

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4960093号
(P4960093)

(45) 発行日 平成24年6月27日(2012.6.27)

(24) 登録日 平成24年3月30日(2012.3.30)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 Z N A H

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 39/39

A 6 1 P 35/00

G 0 1 N 33/50 Z

請求項の数 8 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2006-524945 (P2006-524945)
 (86) (22) 出願日 平成16年8月30日(2004.8.30)
 (65) 公表番号 特表2007-503817 (P2007-503817A)
 (43) 公表日 平成19年3月1日(2007.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/028234
 (87) 国際公開番号 W02005/021582
 (87) 国際公開日 平成17年3月10日(2005.3.10)
 審査請求日 平成19年8月30日(2007.8.30)
 (31) 優先権主張番号 10/652,993
 (32) 優先日 平成15年8月29日(2003.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 506070051
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ ユニヴァーシティー オブ アーカ
 ンソー
 THE BOARD OF TRUSTE
 ES OF THE UNIVERSIT
 Y OF ARKANSAS
 アメリカ合衆国 アーカンソー州 722
 07-3606 リトル ロック ノース
 ユニヴァーシティー アヴェニュー 2
 404
 (74) 代理人 100082072
 弁理士 清原 義博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵巣癌の早期診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アジュバント、および(ii) 配列番号 191 の配列で表わされるヘプシンタンパク質断片を含む、ヘプシンに対する免疫反応を促進するための免疫組成物。

【請求項 2】

前記ヘプシンタンパク質断片が、ペプチド負荷(peptide-loaded)樹状細胞に存在するかまたは発現ベクターから発現されたものであることを特徴とする請求項1記載のヘプシンに対する免疫反応を促進するための組成物。

【請求項 3】

個体中のヘプシンに対する免疫反応を促進するための組成物であって、前記個体から単離され、かつ請求項1または2記載の免疫組成物の配列を発現するように処理された樹状細胞を含み、前記樹状細胞が前記個体に移入され、前記樹状細胞が前記個体においてヘプシント異的免疫反応を活性化することを特徴とする組成物。

【請求項 4】

個体中のヘプシンに対する免疫反応を促進するための組成物であって、以下の工程：

a) 前記個体から樹状細胞を単離し；

b) 前記樹状細胞において請求項1または2記載の免疫組成物の配列を発現させ；さらに

c) 前記個体から単離されたT細胞を含む免疫細胞を前記樹状細胞に暴露し、それによって該樹状細胞が前記免疫細胞からヘプシント異的T細胞を作成する；

10

20

によって得られるヘプシン特異的 T 細胞を含み、
該ヘプシン特異的 T 細胞が前記個体に移入して戻され、その際に該ヘプシン特異的 T 細胞が個体においてヘプシン特異的免疫反応を活性化し、それによって該個体においてヘプシンを標的とする免疫治療がなされることを特徴とする組成物。

【請求項 5】

ヘプシンに対する免疫活性化細胞を作成する方法であって、
単離した免疫細胞を請求項 1 記載の免疫組成物に暴露する工程を含み、該暴露によって前記免疫細胞が活性化され、それによってヘプシンに対する免疫活性化細胞が産生されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

前記免疫細胞が、B 細胞、T 細胞または樹状細胞であることを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

ヘプシントタンパク質断片に対する単離した免疫細胞の免疫反応を監視する方法であって、
個体から単離した T 細胞により示される免疫反応を測定する；工程を含み、
該免疫反応は、請求項 1 の免疫組成物によって引き起こされ、正常な個体からの細胞により示される免疫反応と比較して免疫反応レベルが高められた場合に、該単離した免疫細胞が、該ヘプシンまたはヘプシンペプチドに対する免疫反応を起こし得ることが示唆されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

前記免疫反応が、前記免疫組成物により誘導された T 細胞増殖、前記免疫組成物に特異的なサイトカイン分泌 T 細胞の頻発、または前記免疫組成物に特異的な T 細胞受容体を発現する T 細胞の頻発より成る群から選択されることを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

概して、本発明は分子生物学および医薬の分野に関する。より詳細には、本発明は癌の研究および診断の分野に属する。

【背景技術】

【0002】

悪性細胞が増殖、拡散または転移するためには、局所の宿主組織に浸潤し、原発性腫瘍から解離または流出し、血流中に進入しさらにその中で生存し、標的組織の表面に侵入することにより移植し、さらに新規のコロニー増殖（血管新生の誘導因子および成長因子の導入を含む）を誘導する環境を確立する能力を有していなければならない。この過程の間に、基底膜および結合組織などの天然組織バリアが崩壊されなければならない。これらのバリアは、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンおよび細胞外マトリックス糖タンパク質を含む。原発性腫瘍を包囲する天然バリアおよび転移性浸潤部位での天然バリアの両方の天然バリアの崩壊は、細胞外プロテアーゼのマトリックスの作用により生じると考えられている。

【0003】

プロテアーゼは、以下の 4 種類のファミリー：セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼおよびシステインプロテアーゼに分類される。多くのプロテアーゼが、ヒト疾患の進行に関与することが認められており、これらの酵素が新規治療薬としての阻害剤開発の標的となっている。一部の特定プロテアーゼが、様々な群の癌において誘導および過剰発現されており、それ自体が早期診断マーカーの潜在的候補であり、可能性のある治療的介入のための標的である。いくつかの例を表 1 に示す。

【0004】

個体のプロテアーゼのダウンレギュレーションまたは阻害、および浸潤能または悪性度の低下を支持する多くの証拠が存在する。Clarkらによる研究では、ヒトの肺小細胞癌の i

10

20

30

40

50

n vitro増殖の阻害が、一般的なセリンプロテアーゼ阻害剤を用いて明らかにされた。より最近になって、Torres-Rosedo らは(1993)、セリンプロテアーゼヘプシン遺伝子に対して特異的なアンチセンス阻害剤を用いて肝癌細胞の増殖の阻害を明らかにした。黒色腫細胞の転移能力もメタロプロテアーゼの合成阻害剤 (batimastat) を用いてマウスモデルにおいて低下することが示されている。Powellら (1993) は、非転移性前立腺癌の細胞株における細胞外プロテアーゼの発現により悪性進行が促進されることを確認する証拠を発表した。具体的には、転移促進が、PUMP-1メタロプロテアーゼ遺伝子の導入後および発現後に示された。相対的に非転移性である細胞型に対する細胞表面のプロテアーゼの発現によりそのような細胞の浸潤能が増大するとの概念を支持する多くのデータも存在する。

【 0 0 0 5 】

10

これまでのところ、卵巣癌は婦人科の悪性過形成を有する女性における第 1 番目の死亡原因であり続けている。このような癌と診断された女性の約 75% は、初回診断時にすでに同疾患の進行病期 (III および IV) に至っている。過去 20 年の間、これら患者に対する診断及び 5 年生存率のいずれも大幅には改善されていない。これは、同疾患が既に進行病期の状態で初めて検出される率が高いことが実質的な原因である。従って、早期診断を改善する新規マーカーを開発し、それによって初回診断時に進行病期で検出される確率を低下させることが未だ課題であり続ける。1 つの組織から離れて別の組織の表面に再度取り付く能力によって、この疾患に関連する罹患率および死亡率がもたらされる。このため、細胞外プロテアーゼは、悪性の卵巣過形成のマーカーとしての優れた候補であると考えられる。

20

【 0 0 0 6 】

従って、先行技術は、特に卵巣癌に対する、早期診断の指標として有用な腫瘍マーカーを欠く。本発明は、当技術分野においてこの長年のニーズと要望を満たす。

【表 1】

表 1

様々な癌において発現される公知のプロテアーゼ

	胃癌	脳腫瘍	乳癌	卵巣癌
セリンプロテアーゼ:	uPA PAI-1	uPA PAI-1 tPA	NES-1 uPA	NES-1 uPA PAI-2
システインプロテアーゼ:	カテプシンB カテプシンL	カテプシンL	カテプシンB カテプシンL	カテプシンB カテプシンL
メタロプロテアーゼ:	マトリライシン* コラゲナーゼ* ストロメライシン-1*	マトリライシン ストロメライシン ゼラチナーゼB	ストロメライシン-3 MMP-8 MMP-9 ゼラチナーゼA	MMP-2

uPA, ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子; tPA, 組織型プラスミノゲン活性化因子; PAI-1, プラスミノゲン活性化因子阻害剤; PAI-2, プラスミノゲン活性化因子阻害剤; NES-1, Normal epithelial cell-specific-1; MMP, マトリックスプロテアーゼ。*消化器潰瘍中に過剰発現

30

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明は、80% の卵巣癌およびその他の腫瘍の表面に特異的に関連することが本明細書中で明らかにされているヘプシンプロテアーゼの存在を示す組織中のヘプシン mRNA をスクリーニングすることにより、例えば卵巣癌などの癌の検出を可能とする。プロテアーゼは、腫瘍の増殖および転移に不可欠な要素と考えられていることから、その存在有無を示すマーカーは癌の診断に有用である。さらに本発明は、治療 (すなわち、ヘプシンの阻害またはヘプシン発現の阻害による)、標的療法およびワクチン接種などに対して有用

50

である。

【 0 0 0 8 】

本発明の一態様において、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞または腎臓癌細胞に対するマーカーとして有用であるヘプシントタンパク質の変異体またはその断片を提供する。

【 0 0 0 9 】

別の一実施形態では、本発明は、個体にヘプシンに対するワクチン接種を行う方法を提供するか、またはヘプシントタンパク質またはその断片をコードする発現ベクターを個体に接種することによりヘプシンに対する免疫活性化細胞を作成する方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、個体におけるヘプシンを標的とする免疫治療法であって、個体から採取した末梢血から *in vitro* で樹状細胞を作成し、これらの樹状細胞にヘプシントタンパク質またはその断片を負荷し (loading)、次にこれらの樹状細胞を単回投与または複数回投与でその個体に戻す手順を含む。ヘプシン負荷 (hepsin-loaded) 樹状細胞またはヘプシン発現樹状細胞は、*in vitro* のヘプシン特異的 T 細胞反応の刺激にも用いることができ、続いて該個体が自己由来のヘプシン特異的 T 細胞を投与される養子免疫療法が実施される。

【 0 0 1 1 】

ヘプシンまたはヘプシンペプチドを用いた個体へのワクチン接種の効果を監視する方法も提供される。該方法は、該ヘプシンまたはヘプシンペプチドに应答する免疫反応を測定することを含み、該ヘプシンまたはヘプシンペプチドへの免疫反応の誘導が、該個体が前記ヘプシンまたはヘプシンペプチドでワクチン接種されたことを示唆することを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の実施形態では、アンチセンスヘプシン mRNA をコードするベクターまたはヘプシントタンパク質と結合する抗体を細胞中に導入することにより細胞中のヘプシンの発現を阻害する方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

さらに別の実施形態では、化合物を個体に投与する工程を含み、化合物は標的部分および治療的部分を有し、該標的部分がヘプシンに対して特異的であることを特徴とする個体への標的治療の方法が提供される。

【 0 0 1 4 】

さらに別の実施形態において、配列番号 1 8 8 に相補的である配列を有するヘプシントタンパク質の免疫性断片またはオリゴヌクレオチドを含む組成物が提供される。また、有効量のオリゴヌクレオチドによって、新生物症状 (neoplastic state) の治療をこのような治療を必要とする個体に対して行う方法が実施されている。

【 0 0 1 5 】

一般的に、前記方法で述べられたヘプシンまたはヘプシンの断片は、配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を有する変異体などのヘプシン変異体と野生型ヘプシンとの両方を対象とする。

【 0 0 1 6 】

本発明のその他および更なる態様、特徴および利点は、以下に記載の本発明の現在における好ましい実施形態の説明から明らかになる。これらの実施形態は開示目的で記載されている。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

本発明は、卵巣癌細胞のマーカーとしてヘプシンプロテアーゼまたはヘプシン変異体を特定した。他のプロテアーゼと多様に組み合わせ、ヘプシンの発現は個々の腫瘍型の特性を示す。そのような情報は診断検査 (アッセイまたは免疫組織化学) および予後評価 (表現パターンにより特定される) の基礎となる。

【 0 0 1 8 】

腫瘍増殖、浸潤および転移の長期的な治療は、既存の化学療法剤では成功していない。

10

20

30

40

50

化学療法を複数サイクル実施後、大部分の腫瘍は薬剤に対して耐性となる。本発明は、新規薬剤の設計のために、抗体、プロテアーゼ阻害剤またはプロテアーゼに対するアンチセンス手段のいずれかを用いた新規な治療的介入の標的として、ヘプシンおよびヘプシントタンパク質変異体を特定する。

【0019】

一般的に、以下の様々な実施形態で言及しているヘプシンの用語は、野生型ヘプシンおよびヘプシン変異体の両方を指す。ヘプシン変異体の1例は配列番号195のアミノ酸配列を有する。

【0020】

一実施形態において本発明は、個体にヘプシンに対するワクチン接種を行う方法に関するものであり、(i)ヘプシントタンパク質またはそのペプチドをコードする発現ベクターまたは(ii)ペプチドを負荷された樹状細胞を、個体に接種する工程を含む。ヘプシンまたはそのペプチドの発現は、個体で免疫反応を誘導し、それによって個体にヘプシンに対するワクチン接種を行う。個体が、例えば卵巣癌、肺癌、前立腺癌および結腸癌などの癌を患っているか、またはそれら癌に罹患する危険性がある場合には、一般的にこの方法が適応可能である。好ましいヘプシンペプチドの配列は、配列番号28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190および191である。他の実施形態では、該ヘプシントタンパク質またはそのペプチドは、配列番号195のアミノ酸配列を有するヘプシン変異体に由来する。

【0021】

本発明はまた、ヘプシントタンパク質またはその断片に免疫細胞を暴露する工程を含む、ヘプシンに対する免疫活性細胞を作成する方法も提供する。通常、ヘプシントタンパク質またはその断片への暴露により免疫細胞が活性化し、それによってヘプシンに対する免疫活性細胞を産生する。一般的に、免疫活性細胞は、B細胞、T細胞および/または樹状細胞である。好ましくは、ヘプシン断片は9残断片から20残基断片であり、より好ましくは配列番号28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190または191である。別の一実施形態では、該ヘプシントタンパク質または断片は配列番号195のアミノ酸配列を有するヘプシン変異体に由来する。多くの場合、樹状細胞は暴露に先立ち個体から単離され、さらに暴露に続いて個体に再導入される。典型的には個体は、例えば卵巣癌、肺癌、前立腺癌および結腸癌などの癌に罹患しているか、またはそれら癌に罹患する危険性がある。

【0022】

本発明は、個体においてヘプシンを標的とする免疫治療法も提供する。一実施形態では、該方法は、個体から採取された抹消血からin vitro樹状細胞を作成し、リポフェクションまたはその他の手段によりヘプシントタンパク質またはその断片をこれらの樹状細胞に負荷し、続いてこれらの樹状細胞を単回投与または複数回投与により同個体に戻すことを含む。ヘプシンは、組換えDNAベクターによる形質導入後に、これらの樹状細胞において発現されてもよい。または、ヘプシン負荷樹状細胞またはヘプシン発現樹状細胞を用いてin vitroでヘプシン特異的T細胞反応を誘導し、続いて該個体に自己のヘプシン特異的T細胞が投与される養子免疫療法を実施することが可能である。典型的には、個体は、例えば卵巣癌、肺癌、前立腺癌および結腸癌などの癌に罹患しているか、またはそれら癌に罹患する危険性がある。一般的に完全長または断片のヘプシントタンパク質は単離された樹状細胞中に発現される。好ましくは、断片は9残基断片から20残基断片であり、配列番号28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190または191であることがさらに好ましい。または、ヘプシントタンパク質またはその断片は、配列番号195のアミノ酸配列を有するヘプシン変異体に由来するものであってもよい。

