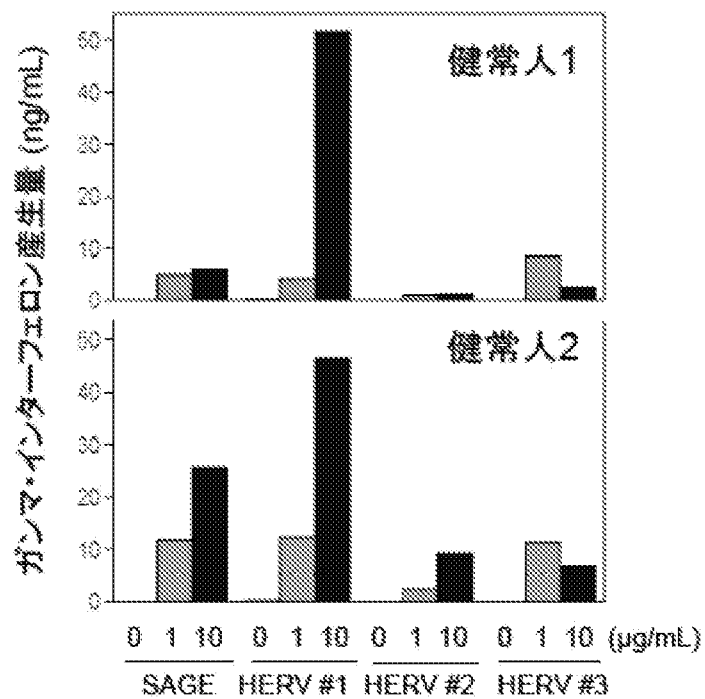


[図5-1]

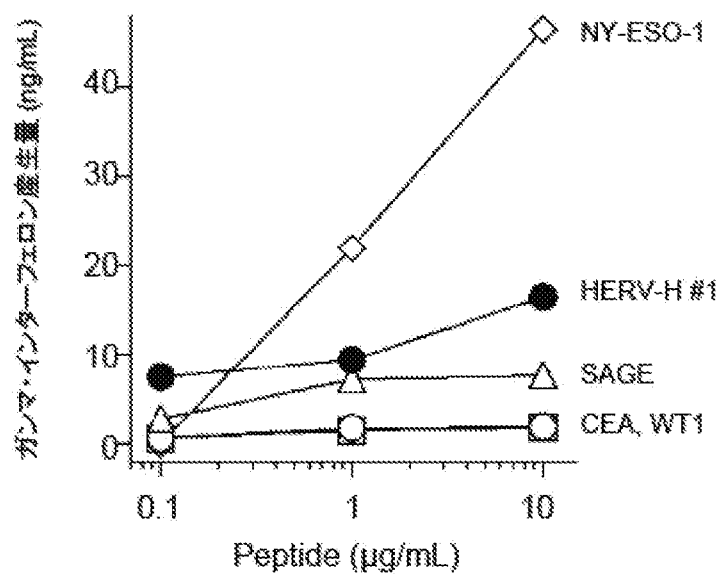


[図5-2]

B.

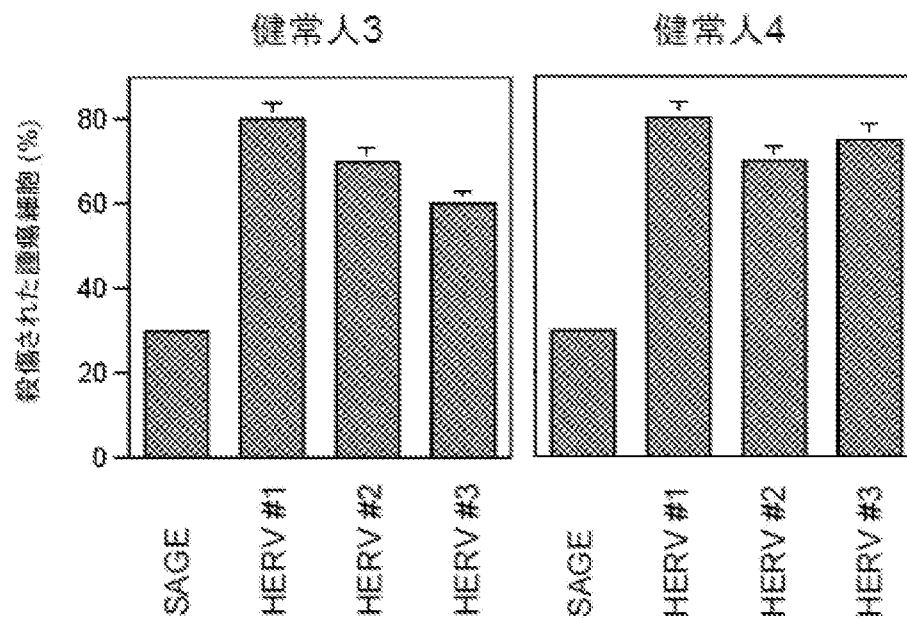


D.