【0023】

配列番号 28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190または191に示されるようなヘプシンまたはヘプシンペプチドを用いて、個体にワクチン接種することの効果を確認する方法も提供されている。該方法は、ワクチン接種された個体から得たT細胞またはCD8⁺T細胞を単離する工程、および該ヘプシンまたはヘプシンペプチドに特異的な免疫反応を測定する工程を含む。免疫反応が、正常な個体から得た細胞により示された免疫反応に比べて高められた場合に、該個体が該ヘプシンまたはヘプシンペプチドによってワクチン接種されたことが示唆される。一般的に、ヘプシン特異的T細胞の増殖量が増加する、ヘプシン特異的T細胞の頻度が増加する、またはヘプシン特異的サイトカイン分泌T細胞の頻度が増加する場合には、個体はヘプシンに対してワクチン接種されている。テトラマー分析およびエリスポットアッセイなどの当業界で周知の標準的アッセイを用いて、ヘプシン特異的T細胞の頻度およびヘプシン特異的サイトカイン分泌T細胞の頻度をそれぞれ測定することができる。

10

【0024】

本発明の別の態様では、細胞中のヘプシンの発現を阻害する方法を提供し、その方法は、配列番号188に相補的な配列を含むベクターを細胞中に導入する工程を含み、ベクターの発現によって細胞中にヘプシンアンチセンスRNAが産生される。ヘプシンアンチセンスRNAは内因性mRNAにハイブリダイズすることによって、細胞中のヘプシンの発現を阻害する。

【0025】

20

ヘプシンの発現は抗体によっても阻害することができる。ヘプシントタンパク質またはその断片に特異的な抗体を細胞に導入し、ヘプシンに抗体が結合するとヘプシントタンパク質が阻害される。好ましくは、ヘプシン断片は9残基断片から20残基断片までであり、より好ましくは、断片は、配列番号28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190または191である。別の一実施形態では、該ヘプシントタンパク質またはその断片は配列番号195のアミノ酸配列を有するヘプシン変異体に由来する。

【0026】

本発明はまた、個体への標的治療の方法に関するものであり、その方法は、標的部分および治療的部分を含む化合物を個体に投与する工程を含み、治療的部分がヘプシンに特異的であることを特徴とする。好ましくは、標的部分は、ヘプシンに特異的な抗体、またはヘプシンと結合するリガンドまたはリガンド結合領域である。同様に治療的部分は好ましくは、放射性同位元素、毒素、化学療法剤、免疫刺激剤または細胞毒性剤である。一般的に個体は、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌またはその他ヘプシンが過剰発現される癌などの疾患に罹患している。

30

【0027】

本発明はさらに、適切なアジュバントおよび免疫原性完全長ヘプシントタンパク質またはその断片を含む免疫組成物に関するものである。好ましくは、断片は9残基断片から20残基断片であり、より好ましくは、配列番号28、29、30、31、88、89、108、109、128、129、148、149、150、151、152、153、154、189、190または191である。別の一実施形態では、該ヘプシントタンパク質または断片は配列番号195のアミノ酸配列を有するヘプシン変異体に由来する。

40

【0028】

本発明はまた、配列番号188またはその断片に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドも提供する。本発明はさらに、上記オリゴヌクレオチドおよび生理的に許容可能な担体を含む組成物、ならびに、有効用量の上記オリゴヌクレオチドを個体に投与する工程を含む、そのような治療を必要とする個体に新生物症状の治療を行う方法を提供する。典型的には新生物症状は、卵巣癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌またはその他ヘプシンが過剰発現される癌であってよい。

【0029】

50

本発明の範囲と精神から逸脱することなく、本明細書中に開示された発明に対して様々な置換および修飾がなされてもよいことは、当業者にとっては明白である。

【0030】

本発明によると、従来の分子生物学、微生物学および当業の技術分野の範囲内にあるDNA組み換え技術が採用可能である。このような技術は文献中に十分に説明されている。例えば、Maniatis, Fritsch & Sambrook 分子クローニング：試験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)); DNAクローニング：実践的取り組み (DNA Cloning. A Practical Approach (Volumes I and II, D.N. Glover, ed. 1985)); オリゴヌクレオチドの合成 (Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed. 1984)); 核酸ハイブリダイゼーション (Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins, ed. 1985)); 転写と翻訳 (Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, ed. 1984)); 動物の細胞培養 (Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. 1986)); 固定化細胞および固定化酵素 (Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)); B. Perbal, 分子クローニングに対する実践ガイド (A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)) を参照のこと。

10

20

【0031】

本明細書中に使用されるように、用語「cDNA」は、遺伝子のmRNA転写産物のDNAのコピーを指すものとする。

【0032】

本発明は、ヘプシンタンパク質またはその断片をコードするDNA配列を含むベクターを包含し、そのベクターは、宿主内で複製可能であり、さらに、機能的に連結した、a) 複製起点; b) プロモーター; および c) ヘプシンタンパク質をコードするDNA配列を含む。好ましくは、本発明のベクターは、配列番号188に示されるDNA配列の一部を含む。ベクターを使用して、ヘプシンタンパク質、ヘプシンタンパク質の断片またはアンチセンスヘプシンRNAをコードする核酸を増幅および/または発現させることができる。さらに、ベクターは、免疫活性組成物、ヘプシンタンパク質またはその断片を含む融合タンパク質をコードする核酸を発現することができる。これらのベクターは、個体においてヘプシンに対するワクチン接種を行う方法において有用であると思われる。

30

【0033】

発現ベクターは、複製可能な構築体であり、ポリペプチドをコードする核酸配列が、細胞においてポリペプチドの発現をもたらすことが可能な適切な制御配列に機能的に連結している。このような制御配列の必要性は、選択される細胞および選択される形質転換の方法により異なる。一般的に制御配列は、転写プロモーターおよび/または転写エンハンサー、適切なmRNAのリボソーム結合部位ならびに転写および翻訳の終了を制御する配列を含む。当業者に周知の方法が、適切な転写および翻訳の制御信号を有する発現ベクターを構築するために使用可能である。例えばSambrookら分子クローニング：試験室マニュアル(第2版)(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), (2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, N.Y.))を参照のこと。遺伝子およびその転写制御配列は、該転写制御配列が遺伝子の転写を効果的に制御する場合に「機能的に連結している」と定義される。本発明のベクターは、プラスミドベクターおよびウイルスベクターを含むが、それのみに限定されない。本発明の好ましいウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40ウイルスまたはヘルペスウイルスに由来するベクターである。

40

【0034】

50

本明細書中で使用される用語「オリゴヌクレオチド」は、2つまたはそれ以上、好ましくは3つより多くの、リボヌクレオチドからなる分子と定義される。その正確なサイズは多くの要因に依存し、その要因自体は、オリゴヌクレオチドの究極的な機能および用途に依存する。本明細書中で用いられている用語「プライマー」は、自然に生じたか（精製された制限消化物など）または合成によって作られたかの別を問わず、適切な条件下、すなわちヌクレオチドおよび例えばDNAポリメラーゼなどの誘発剤の存在下ならびに適切な温度およびpH条件下に置かれた場合に、核酸に相補的な鎖の合成を開始することが可能であるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよく、誘発剤の存在下で所望の伸長産物の合成を開始するのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、配列および/またはプライマーの相同性ならびに使用方法を含む多くの要因に依存する。例えば、診断用途において、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列の複雑さに依存して、通常15 - 25またはそれ以上のヌクレオチドを含有するが、それ未満のヌクレオチドを含有する場合もある。

【0035】

本明細書中で用いられている「実質的に純粋なDNA」とは、環境中の分子の一部または全体の分離（部分的または全体的な精製）、または本発明のDNAに隣接する配列の変更によって、そのDNAが自然に生じる環境の一部ではないDNAを指す。従って、この用語は、例えば、ベクター、自己複製プラスミドまたはウイルス、あるいは原核生物または真核生物のゲノムDNAに、組み込まれた組換えDNA；あるいは、他の配列から独立した個別の分子（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または制限エンドヌクレアーゼ消化により産生されたcDNAまたはゲノムまたはcDNA断片）として存在する組換えDNAを含む。その用語は、例えば融合タンパク質のような付加的ポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含む。さらに、配列番号188に示されたヌクレオチドの一部を含みかつヘプシンまたはその断片の選択的スプライシング変異体をコードする組換えDNAも含まれる。

【0036】

ヘプシン変異体は本明細書中に開示されている。従って、本発明は、配列番号195のアミノ酸配列またはその断片を含むヘプシン変異体をコードする単離DNAも対象にしている。ヘプシン変異体は、検体中の腫瘍細胞を検出する際に有用であり、その方法は配列番号195のアミノ酸配列またはその断片を含むヘプシンタンパク質変異体の発現を検出する工程を含み、検体中のヘプシン変異体の発現の存在は、検体が腫瘍細胞を含むことを示唆する。一般的に、ヘプシン変異体の発現の検出はDNAレベルまたはタンパク質レベルで実施可能である。代表的な腫瘍細胞として、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞および腎癌細胞が挙げられる。

【0037】

本発明は、本明細書中に開示されているヘプシンまたはヘプシン変異体をコードするヌクレオチドの配列に対して、少なくとも約70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%（例えば少なくとも80%）、および最も好ましくは90%の配列同一性を有するDNA群を包含する。2つの配列間の同一性は、マッチングするまたは同一の位置の数の一次関数である。この2つの配列の両方における位置が、同一の単量サブユニットにより占められる場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおいてある位置がアデニンにより占められていれば、その位置でそれらは同一である。例えば、10ヌクレオチド長の配列において7つの位置が、第2の10ヌクレオチド長の配列の対応位置と同一であれば、2つの配列は70%の配列同一性を有する。比較する配列の長さは、一般的に50ヌクレオチド以上であり、好ましくは60ヌクレオチド以上、さらに好ましくは75ヌクレオチド以上、および最も好ましくは100ヌクレオチドである。配列の同一性は、典型的に配列解析ソフトウェア（例えば、ジェネティックコンピュータグループ社（Genetics Computer Group（GCC））のSequence Analysis Software Package（ウィスコンシン大学バイオテクノロジーセンター、1710、ユニバーシティアベニュー、マディソン（University of Wi

10

20

30

40

50

sconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison), WI 53705)を用いて測定される。
【0038】

さらに本発明は、例えば選択的mRNAスプライシングまたは選択的タンパク質プロセシングの産物のように少なくとも部分的に配列番号188の一部によってコードされているか、あるいはヘプシン配列の一部が欠失した、ヘプシンまたはヘプシン変異タンパク質も含む。断片または完全なヘプシンポリペプチドは、例えば標識、リガンド、または抗原性を高める手段として作用する他のポリペプチドに共有結合させてもよい。

【0039】

実質的に純粋なヘプシンタンパク質は、例えば自然源からの抽出；ヘプシンポリペプチドをコードする組換え核酸の発現；タンパク質の化学的合成；によって得ることができる。純度は、例えば、ヘプシンに対して特異的な抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーのようなカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法またはHPLC分析などの、任意の適切な方法により測定することができる。タンパク質は、その天然状態でそれに付随する汚染物質の少なくとも一部から分離されている場合、自然に関連する成分を実質的に含まない。従って、化学合成されるか、またはタンパク質が自然発生する細胞とは異なる細胞系において製造されたタンパク質は、当然、その自然に関連する成分を実質的に含まないであろう。その結果、実質的に純粋なタンパク質は、真核生物タンパク質が天然では生じない、大腸菌、その他の原核生物または任意の他の生物において合成された真核生物タンパク質を含む。

【0040】

実質的に完全長のタンパク質に加えて、発明は、ヘプシンまたはヘプシン変異体タンパク質の断片（例えば、抗原断片）も含む。本明細書中で用いられているように、ポリペプチドに適用されている「断片」の用語は、通常10残基以上、より典型的には20残基以上、および好ましくは30残基以上（例えば50）の長さであるが、完全長の完全配列よりは短い。ヘプシンタンパク質の断片は、当業者に公知の方法、例えば天然のまたは組換えのヘプシンタンパク質の酵素消化、ヘプシンの特定断片をコードする発現ベクターを用いる組換えDNA技術、または化学合成により、作成可能である。候補断片のヘプシンの特性を示す能力（例えばヘプシンに特異的な抗体への結合）は、当業界で公知の方法により評価可能である。

【0041】

純粋なヘプシンまたはヘプシンの抗原断片を用いて、当業者に公知の標準的プロトコールを採用することにより、新規抗体の作成または既存の抗体（例えば診断用アッセイにおける陽性対照など）の試験が可能である。本発明は、例えばウサギにおいて免疫原としてヘプシンまたはヘプシンの断片を用いて作成されるポリクローナル抗血清を含む。当業者に公知のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体作成の標準的プロトコールを用いる。組換えヘプシンのcDNAクローンを同定しさらに他のcDNAクローンからそれらを区別する能力について、この手順により作成されたモノクローナル抗体をスクリーニングすることができる。

【0042】

本発明は、完全な抗ヘプシンモノクローナル抗体のみではなく、例えばFab（抗原結合断片）または(Fab)₂断片などの免疫活性抗体断片；組換え一本鎖Fv分子；または、例えば、マウス由来のような1つの抗体の結合特異性部分を含む抗体と、ヒト由来のような別の抗体の残りの部分を含む抗体との、キメラ分子；を包含する。

【0043】

一実施形態では、抗体またはその断片は、毒素、あるいは、当業界で周知の放射性標識、非放射性同位体標識、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、酵素標識、または比色標識などの検出可能な標識に、結合させてもよい。適切な毒素の例には、ジフテリア毒素、Pseudomonas（シュードモナス）外毒素A、リシンおよびコレラ毒素がある。適切な酵素標識の例には、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、リボヌク

10

20

30

40

50

レアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼなどがある。適切な放射性同位元素標識の例には、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C などを含む。

【0044】

In vivo診断の目的において、常磁性同位体もこの発明の方法に基づき用いることができる。磁気共鳴画像法に有用な元素は多数にのぼる。In vivo磁器共鳴画像法に関する検討に対しては、例えばSchaeferら(1989, JACC 14: 472 - 480) ; Shreve ら(1986, Magn. Reson. Med. 3: 336 - 340) ; Wolf, G. L. (1984, Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16: 93 - 95) ; Wesbeyら(1984, Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16: 145 - 155) ; Rungeら(1984, Invest. Radiol. 19: 408 - 415) を参照のこと。適切な蛍光標識の例には、フルオレセイン標識、イソチオシアレート標識、ローダミン標識、フィコエリトリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識、オブサルデヒド標識、フルオレスカミン標識などがある。化学発光標識の例には、ルミナル標識、イソルミナル標識、芳香族アクリジニウム・エステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、シュウ酸塩標識、ルシフェリン標識、ルシフェラーゼ標識、エクオリン標識がある。

10

【0045】

当業者であれば、本発明に従って採用可能なその他の適切な標識については知っているであろう。抗体またはその断片に対するこれらの標識の結合は、当業者に一般に公知でありおよび使用できる標準的な技法を用いて達成可能である。その典型的な手法は、Kennedyら(1976, Clin. Chim. Acta 70, 1 - 31) ; およびSchursら(1977, Clin. Chim. Acta 81, 1 - 40) に記述されている。後者によって記述された結合技法はグルタルアルデヒド法、過ヨウ素法、ジマレイミド法、m - マレイミドベンジル - N - ヒドロキシ - スクシンイミドエステル法である。これらの方法のすべては参照により本明細書中に組み入れられる。

20

【0046】

以下の例は、本発明の様々な実施形態を例示する目的で示されたものであり、いずれの態様においても、本発明を限定することは意図されていない。本明細書中に本来備わっているそれらの目的、結果および便益に加え、本発明が目的を実行し、記述された結果と便益を得るために良好に適用されることを、当業者は容易に理解するであろう。その範囲内での変更および特許請求の範囲に包含される他の用途が、当業者には想起されるであろう。

30

【実施例1】

【0047】

重複プライマーおよび特異的プライマーを用いたセリンプロテアーゼの増幅

ゲノムDNAを含まないと思われるcDNAの調製物のみを遺伝子発現分析に用いた。セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼに対して重複プライマーを調製した。プライマーは、セリンプロテアーゼ、すなわちヒスチジン...アスパラギン酸...およびセリンの触媒三つ組残基の周囲のアミノ酸の共通配列に対して合成した。センス(ヒスチジンおよびアスパラギン酸)重複プライマーおよびアンチセンス(アスパラギン酸およびセリン)重複プライマー両方の配列を表2に示す。

40

【0048】

数種のプロテアーゼ存在物を、漿液性嚢胞腺癌から得たcDNAのPCR増幅により同定し、サブクローン化した。従って、本明細書中に記載のプロテアーゼは、卵巢癌の最も一般的な形態であるこの種の癌の表面活性を反映する。出願人は粘液性腫瘍型および明細胞型に固有の類似の塩基対サイズのPCR増幅バンドも示している。卵巢癌の約20 - 25%は、粘液性、明細胞性または子宮内膜性のいずれかに分類される。

【0049】

PCR産物の同一性を確認するため、すべての適切なバンドをPromega T - ベク

50

タープラスミドに連結し、その連結生成物を用いて、選択培地上に増殖したJM109細胞（プロメガ社（Promega））を形質転換した。個々のコロニーを選択、培養後にプラスミドDNAをWIZARD MINIPREP（商標）DNA精製システム（プロメガ社（Promega））により単離した。配列挿入は、Prism Ready Reaction Dydeoxy Terminators サイクル配列キット（アプライドバイオシステム社（Applied Biosystems））を用いて実施した。残存する染料ターミネーターは、CENTRISEP SPIN（商標）カラム（プリンストンセパレーション社（Princeton Separation））を用いて、完全シーケンシング反応から除外し、検体をApplied Biosystems Model 373A DNAシーケンシングシステムに装填した。セリンプロテアーゼブライマーに対するサブクローニングおよび配列決定の結果を表3に要約する。

10

【表2】

表2

PCRプライマー	5'→3'	配列番号
<u>重複プライマー</u>		
セリンプロテアーゼ(ヒスチジン)=S1	tgggtgtgtiacigcigcica(ct)tg	1
セリンプロテアーゼ(アスパラギン酸)=AS1	a(ag)ia(ag)igciatitcitticc	2
セリンプロテアーゼ(セリン)=AS11	a(ag)iggicccici(cg)(ta)(ag)tcicc	3
システインプロテアーゼーセンス	ca(ag)ggica(ag)tg(ct)ggi(ta)(cg)itg(ct)tgg	4
システインプロテアーゼーアンチセンス	taicccicc(ag)tt(ag)caicc(ct)tc	5
メタロプロテアーゼーセンス	cci(ac)gitg(tc)ggi(ga)(ta)icciga	6
メタロプロテアーゼーアンチセンス	tt(ag)tgcicciat(ct)tc(ag)tg	7
<u>特異的プライマー</u>		
セリンプロテアーゼ(ヘブシン)=センス	tgtcccgatggcgagtgttt	8
セリンプロテアーゼ(ヘブシン)=アンチセンス	cctgttgccatagtactgc	9
セリンプロテアーゼ(SCOE)=センス	agatgaatgagtacaccgtg	10
セリンプロテアーゼ(SCOE)=アンチセンス	ccagtaagtccttgtaaacc	11
セリンプロテアーゼ(Comp B)=センス	aaggacacgagagctgtat	12
セリンプロテアーゼ(Comp B)=アンチセンス	aagtgttagtgagggaagc	13
セリンプロテアーゼ(プロテアーゼM)=センス	ctgtgatccaccctgactat	20
セリンプロテアーゼ(プロテアーゼM)=アンチセンス	cagggtgatgtatgcacact	21
セリンプロテアーゼ(TADG12)=センス(Ser10-s)	gcgcactgtgttatgagat	22
セリンプロテアーゼ(TADG12)=アンチセンス(Ser10-as)	ctctttggcttgacttgct	23
セリンプロテアーゼ(TADG13)=センス	tgaggacatcattatgcac	24
セリンプロテアーゼ(TADG13)=アンチセンス	caagttttcccataattgg	25
セリンプロテアーゼ(TADG14)=センス	acagtacgcctgggagacca	26
セリンプロテアーゼ(TADG14)=アンチセンス	ctgagacggtgcaattctgg	27
セリンプロテアーゼ(Gath-L)=センス	attggagagagaaaggctac	14
セリンプロテアーゼ(Gath-L)=アンチセンス	cttgggattgtacttacagg	15
セリンプロテアーゼ(PUMP1)=センス	cttccaaagtgtcacctac	16
セリンプロテアーゼ(PUMP1)=アンチセンス	ctagactgctaccatccgtc	17

30

40

【表 3】

表3
セリンプロテアーゼ候補

サブクローン	プライマーセット	遺伝子候補
1	His-Ser	ヘプシン
2	His-Ser	SCCE
3	His-Ser	補体B
4	His-Asp	補因子1
5	His-Asp	TADG-12*
6	His-Ser	TADG-13*
7	His-Ser	TADG-14*
8	His-Ser	プロテアーゼM
9	His-Ser	TADG-15*

* 新規プロテアーゼを表す。

【 0 0 5 0 】

腫瘍の c D N A 由来の P C R 産物の配列決定により、これらの遺伝子の潜在的候補を確認する。3つの新規遺伝子はすべて、セリンプロテアーゼファミリーに属する遺伝子に一致する触媒三つ組残基の配列内に保存残基を有する。

【 0 0 5 1 】

出願人は、センスヒスチジンおよびアンチセンスアスパラギン酸、ならびにセンスヒスチジンおよびアンチセンスセリンを用いて、正常な c D N A および癌の c D N A から増幅した P C R 産物を比較した。それらプライマー対に対して約 2 0 0 b p と 5 0 0 b p の期待された P C R 産物が認められた（アスパラギン酸はヒスチジンから約 5 0 - 7 0 アミノ酸分下流に、セリンはヒスチジンからカルボキシ末端方向に約 1 0 0 - 1 5 0 アミノ酸の位置に認められた）。

【 0 0 5 2 】

図 1 は、アガロースゲルの染色により示された、正常な c D N A と癌の c D N A 由来の P C R 産物の比較を表す。レーン 2 では、2つの明瞭なバンドがプライマリー対のセンス - H i s / アンチセンス - A S P (A S 1) において現れ、レーン 4 のセンス - H i s / アンチセンス - S e r (A S 2) プライマリー対の癌のレーンでは、約 5 0 0 b p の複数のバンドが認められる。

【実施例 2】

【 0 0 5 3 】

ノーザンブロット分析

ノーザンブロット法によりこれら候補遺伝子の発現を検査することにより重要な情報が得られる。正常な成体の多組織ブロット法の分析により、プロテアーゼを発現可能な正常組織を同定する機会が提供される。最終的には、治療的介入のためにプロテアーゼを阻害する戦略を開発するには、正常組織中の候補遺伝子の発現を理解することが不可欠である。

【 0 0 5 4 】

重大な情報がノーザンブロット法による胎児組織の分析により期待されている。癌において過剰発現される遺伝子の多くは、器官形成中に高発現される。指摘したように、肝癌細胞からクローン化され、卵巣癌中に過剰発現されるヘプシン遺伝子は、胎児肝に過度に発現される。ヘプシン遺伝子の発現は、胎児腎中にも検出されることから、腎癌での発現

に対する候補となり得る。

【 0 0 5 5 】

胎児組織に加え、正常な成体の多組織における遺伝子の発現を試験するノーザンブロット用パネルが市販されている（クロンテック社（C L O N T E C H））。そのような評価手段は、腫瘍組織対正常組織における個々の転写物の過剰発現を確認するために重要であるのみならず、転写物の大きさを確認し、さらに選択的スプライシングまたは他の転写物の改変が卵巣癌で生じ得るか否かを特定する機会も提供する。

【 0 0 5 6 】

ノーザンブロット分析は以下のように実施した：10 μ g の mRNA を 1 %ホルムアルデヒドアガロースゲル上に添加し、電気泳動を実施し、さらに Hy Bond - N⁺（商標）ナイロン膜（アマシャム社（A m e r s h a m））上にブロットした。³²P - 標識した cDNA プローブを Prime - a - Gene Labeling System（商標）（プロメガ社（P r o m e g a））を用いて作成した。特異的プライマーにより増幅された PCR 産物をプローブとして用いた。ブロットを 30 分間プレハイブリダイズさせ、その後、Express Hyb（商標）のハイブリダイゼーション溶液（クロンテック社（C L O N T E C H））中において³²P - 標識した cDNA プローブを用いて 68 で 60 分間ハイブリダイズさせた。 β - チューブリンプローブを用いて、相対的ゲル装填量を特定するための対照ハイブリダイゼーションを実施した。

【 0 0 5 7 】

脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血白血球、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓を服務正常なヒト組織ならびに正常なヒト胎児組織（ヒト多組織ノーザンブロット（Human Multiple Tissue Northern Blot）；クロンテック社（C L O N T E C H））を同一のハイブリダイゼーション手順を用いてすべて検査した。

【 0 0 5 8 】

正常な卵巣および卵巣癌における PCR 増幅を比較した実験により、腫瘍組織中の mRNA における過剰発現および / または変性が示唆された。TADG - 14 のノーザンブロット分析は、1.4 kb のサイズの転写を確認し、データは卵巣癌における過剰発現を示している（図 2）。陽性ブランクをスクリーニングするために PCR と特異的な 250 bp の PCR 産物の両方を用いた単離および精製により、1.2 kb の TADG - 14 のクローンが得られた。その他のプロテアーゼは、表 2 の適切なプライマーを用いて同一の方法により増幅した。

【実施例 3】

【 0 0 5 9 】

セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼに対応する PCR 産物

低悪性腫瘍または癌のいずれかにおける固有の発現に基づき、PCR 増幅 cDNA 産物をクローン化し、配列決定し、ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列に基づき同定した適切な遺伝子を GCG データベースおよび E S T データベースに保存した。図 3、4 および 5 は、正常組織と癌組織を比較した、セリンプロテアーゼ（図 3）、システインプロテアーゼ（図 4）およびメタロプロテアーゼ（図 5）に対する重複プライマーを用いた PCR 産物の陳列を示す。癌組織対正常組織における差異発現に注目する。Sakanari（1989）の方法に基づき正常組織、低悪性組織および顕性卵巣癌組織における mRNA 発現を比較することにより、（セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼの）内因性の酵素活性に関連する保存配列に対する重複 cDNA プライマー（表 2 を参照のこと）を用いてそれらプロテアーゼを同定した。

【実施例 4】

【 0 0 6 0 】

セリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼ群に関して、ヒスチジン領域のプライマーセンスである S1 を、アンチセンスプライマーである AS2 と併用して以下のプロテアーゼを同定した：

(a) ヘプシン：培養肝癌細胞の増殖に不可欠であり、かつ肝癌細胞で高発現される細胞表面プロテアーゼであることが分かっている肝癌細胞からクローンされたトリプシン様セリンプロテアーゼ（図3、レーン4）；

(b) 補体B因子（第IXヒト因子）：凝固カスケードに関与し、かつ腫瘍細胞に関連したフィブリン分解産物の産生および蓄積に関連するプロテアーゼ（図3、レーン4）。補体B因子は第X凝固因子（クリスマス因子）のファミリーに属する。内因性経路の一部として、補体B因子は、 Ca^{2+} リン脂質および第VIIIa e5因子の存在下で第X凝固因子のタンパク質活性化を触媒する；および

(c) ヒト角質層由来の皮膚細胞の落屑に関与する角質層キモトリプシン分解酵素（SCCE）セリンプロテアーゼ（図3、レーン4）。SCCEは、表皮の角質細胞で発現され、角化層内の粘着性組織を分解するように機能するため、皮膚表面の継続した脱落が生じる。

【実施例5】

【0061】

システインプロテアーゼ

システインプロテアーゼ群では、システインプロテアーゼに対する重複センスプライマーおよび重複アンチセンスプライマーを用いて、正常な卵巣癌組織と比べた時の卵巣癌での過剰発現により1つの独特なPCR産物を同定した（図4、レーン3-5）。このPCR産物をクローニングし、さらに配列決定することにより、カテプシンLの配列を同定した。カテプシンLは、その発現および分泌が悪性転換、成長因子および腫瘍プロモーターにより誘導されるリソソームのシステインプロテアーゼである。多くのヒト腫瘍（卵巣腫瘍を含む）は、高レベルのカテプシンLを発現する。カテプシンLシステインプロテアーゼは、ストロメライシンファミリーに属し、強力なエラスターゼ活性とコラーゲナーゼ活性とを有する。公表されたデータは、卵巣の粘液性嚢胞腺癌に罹患した患者の血清中の濃度上昇を示唆する。これまで、他の卵巣腫瘍で発現されることは示されていない。

【実施例6】

【0062】

メタロプロテアーゼ

メタロプロテアーゼに対する重複センスプライマーおよび重複アンチセンスプライマーを用いて、正常な卵巣組織には存在しない1つの独特なPCR産物を腫瘍組織中に検出した（図5、レーン2-5）。この産物をサブクローニングおよび配列決定することにより、その産物が、適切な領域においていわゆるPUMP-1（MMP-7）遺伝子と完全な相同性を有することが示された。この亜鉛結合メタロプロテアーゼは、シグナル配列を有するプロ酵素として発現され、ゼラチンの消化およびコラーゲナーゼの消化において活性を有する。PUMP-1は、結腸直腸癌10例中9例において誘導され、正常な結腸組織と比べ過剰発現されることも認められており、この疾患の進行におけるこの基質の役割が示唆されている。

【実施例7】

【0063】

ヘプシンの発現

ヘプシンのmRNA発現を、定量的PCR法を用いて検出、測定した。定量的PCR法は、一般的にNoonanら（1990）の方法に従い実施された。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた：

ヘプシンの順方向5'-TGTCCTCCGATGGCGAGTGTTT-3'（配列番号8）および逆方向5'-CCTGTGTGGCCATAGTACTGC-3'（配列番号9）；
β-チューブリンの順方向5'-TGCAATTGACAAACGAGGC-3'（配列番号18）および逆方向5'-CTGTCTCTTGACATTGTTG-3'（配列番号19）。

【0064】

β-チューブリンは内部対照として用いた。増幅遺伝子の推定サイズは、ヘプシンでは282bpであり、β-チューブリンでは454bpであった。この研究に用いたプライ

10

20

30

40

50

マーの配列は、ヘプシンに対してはLeytusら(1988)が示したcDNA配列に基づき、また β -チューブリンに対してはHallら(1983)が示したcDNA配列に基づき、設計した。