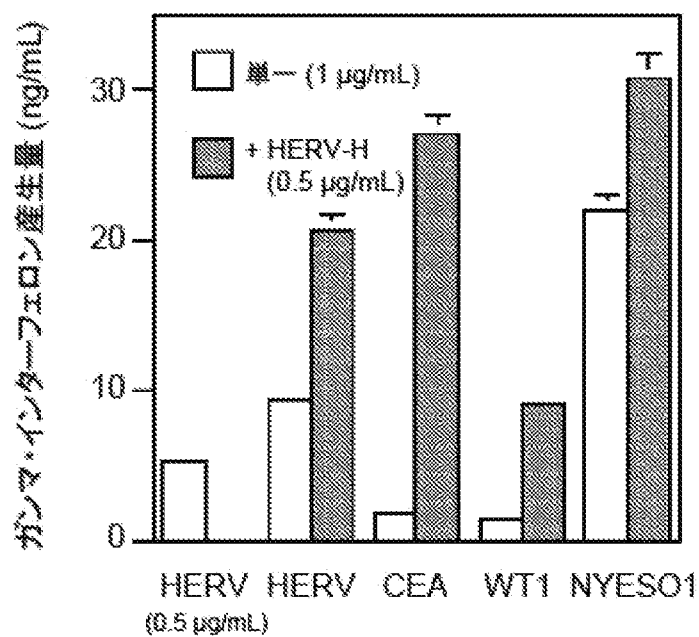


[図5-3]

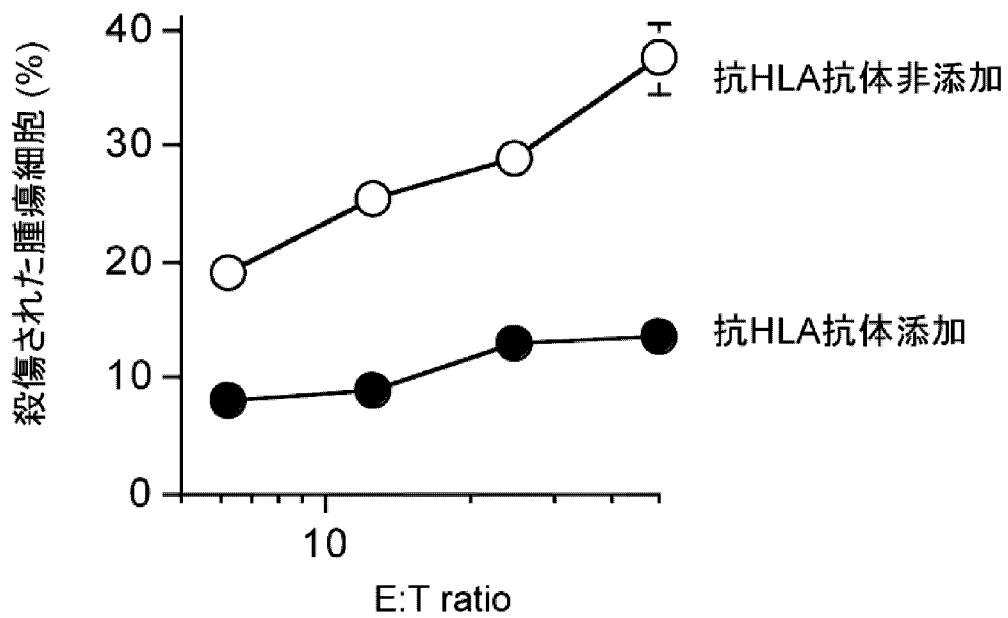
E.