【0065】

PCR反応混合物は、従来技術で変換されたmRNA(50ng)に由来するcDNA、ヘプシン遺伝子および β -チューブリン遺伝子の両方に対するセンスおよびアンチセンスプライマー(5 μ mol)、200 μ molのdNTPs、5 μ Ciの α -³²P dCTPおよび最終容量25 μ l中反応緩衝剤(プロメガ社(Promega))を含む0.25単位のTaq DNAポリメラーゼ、から構成される。標的配列は、 β -チューブリン遺伝子と同時に増幅した。PCR30サイクルをサーマルサイクラー(パーキン-エルマーシートス社(Perkin-Elmer Cetus))中で実施した。PCRの各サイクルは、95℃で30秒間の変性、63℃で30秒間のアニーリング、72℃で30秒間の伸長を含む。PCR産物は、2%アガロースゲル上で分離し、各PCR産物の放射活性をPhosphorImager(商標)(モルキュラーダイナミクス社(Molecular Dynamics))を用いて特定した。平均値の比較にはStudent's-t検定を用いた。

【0066】

ヘプシンは、肝癌細胞からクローン化されたトリプシン様セリンプロテアーゼである。ヘプシンは、そのアミノ末端領域により形質膜に固着され、それによってその触媒領域を細胞外マトリックスに暴露する細胞外プロテアーゼ(分泌シグナル配列を含む酵素)である。ヘプシンは、乳癌細胞株および末梢神経細胞において発現されることも明らかにされている。ヘプシンは、以前は決して卵巣癌と関連付けられなかった。ヘプシン遺伝子に対する特異的プライマーを合成し、胎児組織および卵巣組織(正常組織および卵巣癌組織の両方)のノーザンブロットを用いてヘプシンの発現を調べた。

【0067】

図10Aは、ヘプシンが様々な病理組織型の卵巣癌で発現されるが、正常な卵巣では発現されないことを示している。図10Bは、ヘプシンが、予想通りに胎児肝および胎児腎で発現されるが、胎児脳および胎児肺では極めて低量かまったく発現されないことを示している。図10Cは、ヘプシンの過剰発現が正常な成体組織には認められないことを示している。バックグラウンドレベルを超える軽度の発現が成体の前立腺に認められる。両方のノーザンブロットにおいて同定されたmRNAは、ヘプシン転写物に対し適切なサイズであった。正常卵巣10例および卵巣腫瘍44例において、 β -チューブリンおよびヘプシンに対する特定のプライマーを用いた定量的PCRアッセイによりヘプシンの発現を調べ、35サイクルに亘り直線的であることが認められた。発現は、内部対照である³²P- β -チューブリンバンドに対する³²P-ヘプシンバンドの割合として示した。

【0068】

正常(N)、粘液性(M)および漿液性(S)の低悪性(LMP)腫瘍、および癌(CA)においてヘプシンの発現を調べた。図11Aは、ヘプシンおよび内部対照である β -チューブリンの定量的PCRを示す。図11Bは、正常卵巣、LMP腫瘍および卵巣癌におけるヘプシン対 β -チューブリンの発現の割合を示している。ヘプシンmRNAの発現量は、正常卵巣のレベルと比較してLMP腫瘍($p < 0.005$)および癌($p < 0.0001$)で有意に高値であることが示された。正常卵巣の全10例は、比較的低値のヘプシンmRNAの発現量を示した。

【0069】

ヘプシンmRNAは、一部の低悪性腫瘍を含む卵巣癌の大部分の病理組織型で高度に過剰発現される(図11Aおよび11B)。最も注目すべきこととして、ヘプシンは、試験に供した漿液性腫瘍、子宮内膜性腫瘍および明細胞癌において高発現される。ヘプシンは一部の粘液性腫瘍で高発現されるが、大部分の粘液性腫瘍では過剰発現されない。

【0070】

表4に示す卵巣癌の新鮮凍結組織の腫瘍組織バンクを評価に用いた。悪性腫瘍以外の医

10

20

30

40

50

学的理由で切除された正常卵巢約 100 検体を手術により入手し、それは対照として利用可能であった。

【0071】

腫瘍バンクからの腫瘍約 100 検体を評価したが、それらには境界腫瘍または低悪性腫瘍および卵巢癌を含む大部分の卵巢癌の病理組織の亜型が包含されていた。このアプローチは、正常組織、低悪性腫瘍および卵巢癌の遺伝子の発現を比較するために、新鮮凍結組織（正常および悪性の両方）から調製された mRNA を用いることを含む。poly A⁺ mRNA から調製された cDNA は、β - チュープリンプライマーおよび p53 プライマーの両方を用いて、公知のイントロン - エクソンスプライシング領域を包含するプライマーで調製したすべての調製物をチェックすることによって、ゲノム DNA を含まないと思われた。

10

【0072】

ヘプシン特異的プライマー（表 2 を参照のこと）を用いた定量的 PCR により、正常組織 8 検体、低悪性腫瘍 11 検体および癌 14 検体（粘液性タイプおよび漿液性タイプの両方）において、セリンプロテアーゼ ヘプシン遺伝子の発現を特定した（β - チュープリンのメッセージに対するプライマーを内部標準として用いた）（表 5）。これらのデータにより、低悪性腫瘍および顕性癌の両方を含む卵巢癌における、ヘプシン表面のプロテアーゼ遺伝子の過剰発現が確認された。ヘプシンの発現は、低悪性腫瘍中において正常レベルを超えて上昇し、この群の高ステージの腫瘍（ステージ III）では低ステージの腫瘍（ステージ I）に比べてヘプシンの発現量が多かった（表 6）。顕性癌では、漿液性腫瘍が最も高いヘプシン発現レベルを示す一方、粘液性腫瘍は高ステージの低悪性腫瘍群に匹敵するヘプシン発現レベルを示す（図 6 および 7）。

20

【表 4】

表 4

卵巢癌組織バンク

	合計	ステージ I / II	ステージ III / IV	ステージ不明
<u>漿液性</u>				
悪性	166	15	140	8
LMP	16	9	7	0
良性	12	0	0	12
<u>粘液性</u>				
悪性	26	6	14	6
LMP	28	25	3	0
良性	3	0	0	3
<u>子宮内膜性</u>				
悪性	38	17	21	0
LMP	2	2	0	0
良性	0	0	0	0
<u>その他 *</u>				
悪性	61	23	29	9
LMP	0	0	0	0
良性	5	0	0	5

30

40

* その他の分類には、以下の腫瘍タイプが含まれる: プレンナー腫瘍、卵巢莢膜細胞腫瘍、卵巢奇形腫瘍、卵巢線維莢膜細胞腫瘍、線維腫瘍、顆粒膜細胞腫瘍、明細胞腫瘍、胚細胞腫瘍、ミューラー管混合腫瘍、間質性腫瘍、未分化腫瘍および卵巢未分化胚細胞腫

【表 5】

表5				
患者の特性およびヘプシン遺伝子の発現				
症例	組織学的タイプ ^a	ステージ/グレード	LN ^b	ヘプシンの mRNA発現 ^c
1	正常卵巢			n
2	正常卵巢			n
3	正常卵巢			n
4	正常卵巢			n
5	正常卵巢			n
6	正常卵巢			n
7	正常卵巢			n
8	正常卵巢			n
9	正常卵巢			n
10	正常卵巢			n
11	S腺腫(LMP)	1/1	N	4+
12	S腺腫(LMP)	1/1	NE	4+
13	S腺腫(LMP)	1/1	NE	n
14	S腺腫(LMP)	1/1	N	2+
15	S腺腫(LMP)	3/1	P	4+
16	S腺腫(LMP)	3/1	P	4+
17	S腺腫(LMP)	3/1	P	4+
18	M腺腫(LMP)	1/1	NE	4+
19	M腺腫(LMP)	1/1	N	n
20	M腺腫(LMP)	1/1	N	n
21	M腺腫(LMP)	1/1	N	n
22	M腺腫(LMP)	1/1	NE	n
23	S癌	1/2	N	4+
24	S癌	1/3	N	4+
25	S癌	3/1	NE	2+
26	S癌	3/2	NE	4+
27	S癌	3/2	P	4+
28	S癌	3/2	NE	2+
29	S癌	3/3	NE	2+
30	S癌	3/3	NE	4+
31	S癌	3/3	NE	4+
32	S癌	3/3	NE	4+
33	S癌	3/3	N	4+
34	S癌	3/3	NE	n
35	S癌	3/3	NE	4+
36	S癌	3/3	NE	4+
37	S癌	3/3	NE	4+
38	S癌	3/3	N	4+
39	S癌	3/2	NE	2+
40	S癌	3/3	NE	4+
41	S癌	3/2	NE	4+
42	M癌	1/2	N	n
43	M癌	2/2	NE	4+
44	M癌	2/2	N	4+
45	M癌	3/1	NE	n
46	M癌	3/2	NE	4+
47	M癌	3/2	NE	n
48	M癌	3/3	NE	n
49	E癌	2/3	N	4+
50	E癌	3/2	NE	4+
51	E癌	3/3	NE	4+
52	C癌	1/3	N	4+
53	C癌	1/1	N	4+
54	C癌	3/2	P	4+

^aS, 漿液性; M, 粘液性; E, 子宮内膜性; C, 明細胞性; ^bLN, リンパ節転移; P, 陽性; N, 陰性; NE, 未検査; ^cN, 正常範囲=平均±2SD; 2+, 平均±2SD~±4SD; 4+, 平均±4SD以上

【表 6】

表6

正常卵巣および卵巣癌におけるヘプシンの過剰発現

タイプ	N	ヘプシンの過剰発現	β -チューブリンに 対するヘプシンの比	
正常	10	0 (0%)	0.06 ± 0.05	
LMP	12	7 (58.3%)	0.26 ± 0.19	10
漿液性	7	6 (85.7%)	0.34 ± 0.20	
粘液性	5	1 (20.0%)	0.14 ± 0.12	
癌	32	27 (84.4%)	0.46 ± 0.29	
漿液性	19	18 (94.7%)	0.56 ± 0.32	
粘液性	7	3 (42.9%)	0.26 ± 0.22	
子宮内膜性	3	3 (100%)	0.34 ± 0.01	
明細胞性	3	3 (100%)	0.45 ± 0.08	20

【実施例 8】

【0073】

SCCE および PUMP - 1 の発現

SCCE 特異的プライマー（図 8）および PUMP - 1 特異的プライマー（図 9）の両方を用いた試験から、卵巣癌でのこれらのプロテアーゼの過剰発現が示されている。

【実施例 9】

【0074】

本明細書中で検出されたプロテアーゼの要約

本明細書中に記載した大部分のプロテアーゼは、500bp の PCR 産物（図 1、レーン 4）から産出されたセンス - His / アンチセンス - Ser プライマー対から同定した。一部の酵素は良く知られており、それぞれの簡潔な要約を以下に示す。

【0075】

角質層キモトリプシン酵素（SCCE）

同定された PCR 産物は、角質層キモトリプシン酵素のセンス - His / アンチセンス - Ser の触媒領域である。この細胞外プロテアーゼは、クローン化および配列決定され、さらに、表皮中の角質細胞表面に発現されることが示された。角質層キモトリプシン酵素は、キモトリプシン様セリンプロテアーゼであり、その機能は皮膚の角質層中の細胞内結合組織の触媒能低下にあると示唆されている。この触媒能低下により皮膚表面からの継続的脱落（皮膚の落屑）が生じる。角質層キモトリプシン酵素の細胞下の局在位置は、正常な非手掌足底表皮の角質層および肥厚性足底角質層の結合部の顆粒層上部である。角質層キモトリプシン酵素は、角質層にのみ関連し、これまでいずれの癌組織中にも認められていない。

【0076】

PCR 産物を用いてノーザンブロットを調べて、胎児組織中および卵巣癌中の角質層キモトリプシン酵素の発現を特定した（図 12A および 12B）。注目すべきこととして、胎児のノーザンブロットでの角質層キモトリプシン酵素のメッセンジャー RNA は、ほぼ存在が検出されなかった（ブローブまたはノーザンブロットの問題は、適切な対照を用いることにより除外した）。かすかなバンドが胎児腎に現れた。一方、角質層キモトリプシン酵素 mRNA は卵巣癌の mRNA には多量に存在した（図 12B）。2 種類の適切なサ

イズの転写物が角質層キモトリプシン酵素に認められた。ヘプシン解析に用いられた c D N A の同一パネルを角質層キモトリプシン酵素の発現に対して用いた。

【 0 0 7 7 】

ノーザンプロットの正常な卵巣のレーンには角質層キモトリプシン酵素の発現は検出されなかった。挿入マーカー (β - チューブリン) を含むすべての候補遺伝子の比較により、この観察結果が先入観によるものではないとの確認を得た。 β - チューブリン内部対照用プライマーと共に角質層キモトリプシン酵素のプライマーを用いた定量的 P C R により、卵巣癌での角質層キモトリプシン酵素の m R N A の発現を確認したが、正常な卵巣組織での発現は確認できなかった (図 1 3) 。

【 0 0 7 8 】

図 1 3 A は、正常卵巣組織および卵巣癌から得た角質層キモトリプシン酵素の c D N A の定量的 P C R を用いた比較を表している。図 1 3 B は、卵巣組織 1 0 例および卵巣癌組織 4 4 例における、 β - チューブリン内部対照標準に対する角質層キモトリプシン酵素の割合を表している。この場合も、角質層キモトリプシン酵素が卵巣癌で高度に過剰発現されることが認められた。一部の粘液性腫瘍が角質層キモトリプシン酵素を過剰発現するものの、その大部分はそれに該当しないことも認められた。

【 0 0 7 9 】

プロテアーゼ M

プロテアーゼ M は H i s - - s e r プライマー対のサブクローンにより同定された。このプロテアーゼは、最初に A n i s o w i c z ら (1 9 9 6) によってクローン化され、癌で過剰発現されることが示された。予備試験の評価からこの酵素は卵巣癌で過剰発現されることが示されている (図 1 4) 。

【 0 0 8 0 】

補因子 I および補体因子 B

凝固経路に関連する数種のセリンプロテアーゼにもサブクローン化を実施した。これら酵素の発現に関する定量的 P C R による正常および卵巣癌の評価は、正常卵巣組織と比較した場合にこの m R N A が卵巣癌で明らかに過剰発現されていないことを示した。同一パネルの腫瘍を各候補プロテアーゼの評価に用いたことに留意すべきである。

【 0 0 8 1 】

T A D G - 1 2

T A D G - 1 2 は、センス - H i s / アンチセンス - A s p のプライマー対から同定した (図 1、レーン 1 および 2 を参照のこと)。レーン 2 の両方の P C R 産物をサブクローン化した後、2 0 0 b p の産物が、G e b B a n k に含まれていない独特なプロテアーゼ様配列を含んでいた。この 2 0 0 b p の産物は、セリンプロテアーゼのファミリーの H i s - A s p 領域に共通する保存アミノ酸の多くを含む。2 つ目のより大きな P C R 産物 (3 0 0 b p) は、T A D G - 1 2 (H i s - A s p 配列) と高い相同性を有することが示されたが、約 1 1 0 0 b p の独特な配列も含んでいた。特異的プライマーの合成およびそれに続く 3 つの異なる腫瘍から得られた P C R 産物の配列決定により、大きい方の P C R 産物 (卵巣癌の約 5 0 % に存在する) は、その配列の 5 末端付近 (およびヒスチジン付近) に約 1 0 0 b p の挿入部分を含むことが示された。スプライシング部位の位置が適切でありかつその挿入部分がオープンリーディングフレームを含まないという事実から、その挿入部分は保持されたゲノムイントロンであると考えられる (図 1 5 を参照)。このことは、全卵巣癌の半数程度における、イントロンの保持を生じさせるスプライシング部位突然変異の可能性、または T A D G - 1 2 遺伝子での配列転座の可能性を示唆する。