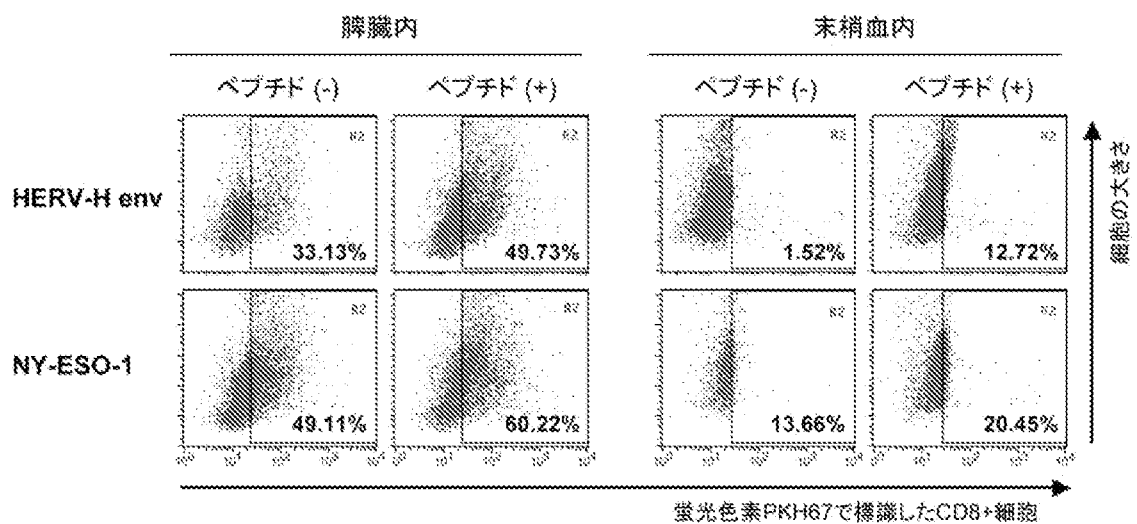
[図6]



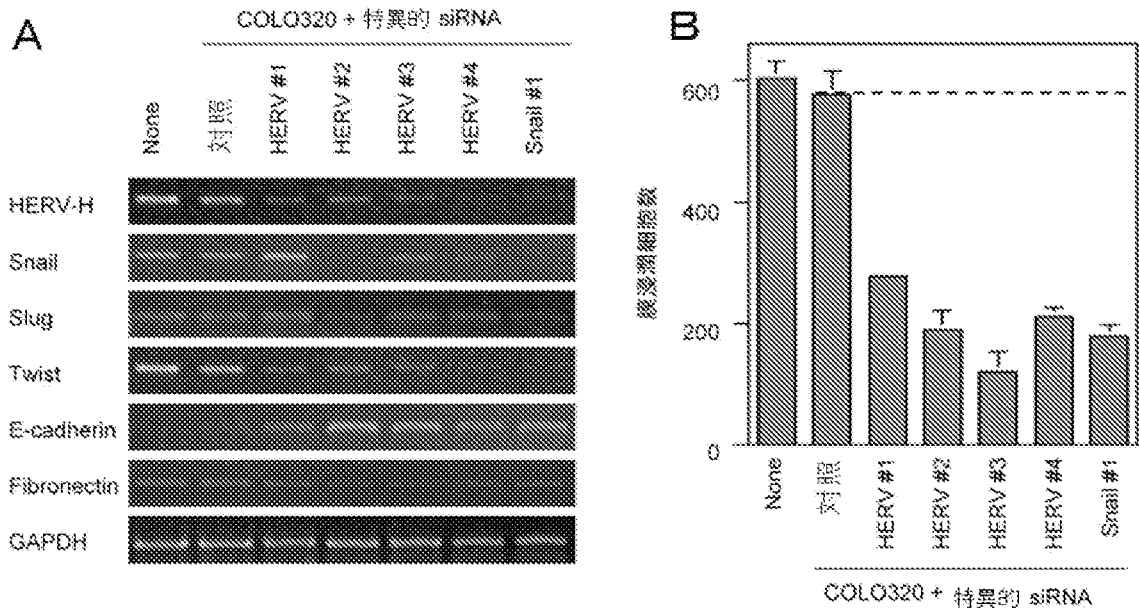
[図7]