【 0 0 8 2 】

T A D G - 1 3 および T A D G - 1 4

特異的プライマーを T A D G 1 3 - および T A D G - 1 4 に対して合成し、正常組織および卵巣癌組織での遺伝子発現を評価した。卵巣組織のノーザンプロット分析により、T A D G - 1 4 遺伝子の転写物は約 1 . 4 k b であり、卵巣癌組織で発現されることが示されたが (図 1 6 A)、正常組織では著明な転写物は認められなかった。特異的プライマー

10

20

30

40

50

を用いた定量的 P C R 試験において、正常卵巣での発現と比較して卵巣癌組織で T A D G - 1 4 発現が増大することが認められた (図 1 6 B) 。 T A D G - 1 4 に対する特異的 P C R 産物の存在が、H e L a ライブラリー中および卵巣癌ライブラリー中の両方で確認された。T A D G - 1 4 に対応する数種類の候補配列を、H e L a ライブラリーからスクリーニングおよび単離した。

【 0 0 8 3 】

配列の相同性から、明らかにこれらの遺伝子はセリンプロテアーゼのファミリーに適合する。しかし、T A D G - 1 3 および T A D G - 1 4 は、本発明の特定プライマーにより正常細胞および腫瘍細胞で評価することが可能であり、さらに、これらの遺伝子の発現の有無が特定腫瘍タイプに対する診断または治療の選択に有用である、これまでに報告されて

10

【 0 0 8 4 】

P U M P - 1

金属結合領域および保存ヒスチジン領域に対する重複プライマーを用いる同様の方法において、マトリックスメタロ - プロテアーゼ 7 (M M P - 7) と同一の差異発現される P C R 産物を同定し、本明細書中では P U M P - 1 と称する。P U M P - 1 に特異的なプライマーを用いた P C R の実施により、ノーザンブロット分析用に 2 5 0 b p の産物を作成した。

【 0 0 8 5 】

P U M P - 1 は、胎児肺組織および胎児腎組織で差異発現された。図 1 7 A は、ヒト胎児組織での P U M P - 1 の発現を示しているが、一方、胎児脳および胎児肝のいずれにおいても転写産物は検出できなかった。図 1 7 B は、ノーザンブロット分析を用いて正常卵巣および癌の亜群における P U M P - 1 の発現を比較している。注目すべきこととして、P U M P - 1 は卵巣癌組織で発現され、この場合も、正常組織では転写産物の存在は検出されなかった。P U M P - 1 m R N A の正常組織での発現と卵巣癌での発現を比較する定量的 P C R により、この遺伝子が悪性度の低い漿液性腫瘍の大部分を含む漿液性癌で高発現され、この場合も粘液性腫瘍では発現レベルが低いことが示された (図 1 8 および 1 8 B を参照) 。一方、P U M P - 1 は、これまでに粘液性腫瘍において過剰発現が最も高頻度で認められるプロテアーゼである (表 7 参照のこと) 。

20

【 0 0 8 6 】

カテプシン - L

個々のシステイン残基およびヒスチジン残基を取り囲む保存領域に対する重複システインプロテアーゼプライマーを用いて、数種の漿液性癌においてカテプシン - L プロテアーゼを同定した。正常組織および卵巣腫瘍組織におけるカテプシン - L の発現についての最初の評価により、カテプシン - L プロテアーゼの転写物が正常組織および腫瘍組織の両方に存在することが示された (図 1 9) 。一方、本発明のその他のプロテアーゼとの組み合わせでの存在の有無により、特定腫瘍タイプの同定および治療選択が可能となる。

30

【 0 0 8 7 】

要約

セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの保存領域に対する重複プライマーは、卵巣癌で過剰発現される m R N A s の遺伝子セットをもたらした。明らかに過剰発現される遺伝子は、セリンプロテアーゼ、ヘプシン、角質層キモトリプシン酵素、プロテアーゼ M T A D D G 1 2、T A D G 1 4 およびメタロプロテアーゼ P U M P - 1 を含む (図 1 9 および表 7 参照のこと) 。図 1 4 に要約された正常組織および卵巣腫瘍組織のノーザンブロット分析により、ヘプシン、角質層キモトリプシン酵素、P U M P - 1 および T A D G - 1 4 の過剰発現が明らかになった。装填量を制御するために β - チューブリンプローブを含めた。

40

【 0 0 8 8 】

大抵、これらのタンパク質はこれまで卵巣癌細胞の細胞外マトリックスに関連付けられなかった。本明細書中に開示された 3 つの新規候補セリンプロテアーゼを初めとして、転

50

移性癌の増殖、シェディング、浸潤およびコロニー形成に寄与する可能性のあるプロテアーゼのパネルは、これまで記載されたことはなかった。悪性増殖または悪性程度のいずれかに関連する細胞外プロテアーゼパネルの確立は、診断マーカーまたは予後マーカーを同定する機会およびこれらプロテアーゼの抑制またはダウンレギュレーションによる治療的介入の機会を提供する。

【 0 0 8 9 】

腫瘍に特異的なプロテアーゼの適切な領域をコードする即席の遺伝子特異的プライマーが手軽に入手可能であることから、ノーザン分析およびサザン分析を用いた特異的 c D N A プローブの増幅が可能となり、組織中の癌の存在を検出するためのマーカーとしてのプロローブの使用が可能となる。プロローブにより、正常卵巣と比べて、初期ステージおよび進行期ステージの癌のみならず低悪性腫瘍における遺伝子発現のより広範な評価も可能となる。すべての癌の亜群から得た新鮮凍結組織のパネルの評価（表 4）により、あるプロテアーゼが初期ステージの疾患または特定の癌の亜群に顕著に発現されるか否かの特定が可能となる。各遺伝子の発現が腫瘍の進行における特定ステージに限定されるか否かおよび/または転移性病変に関連するか否かも特定された。プロテアーゼの特定の組み合わせを検出することは、特定の腫瘍型の特性を同定することであり、診断と治療の選択に対して有用な情報をもたらす。特定腫瘍型は、各特定腫瘍の特有の発現パターンにより正確に診断され得る。

【 表 7 】

表7

卵巣腫瘍におけるプロテアーゼの過剰発現

タイプ	N	ヘプシン	SCCE	Pump-1	プロテアーゼM
正常	10	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
LMP	12	58.3% (7/12)	66.7% (8/12)	75.0% (9/12)	75% (9/12)
漿液性	7	85.7% (6/7)	85.7% (6/7)	85.7% (6/7)	100% (7/7)
粘液性	5	20.0% (1/5)	40.0% (2/5)	60% (3/5)	40.0%(2/5)
癌	32	84.4% (27/32)	78.1% (25/32)	81.3% (26/32)	90.6% (29/32)
漿液性	19	94.7%(18/19)	89.5%(17/19)	78.9% (15/19)	94.7% (18/19)
粘液性	7	42.9%(3/7)	28.6%(2/7)	71.4% (5/7)	85.7% (6/7)
子宮内膜性	3	100% (3/3)	100%(3/3)	100% (3/)	100% (3/3)
明細胞性	3	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	67.7% (2/3)

【 実施例 1 0 】

【 0 0 9 0 】

ヘプシンペプチドのランキング

ワクチンまたは免疫刺激に関して、ヘプシンタンパク質の個別の 9 - 1 1 m e r ペプチドを調べて、一般住民における上位 8 つのハプロタイプに対する各ペプチドの結合をランク付けした (P a r k e r ら (1 9 9 4))。この分析に用いたコンピュータプログラムは、米国国立衛生研究所のウェブサイトに掲載されている。表 8 は、特定 H A L 対立形質 (H L A a l l e l e) に対する各ペプチドの結合の予想半減期に基づいたペプチドランキングを示す。より長い半減期は、ペプチドと特定 H L A (ヒト白血球抗原) 分子とのより強い会合を示唆する。 H L A 対立形質に強く結合するヘプシンペプチドは推定上の免疫原であり、ヘプシンに対して個体にワクチン接種するために用いられる。

【表 8 - 1】

表8 ヘプシンペプチドのランキング				
<u>HLAタイプ &ランキング</u>	<u>開始</u>	<u>ペプチド</u>	<u>予想解離1/2</u>	<u>配列番号</u>
HLA A0201				
1	170	SLGRWPWQV	521.640	28
2	191	SLLSGDWVL	243.051	29
3	229	GLQLGVQAV	159.970	30
4	392	KVSDFREWI 1	34.154	31
5	308	VLQEARVPI 7	2.717	32
6	130	RLLEVISVC	71.069	33
7	98	ALTHSELDV	69.552	34
8	211	VLSRWRVFA	46.451	35
9	26	LLLLTAIGA	31.249	36
10	284	ALVDGKICT	30.553	37
11	145	FLAAICQDC	22.853	38
12	192	LISGDWVLT	21.536	39
13	20	ALTAGTLLL	21.362	40
14	259	ALVHLSSPL	21.362	41
15	277	CLPAAGQAL	21.362	42
16	230	LQLGVQAVV	18.186	43
17	268	PLTEYIQPV	14.429	44
18	31	AIGAASWAI	10.759	45
19	285	LVDGKICTV	9.518	46
20	27	LLLLTAIGAA	9.343	47
HLA A0205				
1	191	SLLSGDWVL	25.200	48
2	163	IVGGRDTSI	23.800	49
3	392	KVSDFREWI	18.000	50
4	64	MVFDKTEGT	15.300	51
5	236	AVVYHGGYL	14.000	52
6	55	QVSSADARL	14.000	53
7	130	RLLEVISVC	9.000	54
8	230	LQLGVQAVV	8.160	55
9	20	ALTAGTLLL	7.000	56
10	259	ALVHLSSPL	7.000	57
11	277	CLPAAGQAL	7.000	58
12	17	KVAALTAGT	6.000	59
13	285	LVDGKICTV	5.440	60
14	308	VLQEARVPI	5.100	61
15	27	LLLLTAIGAA	5.100	62
16	229	GLQLGVQAV	4.000	63
17	313	RVPIISNDV	4.000	64
18	88	LSCEEMGFL	3.570	65

【表 8 - 2】

19	192	LLSGDWVLT	3.400	66	
20	284	ALVDGKICT	3.000	67	
HLA A1					
1	89	SCEEMGFLR	45.000	68	
2	58	SADARLMVF	25.000	69	
3	393	VSDFREWIF	7.500	70	
4	407	HSEASGMVT	6.750	71	
5	137	VCDCPRGRF	5.000	72	10
6	269	LTEYIQPVC	4.500	73	
7	47	DQEPLYPVQ	2.700	74	
8	119	CVDEGRLPH	2.500	75	
9	68	KTEGTWRL	2.250	76	
10	101	HSELDVRTA	1.350	77	
11	250	NSEENSNDI	1.350	78	
12	293	VTGWGNTQY	1.250	79	
13	231	QLGVQAVVY	1.000	80	
14	103	ELDVRTAGA	1.000	81	
15	378	GTGCALAQK	1.000	82	
16	358	VCEDSISRT	0.900	83	20
17	264	SSPLPLTEY	0.750	84	
18	87	GLSCEEMGF	0.500	85	
19	272	YIQPVCLPA	0.500	86	
20	345	GIDACQGDS	0.500	87	
HLA A24					
1	301	YYGQQAGVL	200.000	88	
2	238	VYHGGYLPF	100.000	89	
3	204	CFPERNRVL	36.000	90	
4	117	FFCVDEGRL	20.000	91	
5	124	RLPHTQRL	12.000	92	
6	80	RSNARVAGL	12.000	93	
7	68	KTEGTWRL	12.000	94	30
8	340	GYPEGGIDA	9.000	95	
9	242	GYPFRDPN	9.000	96	
10	51	LYPVQVSSA	7.500	97	
11	259	ALVHLSSPL	7.200	98	
12	277	CLPAAGQAL	7.200	99	
13	191	SLLSGDWVL	6.000	100	
14	210	RVLSRWRF	6.000	101	
15	222	VAQASPHGL	6.000	102	
16	236	AVVYHGGYL	6.000	103	
17	19	AALTAGTLL	6.000	104	
18	36	SWAIVAVLL	5.600	105	40
19	35	ASWAIVAVL	5.600	106	
20	300	QYYGQQAGV	5.600	107	
HLA B7					

【表 8 - 3】

	1	363	ISRTPRWRL	90.000	108	
	2	366	TPRWRLCGI	80.000	109	
	3	236	AVVYHGGYL	60.000	110	
	4	13	CSRPKVAAL	40.000	111	
	5	179	SLRYDGAHL	40.000	112	
	6	43	LLRSDQEPL	40.000	113	
	7	19	AALTAGTLL	36.000	114	
	8	55	QVSSADARL	20.000	115	
	9	163	IVGGRDTSI	20.000	116	10
	10	140	CPRGRFLAA	20.000	117	
	11	20	ALTAGTLLL	12.000	118	
	12	409	EASGMVTQL	12.000	119	
	13	259	ALVHLSSPL	12.000	120	
	14	35	ASWAIVAVL	12.000	121	
	15	184	GAHLCGGSL	12.000	122	
	16	18	VAALTAGTL	12.000	123	
	17	222	VAQASPHGL	12.000	124	
	18	224	QASPHGLQL	12.000	125	
	19	265	SPLPLTEYI	8.000	126	
	20	355	GPFVCEDSI	8.00	127	20
HLA B8						
	1	13	CSRPKVAAL	80.000	128	
	2	366	TPRWRLCGI	80.000	129	
	3	140	CPRGRFLAA	16.000	130	
	4	152	DCGRRKLPV	4.800	131	
	5	363	ISRTPRWRL	4.000	132	
	6	163	IVGGRDTSI	4.000	133	
	7	331	QIKPKMFCA	4.000	134	
	8	80	RSNARVAGL	2.000	135	
	9	179	SLRYDGAHL	1.600	136	
	10	43	LLRSDQEPL	1.600	137	30
	11	409	EASGMVTQL	1.600	138	
	12	311	EARVPIISN	0.800	139	
	13	222	VAQASPHGL	0.800	140	
	14	19	AALTAGTLL	0.800	141	
	15	18	VAALTAGTL	0.800	142	
	16	184	GAHLCGGSL	0.800	143	
	17	224	QASPHGLQL	0.800	144	
	18	82	NARVAGLSC	0.800	145	
	19	204	CFPERNRVL	0.600	146	
	20	212	LSRWRVFAG	0.400	147	
HLA B2702						
	1	172	GRWPWQVSL	300.000	148	40
	2	44	LRSDQEPLY	200.00	149	
	3	155	RRKLPVDRI	180.000	150	