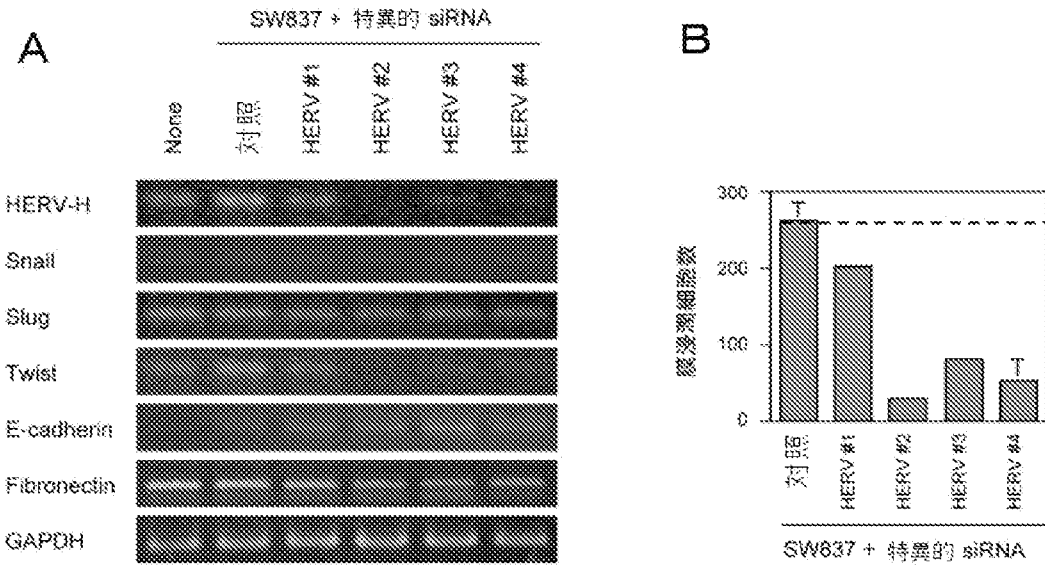
[図8]



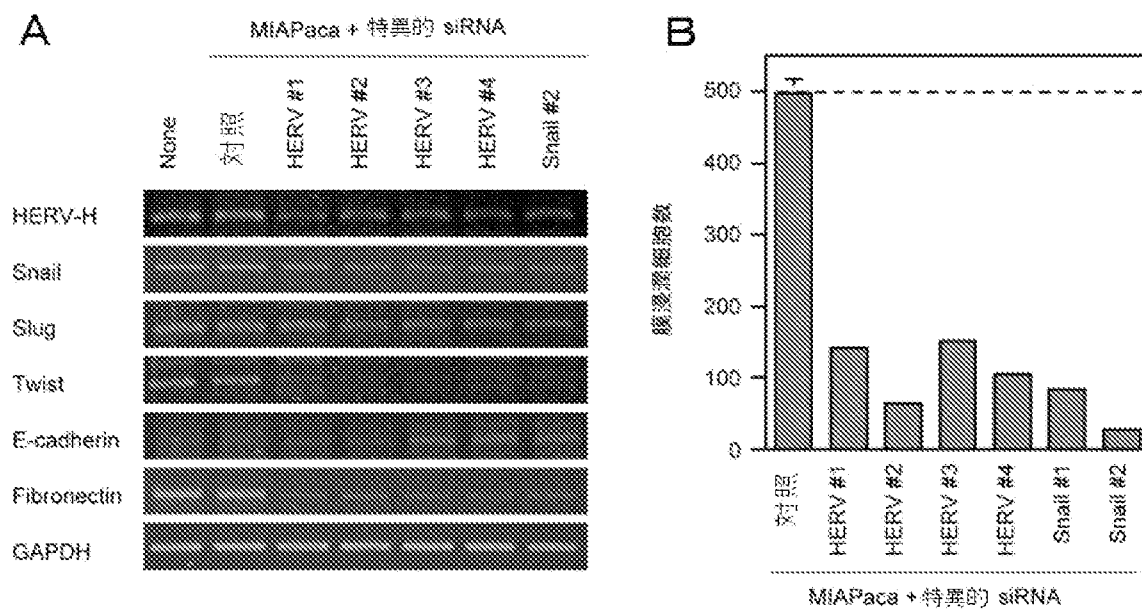
[图9]



[图10]



[图11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K31/713, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/15, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/68

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

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

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Marianne Mangeney et.al., The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties, Journal of General Virology, 2001, Vol.82, P.2515-2518	1-11
Y	Mats Lindeskog et. al., Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame, Virology, 1999, Vol.258, P.441-450	1-11,13-16
Y	JP 2007-246451 A (Keio University), 27 September 2007 (27.09.2007), entire text; particularly, claims (Family: none)	5-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November, 2009 (17.11.09)

Date of mailing of the international search report
01 December, 2009 (01.12.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065955

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/77941 A1 (Keio University), 27 July 2006 (27.07.2006), entire text; particularly, claims (Family: none)	5-11
Y	Patric Jern et. al., Sequence Variability, Gene Structure, and Expression of Full-Length Human Endogenous Retrovirus H, Journal of Virology, 2005, Vol.79, No.10, P.6325-6337	1-4,13-16
Y	Nathalie de Parseval et. al., Characterization of the Three HERV-H Proviruses with an Open Envelope Reading Frame Encompassing the Immunosuppressive Domain and Evolutionary History in Primates, Virology, 2001, Vol.279, P.558-569	1-11,13-16
Y	JP 2004-502407 A (MS Research A/S), 29 January 2004 (29.01.2004), claims; particularly, claim 44 & EP 1265989 A & WO 2001/070941 A2 & AU 5829201 A & CA 2403815 A & IL 151868 D	13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065955

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

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

- 1. Claims Nos.: 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 includes the methods for treatment of the human body or animal body by therapy.

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

Claims 1, 2 and 4 relate to a composition containing, as an active ingredient, a substance defined by a desired property "a function-inhibiting substance capable of inhibiting the function of HERV-H gene" or "a substance capable of inhibiting the expression of HERV-H gene".

These claims include compositions of all of the substances having the above-stated properties. However, it appears that those substances which are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5 are just some of the claimed substances.

Further, even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into consideration, it is impossible to specify the scope of the substance having the property "a function-inhibiting substance capable of inhibiting the function of HERV-H gene" or "a substance capable of inhibiting the expression of HERV-H gene". Therefore, these claims do not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6, either.

Just because some of the desired products are obtained by screening, it does not mean that the scope of the broad invention including substances specified by the function or the property becomes clear. Further, just because the results of pharmacological tests on some "function-inhibiting substances capable of inhibiting the function of HERV-H gene" or some "substances capable of inhibiting the expression of HERV-H gene" are described, it does not mean that the composition of a substance that is defined by a function and therefore can include a various types of and a numerous number of components is fully supported in the description.

Such being the case, in this international search report, the search with respect to claims 1, 2 and 4 was made on the parts wherein the substance is siRNA of HERV-H.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/713, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/15, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、SwissProt/PIR/GeneSeq、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Marianne Mangeney et. al., The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties, Journal of General Virology, 2001, Vol. 82, P. 2515-2518	1-11
Y	Mats Lindeskog et. al., Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame, Virology, 1999, Vol. 258, P. 441-450	1-11, 13-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

17. 11. 2009

国際調査報告の発送日

01. 12. 2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2007-246451 A (学校法人慶應義塾) 2007.09.27, 全文、特に特許請求の範囲 (ファミリーなし)	5-11
Y	WO 2006/77941 A1 (学校法人慶應義塾) 2006.07.27, 全文、特に特許請求の範囲 (ファミリーなし)	5-11
Y	Patric Jern et. al., Sequence Variability, Gene Structure, and Expression of Full-Length Human Endogenous Retrovirus H, Journal of Virology, 2005, Vol.79, No.10, P.6325-6337	1-4, 13-16
Y	Nathalie de Parseval et. al., Characterization of the Three HERV-H Proviruses with an Open Envelope Reading Frame Encompassing the Immunosuppressive Domain and Evolutionary History in Primates, Virology, 2001, Vol.279, P.558-569	1-11, 13-16
Y	JP 2004-502407 A (エムエス リサーチ アクティフ ゼルスカブ) 2004.01.29, 特許請求の範囲、特に請求項44 & EP 1265989 A & WO 2001/070941 A2 & AU 5829201 A & CA 2403815 A & IL 151868 D	13-16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

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

1. 請求項 1 2 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求項 1 2 は「治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

請求項1、2、4は、「HERV-H遺伝子の機能を抑制する機能抑制物質」、「HERV-H遺伝子の発現を抑制する物質」という所望の性質により定義された物質を有効成分とする組成物に関するものである。

これらの請求項は、そのような性質を有するあらゆる物質の組成物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた物質のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「HERV-H遺伝子の機能を抑制する機能抑制物質」、「HERV-H遺伝子の発現を抑制する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する物質の範囲を特定できないから、これらの請求項は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

なお、単にスクリーニングによって目的物がいくつか得られるということをもって、当該機能又は性質で特定された物質を含む広範な発明の範囲が明確となるとは認められないし、また、いくつかの「HERV-H遺伝子の機能を抑制する機能抑制物質」、「HERV-H遺伝子の発現を抑制する物質」について薬理試験結果が記載されていることをもって、機能で特定されており種々の無数の成分を含みうる物質の組成物が明細書において十分に裏付けられていることにもならない。

したがって、本国際調査報告では、請求項1、2及び4については、当該物質がHERV-HのsiRNAであるものについてサーチを行った。