【表 8 - 4】

4	213	SRWRVFAGA	100.000	151	
5	166	GRDTSLGRW	100.000	152	
6	369	WRLCGIVSW	100.000	153	
7	180	LYDGAHLC	100.000	154	
8	96	LRALTHSEL	60.000	155	
9	396	FREWIFQAI	60.000	156	
10	123	GRLPHTQRL	60.000	157	
11	207	ERNRVLSRW	30.000	158	
12	209	NRVLSRWV	20.000	159	10
13	14	SRPKVAALT	20.000	160	
14	106	VRTAGANGT	20.000	161	
15	129	QRLLEVISV	20.000	162	
16	349	CQGDSGGPF	20.000	163	
17	61	ARLMVFDKT	20.000	164	
18	215	WRVFAGAVA	20.000	165	
19	143	GRFLAAICQ	10.000	166	
20	246	FRDPNSEN	10.000	167	
HLA B4403					
1	132	LEVISVCDC	36.000	168	
2	91	EEMGFLRAL	18.000	169	20
3	264	SSPLPLTEY	13.500	170	
4	310	QEARVPIIS	12.000	171	
5	319	NDVCNGADF	10.000	172	
6	4	KEGGRTVPC	9.000	173	
7	251	SEENSNDIA	8.000	174	
8	256	NDIALVHLS	7.500	175	
9	294	TGWGNTQYY	6.750	176	
10	361	DSISRTPRW	6.750	177	
11	235	QAVVYHGGY	6.000	178	
12	109	AGANGTSGF	6.000	179	
13	270	TEYIQPVCL	6.000	180	30
14	174	WPWQVSLRY	4.500	181	
15	293	VTGWGNTQY	4.500	182	
16	69	TEGTWRLLC	4.000	183	
17	90	CEEMGFLRA	4.000	184	
18	252	BENSNDIAL	4.000	185	
19	48	QEPLYPVQV	4.000	186	
20	102	SELDVRTAG	3.600	187	

【実施例 11】

【0091】

40

ヒトCD8⁺細胞傷害性T細胞に対する標的エピトープとしてのヘプシンペプチド

2つのコンピュータプログラムを用いて、HLAクラスI分子の結合モチーフを含む9-merのペプチドを同定した。Parkerらにより考案された計画(1994)に基づいた1つ目のプログラムは、米国立衛生研究所の情報技術センターのBioinformatics and Molecular Analysis Section(生物情報科学および分子分析部門, BIMAS)により開発され、SYFPEITHIとして公知の2番目のプログラムは、ドイツのTubingen大学(ドイツ)のRammenseeらにより考案された。

【0092】

HLA A2.1 結合モチーフを含むペプチドを合成し、HLA A2.1 結合能を直接

50

試験した。この技術は、ペプチドトランスポーター欠損ペプチドであり、従ってペプチドを負荷しさらに表面発現のためにHLAクラスIフォールディングを安定化させることができないため内因性HLAクラスIの発現量が少ないT2細胞を用いる。HLA A2.1 (A*0201)に結合可能な内因性ペプチドの添加は、フローサイトメトリーにより明らかにされたように(Nijimanら(1993))細胞表面で適切に折り畳まれたHLA A2.1分子数を増やすことができることが示されている。

【0093】

以下に記載のように正常な成体ドナーから特異的CD8⁺CTL反応を誘導する能力について、HLA A2.1以外のHLAクラスI分子に対する結合モチーフを有するペプチドを直接試験した。

【0094】

単球由来のDCを、適切なHLAタイプを有する健常成体ドナーから採取された末梢血から作成した。接着性単球を標準的技術(Santínら(2000))に従い、GM-CSFおよびIL-4Aを添加したAIM-V培地(ギブコ-BRL社(Gibco-BRL))中で培養した。5-6日後、PGE₂、IL-1bおよびTNFαを加えてさらに48時間DCを成熟させた。

【0095】

成熟DCにペプチドを負荷し(2×10⁶のDCに1mlの無血清AIM-V培地に37で2時間50mg/mlのペプチドを負荷)、AIM-V培地中または5%ヒトAB型血清を添加したAIM-V培地中で1×10⁶/mlの末梢血単核細胞(PBMC)と一緒に培養する前に1回洗浄した。PBMC対DC比は20:1~30:1の間とした。7日後、ペプチド負荷放射線照射自己DCまたはPBMCで、それぞれ10:1~20:1または1:1~1:10の間の反応物対刺激物の比率で反応性T細胞を再刺激した。この時点で培養物に組換えヒトIL-2(10-100U/ml)を加え、新鮮培地にIL-2を添加した培地を2-4日毎に50-75%取り替えて供給した。14-21日毎のペプチド再刺激によりT細胞株を樹立および維持した。2回目または3回目の抗原刺激後に、抗CD8連結磁気ビーズ(ダイナル社(Dynal, Inc.))を用いたポジティブセクションにより反応性細胞であるCD8⁺T細胞を精製した。

【0096】

ペプチド特異的細胞傷害性を標準的な5-6時間のマイクロウェル⁵¹Cr放出アッセイ(Nazarukら(1998))により試験した。自己EBV-形質転換リンパ芽球細胞株(LCL)にペプチド(50ng/ml、37で1時間)を負荷し、続いて⁵¹Crで標識した(200-300ml中に50mCi、37で1時間)。10:1から1.25:1の間のエフェクター:標的比率で、ペプチド負荷⁵¹Cr標識LCLをCD8⁺T細胞と共に培養した。細胞傷害性は、培養物の上清中に放出された⁵¹Crの割合(%)として記録した。

【0097】

ヘプシンペプチド170-178

ヘプシンペプチド170-178(配列番号28)は、T2細胞におけるA2.1発現のアップレギュレーションにより示されるように(データは示されていない)、HLA A2.1結合ペプチドである。ヘプシン170-178に対して特異的なCD8⁺CTLは、ペプチド負荷自己LCLを殺傷したが、対照であるペプチドを含まないLCLは殺傷しなかった(図20)。異種HLA A2.1を発現するペプチド負荷LCLは効率的に殺傷されたが、HLA A2.1を欠く標的は殺傷されなかった。ナチュラルキラー感受性K562細胞は溶解されなかった。ヘプシン170-178負荷LCLに対する細胞傷害性は、非多形HLAクラスI決定基に対して特異的なMAbでブロックされ、溶解(殺傷)はHLAクラスI拘束性であることが確認された。細胞傷害性は、HLA A2.1に対して特異的なMAbによってもブロックされた。

【0098】

ヘプシンペプチド172-180

10

20

30

40

50

ヘプシンペプチド 172 - 180 (配列番号 148) は、HLA B27 と結合することがコンピュータ解析により予測された。このことは直接には証明されていないが、細胞傷害性アッセイは、ヘプシン 172 - 180 に特異的な CD8⁺CTL が、ペプチド負荷 HLA B27 発現自己および異種 LCL を殺傷できるが、異種 HLA B27 を発現しないペプチド負荷 LCL またはペプチドを含まない対照 LCL を認識できないことを示した。(図 21)。ナチュラルキラー感受性 K562 細胞は溶解されなかった。ヘプシン 172 - 180 負荷 LCL に対する細胞傷害性は、非多形 HLA クラス I 決定基に対して特異的な MA b によりブロックすることができ、溶解は HLA クラス I 拘束性であることが確認された。

【0099】

10

ヘプシンペプチド 42 - 51

ヘプシンペプチド 42 - 51 (配列番号 189) は、HLA A*0201 と結合することがコンピュータ解析により予測された。ヘプシン 42 - 51 に特異的な CD8⁺CTL によりペプチド負荷自己 LCL が殺傷されたが、対照であるペプチドを含まない LCL は殺傷されなかった(図 22)。異種 HLA A*0201 を発現するペプチド負荷 LCL は効率的に殺傷されたが、HLA A*0201 を欠く標的は殺傷されなかった。ナチュラルキラー感受性 K562 細胞は溶解されなかった。ヘプシン 42 - 51 が負荷された LCL に対する細胞傷害性は、非多形 HLA クラス I 決定基に対して特異的な MA b によりブロックすることができ、溶解は HLA クラス I 拘束性であることが確認された。細胞傷害性は、HLA A2.1 に対して特異的である MA b によってもブロックされた。

20

【0100】

ヘプシンペプチド 284 - 293

ヘプシンペプチド 284 - 293 (配列番号 190) は、HLA A*0201 と結合することがコンピュータ解析により予測された。ヘプシン 284 - 293 に特異的な CD8⁺CTL によりペプチド負荷自己 LCL が殺傷されたが、対照であるペプチドを含まない LCL は殺傷されなかった(図 23)。異種 HLA A*0201 を発現するペプチド負荷 LCL は効率的に殺傷されたが、HLA A*0201 を欠く標的は殺傷されなかった。ナチュラルキラー感受性 K562 細胞は溶解されなかった。ヘプシン 284 - 293 が負荷された LCL に対する細胞傷害性は、非多形 HLA クラス I 決定基に対して特異的な MA b によりブロックすることができ、溶解は HLA クラス I 拘束性であることが確認された。

30

【0101】

ヘプシンペプチド 308 - 317

ヘプシンペプチド 308 - 317 (配列番号 191) は、HLA A*0201 と結合することがコンピュータ解析により予測された。ヘプシン 308 - 317 に特異的な CD8⁺CTL によりペプチド負荷自己 LCL が殺傷されたが、対照であるペプチドを含まない LCL は殺傷されなかった(図 24)。異種 HLA A*0201 を発現するペプチド負荷 LCL は効率的に殺傷されたが、HLA A*0201 を欠く標的は殺傷されなかった。ナチュラルキラー感受性 K562 細胞は溶解されなかった。ヘプシン 308 - 317 が負荷された LCL に対する細胞傷害性は、非多形 HLA クラス I 決定基に対して特異的な MA b によりブロックすることができ、溶解は HLA クラス I 拘束性であることが確認された。

40

【実施例 12】

【0102】

CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の増殖反応を誘導する組換え完全長ヘプシン

以下の実施例は、組換え完全長ヘプシンを負荷された樹状細胞は、ヘプシンに対する CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の増殖反応の両方を誘導できることを示す。

【0103】

ヘプシン由来のペプチドを負荷された樹状細胞(DC)が、健常成体において HLA A2.1 拘束性および HLA B27 拘束性の CD8⁺CTL 反応を効率的に刺激し得るこ

50

とを示す上記に開示されている結果は、ヘプシンが卵巣癌の樹状細胞ベースの免疫療法の標的としての第一候補となり得ることを示唆する。さらに、免疫療法目的のための標的抗原としてのヘプシンの有用性は、卵巣癌に限定されないであろう。最近の一連の遺伝子発現のプロファイリング研究により、ヘプシンが前立腺癌の重要な腫瘍マーカーとして同定された。ヘプシンは、一貫して前立腺癌で高発現されたが、良性の前立腺肥大症では高発現されなかった (Luoら (2001)) ; Mageeら (2001) ; Welshら (2001) ; Dhanaasekaranら (2001) および Stameyら (2001))。これらの報告内容は、ヘプシンが前立腺癌の樹状細胞ベース免疫療法の標的としての第一候補にもなり得るとの提案を強く支持する。

【0104】

しかしながら、ペプチドの使用は、既定のHLAクラスIタイプに対する反応を限定し、それによって患者選択に制限が課せられる。完全長の組換え腫瘍抗原を負荷された樹状細胞を用いればこの問題は回避され、CD8⁺T細胞反応およびヘルパーCD4⁺T細胞反応の両方を誘導可能であるとの見込みをもたらし、後者は効果的な抗腫瘍免疫の誘導および維持において重要な役割を担うと考えられる。さらに、潜在的に重要な完全長の腫瘍抗原の使用による便益は、CD8⁺T細胞反応が自然に処理されたエピトープに対して誘導され、そのことは、CD8⁺T細胞が標的卵巣癌細胞により自然に処理および提示された内因的に合成された抗原を認識する可能性を著明に高める。

【0105】

ヘプシンcDNAをIPTG誘導性のpQE-30ベクター (キアゲン社 (Qiagen)) 内でクローン化し、大腸菌で発現させた。アミノ末端での6x-ヒスチジンタグの付加は、Ni-NTA樹脂によるアフィニティー精製を促進する。樹状細胞は、上述したように末梢血単球前駆体由来する。成熟樹状細胞は、HLAクラスIおよびクラスII分子、補助シグナル分子 (例えば、CD86およびCD40) およびCD83 (成熟樹状細胞で発現するが、未成熟単球由来樹状細胞では発現しない) を高発現するが、CD14 (マクロファージおよび単球マーカー) を発現しない。

【0106】

ヘプシン特異的T細胞の増殖を誘導するため、DOTAPリポフェクションにより、精製した組換えヘプシンを成熟樹状細胞に負荷した。簡潔に言えば、500mlのAIM-V培地中 (インビトロゲン社 (Invitrogen), グランドアイランド (Grand Island), NY) において、25mgのヘプシンを15mgのDOTAP (ロシュアブアイドサイエンス社 (Roche Applied Science), インディアナポリス (Indianapolis), IN) と混合した。この混合物を37で2時間まで1-2x10⁶個の樹状細胞と共にインキュベートした。5%ヒトAB型血清を加えたAIM-V培地中、30:1の反応物-刺激物比で、健常成体ドナーから得た自己末梢血リンパ球と共にヘプシン負荷樹状細胞を共培養した。7-10日後、10:1の反応物-刺激物比で、ヘプシン負荷樹状細胞で反応性T細胞を再刺激した。T細胞培養物に組換えIL-2 (10-100U/ml) を添加し、IL-2を加えた培地を2-4日毎に50-75%取り替えて供給した。その後14日毎にヘプシン負荷DCでの再刺激によりT細胞株を維持した。3回目の再刺激前に、必要に応じて抗CD4⁺T細胞および抗CD8⁺T細胞連結磁気ビーズを用いたポジティブセレクションにより、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を精製した。得られた集団は、フローサイトメトリーによれば98%を超える純度であった。

【0107】

CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を、それぞれ4回目および5回目の継代後にマイクロウェルリンパ球増殖アッセイで試験した。DOTAPリポフェクション (5x10³/ウェル) によりヘプシンを負荷した樹状細胞またはDOTAPのみ (5x10⁴/ウェル) で処理した対照樹状細胞と共に、T細胞 (2x10⁴/ウェル) を培養した。アッセイは72時間培養して行った。増殖反応は、各マイクロウェル培養物に³H-チミジン (1mCi/ウェル) を最後の24時間添加して測定した。測定結果は、刺激指数 (単独

10

20

30

40

50

培養したT細胞による³H-チミジンの取込み量に対する樹状細胞を用いて培養したT細胞による³H-チミジンの取込み量の比率)として計算した3つのマイクロウェルの平均として示す。

【0108】

対照樹状細胞による刺激に反応した一部の環境増殖が認められたが、このアッセイは、ヘプシンを負荷した樹状細胞がCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の両方による有意な抗原特異的リンパ球増殖反応を誘導できることを明確に示す(図25)。これらの結果は、腫瘍標的抗原としてヘプシンを用いた樹状細胞ベース免疫療法の可能性を強調する。

【0109】

完全長のヘプシンを発現する組換えアデノウイルスに感染した自己樹状細胞の認識によって示されるように、ヘプシン特異的CD4⁺T細胞は、内因的に合成されたヘプシン抗原を発現する標的細胞も認識する(図26)。ヘプシン特異的CD4⁺T細胞は、ヘプシン腫瘍抗原を処理および提示する標的を認識すると、IFN γ も発現する(図27)。IFN γ は、エフェクターCD8⁺細胞傷害性T細胞の反応を支援するTh1ヘルパーCD4⁺T細胞の反応のための重要サイトカインであることから、IFN γ の発現は重要である。IFN γ は、抗腫瘍免疫において直接的な腫瘍特異的細胞傷害性反応よりも重要な役割も果たし得る。

【0110】

要約すれば、本発明は、特にヘプシンを標的とし、さらにヘプシンを発現する腫瘍の治療に適用される、免疫療法用途を提供する。標的疾患には卵巣癌および前立腺癌が含まれるが、ヘプシンの発現が証明され得る任意のその他の悪性腫瘍も含む。免疫療法用途は下記のものを含むがそれらに限定されるものではない：免疫療法はヘプシン負荷樹状細胞のワクチン接種の形態をとることが可能であり、その療法では、樹状細胞を患者から採取した抹消血からin vitroで作成し、リポフェクション法またはその他の方法によりヘプシンを負荷し、続いて、単回投与または複数回投与のいずれかにより自己細胞ワクチンとして患者に戻す。ヘプシンは、組換えDNAベクターを用いた形質導入後に樹状細胞で発現させることも可能であり、そのようなヘプシン形質導入樹状細胞は、次に細胞ワクチンとして用いることができる。

【0111】

単独でまたはその他の免疫学的活性成分との融合タンパク質としてのいずれでヘプシンを発現する組換えDNAベクターは、ヘプシンを発現する腫瘍の治療のためのDNAワクチンとして用いることが可能である。ヘプシンを負荷された樹状細胞またはヘプシンを発現する樹状細胞は、in vitroで抗原特異的T細胞反応を誘導するのに用いることができ、その後、患者に自己ヘプシン特異的T細胞が投与される養子免疫療法が実施される。

【0112】

ヘプシンに基づくモノクローナル抗体療法も明らかである。ヘプシンは、腫瘍細胞の表面において膜貫通タンパク質として発現される。ヘプシンに特異的なヒトモノクローナル抗体またはキメラヒト化モノクローナル抗体の構築は、ヘプシンを発現する悪性腫瘍の免疫療法のための魅力的な選択肢を提供する。

【実施例13】

【0113】

ヘプシンペプチド170-178に特異的なCD8⁺CTLは、内因的に発現されたヘプシン腫瘍抗原を認識する

ペプチド特異的CD8⁺CTLが、内因的に発現されたヘプシン腫瘍抗原を処理および提示する標的を認識できるか否かを特定するため、フローサイトメーター技術により発現量を直接監視する手段として、共にグリーン蛍光タンパク質(GFP)と結合したヘプシンおよびSCCEを発現する組換えアデノウイルスを構築した。ヘプシン170-178に特異的なCD8⁺CTLは、完全長のヘプシン抗原(Ad-GFP/ヘプシン)を発現する組換えアデノウイルスに感染した自己標的を認識および殺傷したが、Ad-GFP/SCCEに感染した標的は認識しないことが認められた(図28)。これらの結果は、ヘ

10

20

30

40

50

プシン 170 - 178 ペプチドが、ヘプシン特異的 CD8⁺CTL のための自然に処理および提示された CTL エピトープであることを示す。

【実施例 14】

【0114】

ヘプシン変異体

セリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、腫瘍によって高発現および分泌されるため、それらは診断および治療の潜在的標的となり得る。これらの酵素の多くが、腫瘍により優勢的に産生されるが、しばしば少数の正常な組織においてもある程度発現される。

【0115】

より特異的な腫瘍の診断および標的化の可能性をさらに高めるために、酵素ファミリーに属する可能性のある独特な配列を提供することが有用であろう。本実施例は、ヘプシン酵素の転写変異体を開示する。ヘプシン変異体は、腫瘍におけるヘプシンの認識に潜在的特異性をもたらすことができる独特なイントロン配列を含む。

【0116】

ヘプシン遺伝子の完全転写物を潜在変異体に関して調べた時、エクソン 12 とエクソン 13 との間のイントロン配列を含む 1 つの変異体が検出された。卵巣癌および前立腺癌から得た組織および正常組織の PCR 分析は、イントロン 12 の完全配列を含むヘプシン変異体の発現のためのより大きなサイズでかつ適切な長さの PCR バンドの発現を確認した。

【0117】

図 29 は、卵巣癌および前立腺癌におけるヘプシン変異体の発現を示す。より広範な前立腺癌群を調べることにより、調べた前立腺癌のすべてでこの変異体ヘプシン V12 の存在が示された (図 30)。これまでのところ、ヘプシン V12 は 4 / 6 例の卵巣癌と 10 / 10 例の前立腺癌で発現が認められている。

【0118】

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーをヘプシンのエクソン 12 および 13 に対して作成した (ヘプシン V センス 5' - GCG GTG GTC CCT TTG TG TGT - 3', 配列番号 192; ヘプシン V アンチセンス 5' - AAG AGC ATC CCG TCA TCA GG - 3', 配列番号 193)。すべての PCR は、50 ng の mRNA から得られた卵巣癌 cDNA、それぞれ 5 pmol のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、0.2 nmol の dNTPs、2.5 nmol の MgCl₂ および 1 × 緩衝液中の Taq ポリメラーゼ 1 U から成る 20 μl の反応物中で実施した。この混合液に 94 で 1.5 分の変性を施し、続いて下記を含む 35 サイクルの PCR を実施した: 94 で 30 秒間の変性、各プライマーセットに対して適切な温度で 30 秒間のアニーリング、およびサイクル後の 72 で 1 分間の伸長、最終サイクルではさらに 7 分間の伸長を含む。

【0119】

イントロン 12 の配列が含まれると、追加されたイントロン配列の中央あたりに停止コドンが存在するため、転写サイズの伸長 (図 31)、および修飾アミノ酸配列をもたらした (図 32)。ヘプシンのイントロン 12 の発現に関する EST データの分析は、腎の明細胞癌およびジャーカット細胞株にイントロン 12 の存在を示唆する。ヘプシンのイントロン 12 に由来する切断アミノ酸配列の存在は、この変異体を発現する腫瘍のより特異的な診断および標的化の可能性を提供する。対象となる腫瘍は、卵巣癌、前立腺癌および腎癌を含むが、これらに限定されない。

【0120】

ヘプシン変異体の免疫原性は以下のように評価することができる。ヘプシン変異体は、単一ペプチド (例えばアミノ酸 16 個のペプチド) として合成することができ、さらにこれらペプチドを用いて樹状細胞 (DC) をパルスすることができる。あるいは、12 番目のエクソンからの変異配列およびランキング配列を組み込んだペプチドを合成することができる。後者のアプローチの理論的根拠は、エクソン - イントロン接合が新規な免疫原

10

20

30

40

50

性エピトープをコードし得ることである。次に、各ペプチドによりパルスされた自己刺激細胞（LCLまたはDC）に対する増殖アッセイでCD4⁺ヘルパーT細胞の反応を評価することができる。CD8⁺CTL反応は、完全長のヘプシンを発現する組換えアデノウイルスに感染した自己マクロファージ標的、および変異抗原を発現する自己腫瘍細胞またはHLA適合腫瘍細胞に対して試験することができる。

【0121】

下記の参考文献を本明細書中で引用した：

Anisowicz et al., Molecular Medicine, 2:624-636(1996).

Dhanasekaran et al., Nature, 412:822-826(2001).

Hall et al., Mol. Cell. Biol., 3:854-862(1983).

Leytus et al., Biochemistry, 27:1067-1074(1988).

Luo et al., Cancer Res, 61:4683-4688(2001).

Magee et al., Cancer Res, 61:5692-5696(2001).

Nazaruk et al., Blood, 91:3875-3883(1998).

Nijman et al., Eur. J. Immunol. 23:1215-1219(1993).

Noonan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌, 87:7160-7164(1990).

Parker et al., J. Immunol. 152:163-175(1994).

Powell et al., Cancer Research, 53:417-422(1993).

Sakanari et al., Biochemistry, 86:4863-4867(1989).

Santin et al., Obstetrics&Gynecology, 96:422-430(2000).

Santin et al., AM. J. Obstet. Gynecol. 183:601-609(2000).

Stamey et al., J. Urol. 166:2171-2177(2001).

Torres-Rosedo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌, 90:7181-7185(1993).

Welsh et al., Cancer Res. 61:5974-5978(2001)

本明細書に記載されたすべての特許または文献は、本発明が属する技術分野の当業者のレベルを示す。さらに、これらの特許および文献は、各文献が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが指示されたのと同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】図1は、正常なcDNAおよび癌のcDNAに由来するPCR産物のアガロースゲルの比較を示す。

【図2】図2は、ヘプシン、SCCE、PUMP-1、TAG-14およびβ-チューブリンのプロンプを用いた卵巣癌のノーザンブロット分析を示す。

【図3】図3は、セリンプロテアーゼ重複プライマー群を用いた増幅を示す：正常なcDNA（レーン1）および腫瘍のcDNA（レーン2）を用いた、アスパラギン酸アンチセンス（AS1）とヒスチジンセンス（S1）プライマーでの増幅；ならびに正常なcDNA（レーン3）および腫瘍のcDNA（レーン4）を用いた、セリンアンチセンス（AS2）とヒスチジンセンス（S1）プライマーでの増幅。

【図4】図4は、システインプロテアーゼ重複プライマーを用いた増幅を示す。正常細胞（レーン1）、低悪性細胞（レーン2）、漿液性細胞（レーン3）、粘液癌（レーン4）および明細胞癌（レーン5）。

【図5】図5は、メタロプロテアーゼ重複プライマーを用いた増幅を示す。正常細胞（レーン1）、低悪性細胞（レーン2）、漿液性細胞（レーン3）、粘液癌（レーン4）および明細胞癌（レーン5）。

【図6】図6は、セリンプロテアーゼであるヘプシンに対する特異的プライマーによる増幅を示す。正常細胞（レーン1-3）、低悪性腫瘍（レーン4-8）および卵巣癌（レーン9-12）での発現。

【図7】図7は、正常細胞、低悪性腫瘍および卵巣癌におけるヘプシンの発現量を示す。Sは漿液性、Mは粘液性、LMPは低悪性腫瘍を示す。

【図8】図8は、正常細胞、低悪性腫瘍および卵巣癌におけるセリンプロテアーゼ角質層

キモトリプシン酵素 (SCCE) の発現を示す。

【図 9】図 9 は、正常細胞 (レーン 1 - 2) および卵巣癌組織 (レーン 3 - 10) におけるメタロプロテアーゼ PUMP - 1 (MMP - 7) の遺伝子発現を示す。

【図 10】図 10 A は、正常卵巣および卵巣癌におけるヘプシン発現のノーザンブロット分析を示す。レーン 1 は正常卵巣 (症例 10) ; レーン 2 は漿液性癌 (症例 35) ; レーン 3 は粘液癌 (症例 48) ; レーン 4 は子宮内膜性癌 (症例 51) およびレーン 5 は明細胞癌 (症例 54) である。症例 35、51 および 54 では、ヘプシン 1.8 kb の転写産物の 10 倍を超える増加が認められた。図 10 B は、正常なヒト胎児におけるヘプシンのノーザンブロット分析を示す。図 10 C は、成体組織におけるヘプシンのノーザンブロット分析を示す。ヘプシン転写産物の有意な過剰発現が、胎児肝および胎児腎の両方に認められる。注目すべきことに、ヘプシンの過剰発現は成体組織中には認められない。バックグラウンド値を超える軽度の発現が成体の前立腺中に認められる。

10

【図 11】図 11 A は、正常組織 (N)、粘液性 (M) および漿液性 (S) の低悪性 (LMP) 腫瘍、および癌 (CA) におけるヘプシン発現を示す。β - チューブリンが内部対照として用いられた。図 11 B は、正常卵巣、LMP 腫瘍および卵巣癌におけるヘプシン : β - チューブリンの割合を示す。ヘプシンの mRNA 発現量は、正常卵巣と比べて、LMP 腫瘍 ($p < 0.005$) および癌 ($p < 0.0001$) において有意に増加した。正常卵巣 10 症例すべてが相対的に低レベルのヘプシン mRNA 発現を示す。

【図 12】図 12 A は、胎児組織における SCCE 遺伝子の mRNA 発現のノーザンブロット分析を示す。図 12 B は、卵巣組織における SCCE 遺伝子の mRNA 発現のノーザンブロット分析を示す。

20

【図 13】図 13 A は、正常な卵巣および卵巣癌から得た SCCE の cDNA の定量的 PCR の比較を示す。図 13 B は、正常組織 10 例および卵巣癌組織 44 例における β - チューブリンに対する SCCE の割合を比較した棒グラフを示す。

【図 14】図 14 は、正常組織および卵巣癌でのプロテアーゼ M の mRNA の発現の定量的 PCR による比較を示す。

【図 15】図 15 は、His 5' の末端付近の挿入部分を含む TADG - 12 触媒ドメインを示す。

【図 16】図 16 A は、正常組織および卵巣癌における TADG - 14 の発現を比較したノーザンブロット分析を示す。図 16 B は、正常組織および癌の cDNA における、TADG - 14 に対する特異的プライマーを用いた予備的な定量的 PCR 増幅を示す。

30

【図 17】図 17 A は、ヒト胎児組織における PUMP - 1 遺伝子のノーザンブロット分析を示す。図 17 B は、正常な卵巣および卵巣癌における PUMP - 1 遺伝子のノーザンブロット分析を示す。

【図 18】図 18 A は、β - チューブリン内部対照による定量的 PCR を用いた正常組織および癌組織における PUMP - 1 の発現の比較を示す。図 18 B は、正常組織 10 例および卵巣癌 44 例における β - チューブリン内部対照と比較した PUMP - 1 の mRNA 発現比を示す。

【図 19】図 19 は、ヘプシン、SCCE、プロテアーゼ M、PUMP - 1 遺伝子およびカテプシン L 遺伝子の PCR 増幅産物の比較を示す。

40

【図 20】図 20 は、5 時間の ^{51}Cr 放出アッセイにおけるヘプシン 170 - 178 ペプチドの CD8⁺ CTL 認識を示す。標的はヘプシン 170 - 178 (閉環) が負荷された LCL および対照 LCL (開環) であった。

【図 21】図 21 は、5 時間の ^{51}Cr 放出アッセイにおけるヘプシン 172 - 180 ペプチドの CD8⁺ CTL 認識を示す。標的はヘプシン 170 - 180 (閉環) が負荷された LCL および対照 LCL (開環) であった。

【図 22】図 22 は、5 時間の ^{51}Cr 放出アッセイにおけるヘプシン 42 - 51 ペプチドの CD8⁺ CTL 認識を示す。標的はヘプシン 42 - 51 (四角形) が負荷された LCL、対照 LCL (三角形) および K562 細胞 (ダイヤモンド形) であった。

【図 23】図 23 は、5 時間の ^{51}Cr 放出アッセイにおけるヘプシン 284 - 293 ペ

50

プチドのCD8⁺CTL認識を示す。標的はヘプシン284-293（閉環）が負荷されたLCL、対照LCL（開環）であった。

【図24】図24は、5時間の⁵¹Cr放出アッセイにおけるヘプシン308-317プチドのCD8⁺CTL認識を示す。標的細胞はヘプシン308-317が負荷されたまたは負荷されていないLCLであった。

【図25】図25は、完全長のヘプシントタンパク質により誘導されたCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の増殖反応を示す。色の付いたヒストグラムはヘプシンが負荷された樹状細胞により誘導されたT細胞に対する刺激指数を表し、空のヒストグラムは対照樹状細胞により誘導されたT細胞に対する刺激指数を表す。

【図26】図26は、組換えアデノウイルス発現ヘプシンに感染したDOTAP/ヘプシン負荷樹状細胞（DC）認識DCによる刺激を通じて誘導されたドナー1名から得たヘプシン特異的CD4⁺T細胞系を示す。増殖アッセイの結果は刺激指数として表す。標的は、ヘプシンを発現する組換えアデノウイルスに感染し、かつグリーン蛍光タンパク質で標識した樹状細胞（黒棒）またはグリーン蛍光タンパク質で標識したのみの樹状細胞（白棒）である。

10

【図27】図27は、完全長の組換えヘプシンに特異的なドナー1のCD4⁺T細胞によるIFNγの産生に対するELISPOTアッセイを示す。CD4⁺T細胞は、DOTAPのみにより処理（左側のパネル）された対照LCLまたはDOTAP/ヘプシンを用いてパルスされたLCL（右側のパネル）により一晩刺激を加えた。

【図28】図28は、内生的に処理および提示されたヘプシン腫瘍抗原のペプチド特異的CD8⁺CTL認識を示す。ヘプシンペプチド170-178でパルスした樹状細胞を用いた刺激によってCTLを誘導した。Ad-GFP/ヘプシン（三角形）に感染させた自己由来のマクロファージ、Ad-GFP-SCCE（ダイヤモンド形）に感染させたマクロファージ、ヘプシン170-178ペプチドでパルスしたマクロファージ（四角形）、または対照の未処理マクロファージ（黒丸形）に対して、標準的な5時間の⁵¹Cr-放出アッセイで細胞傷害性を試験した。

20

【図29】図29は、卵巣癌および前立腺癌におけるヘプシンの発現およびヘプシントタンパク質変異体の発現を示す。

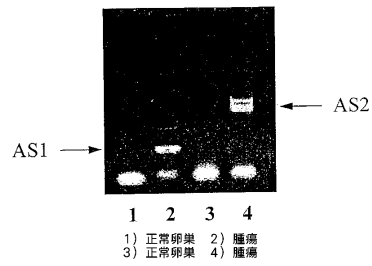
【図30】図30は、前立腺癌におけるヘプシントタンパク質変異体のPCR分析を示す。

【図31】図31は、ヘプシンおよびヘプシンイントロン12変異体の転写産物およびオープンリーディングフレームの図解を示す。

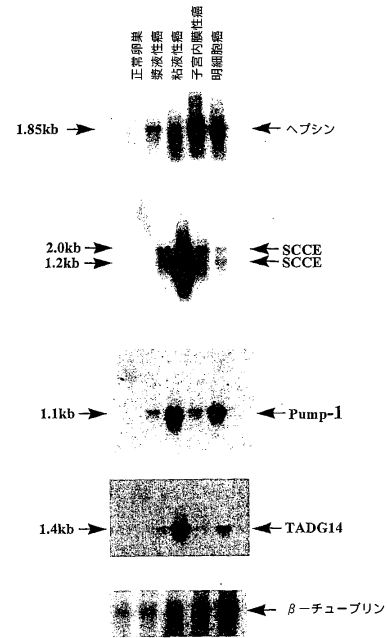
30

【図32】図32は、ヘプシンとヘプシントタンパク質変異体のアミノ酸配列の比較を示す。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

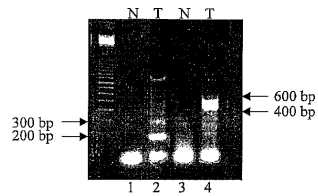
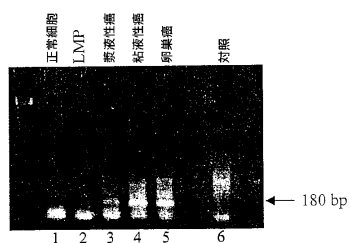
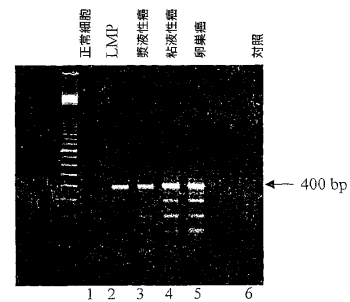


Fig. 3

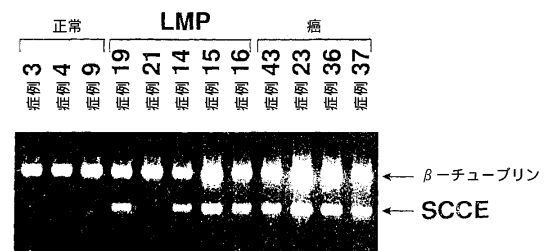
【図 4】



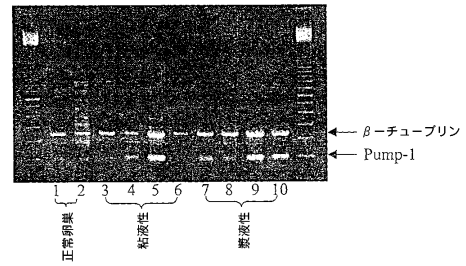
【図 5】



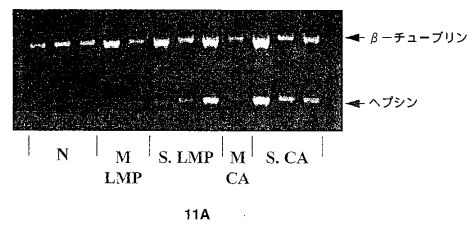
【図 6】



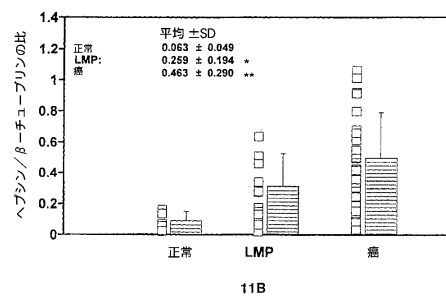
【 図 9 】



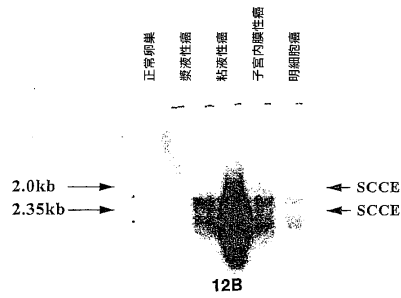
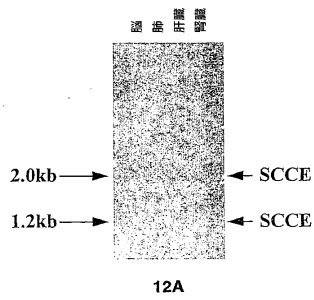
【 図 1 1 】



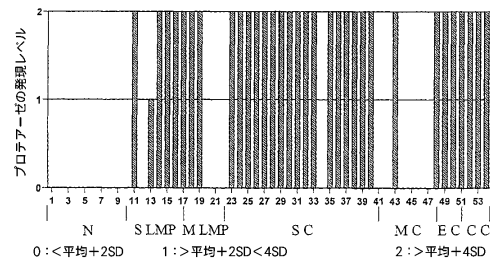
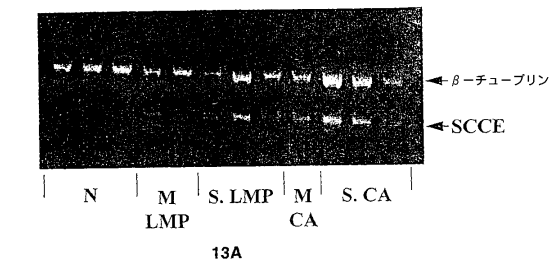
1.4



【図 12】

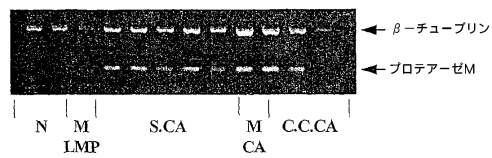


【図 13】

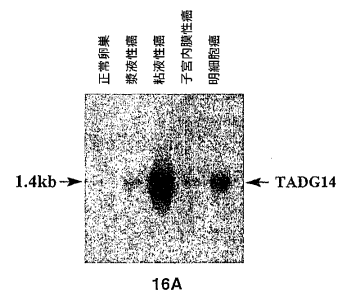


13B

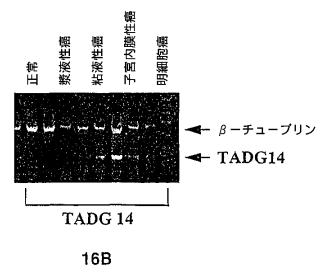
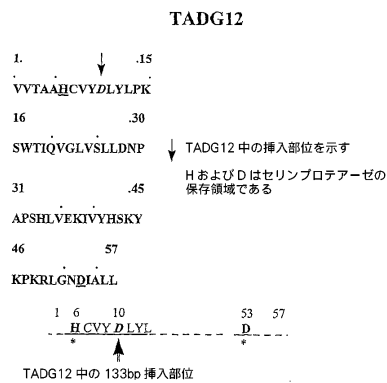
【図 14】



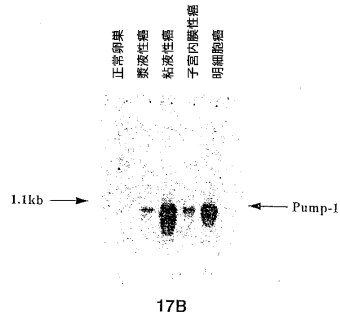
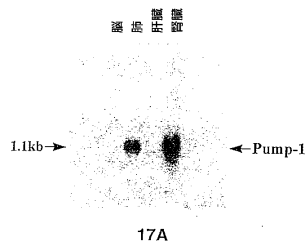
【図 16】



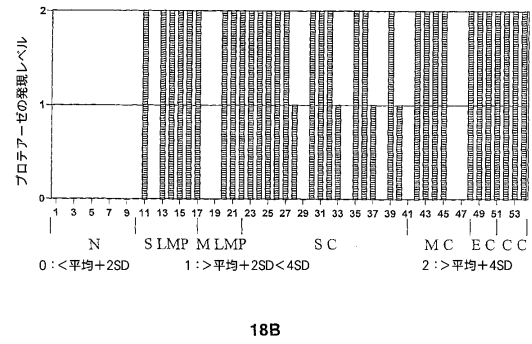
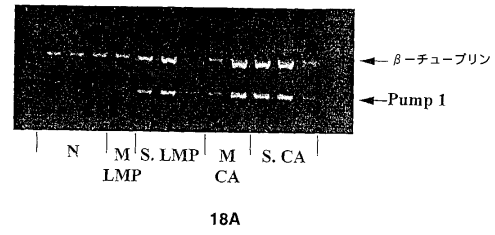
【図 15】



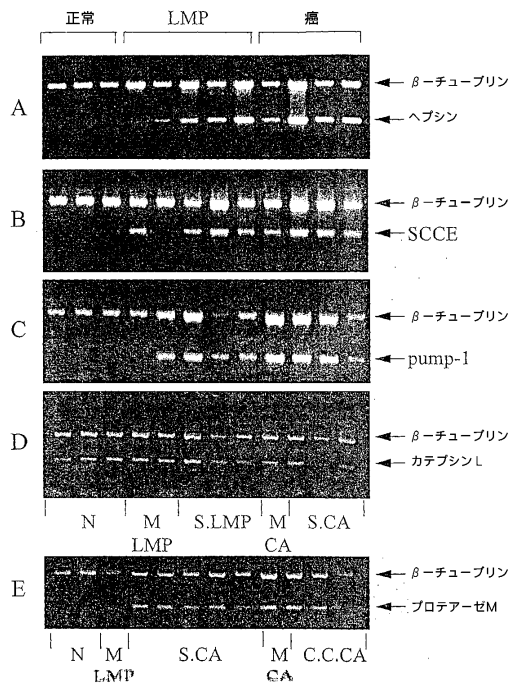
【図 17】



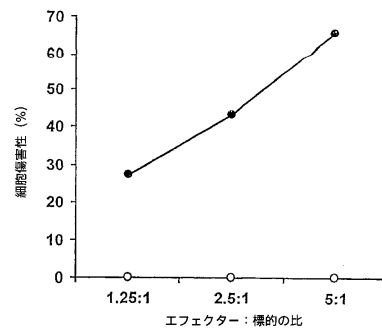
【図 18】



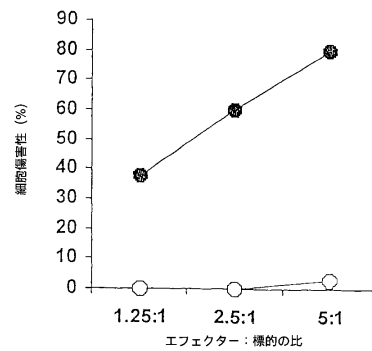
【図 19】



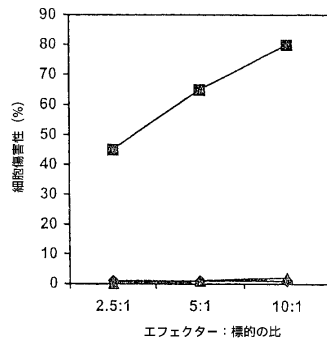
【図 20】



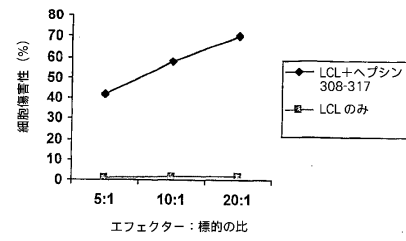
【図 21】



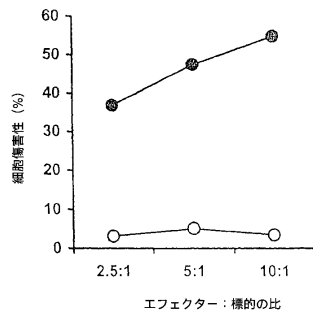
【図 2 2】



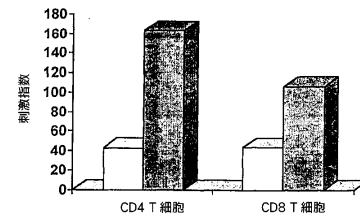
【図 2 4】



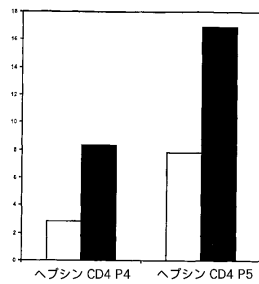
【図 2 3】



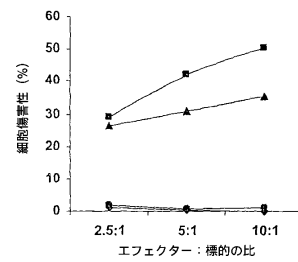
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 8】



【図 2 7】

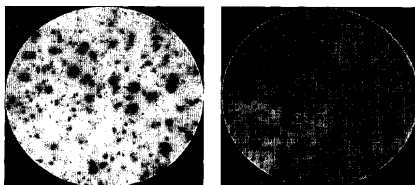
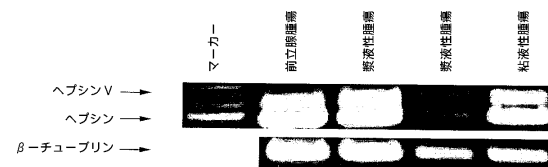
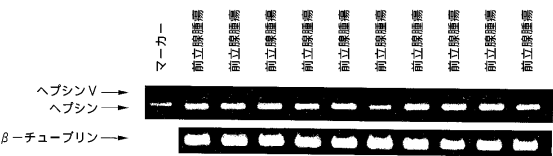


Fig. 27

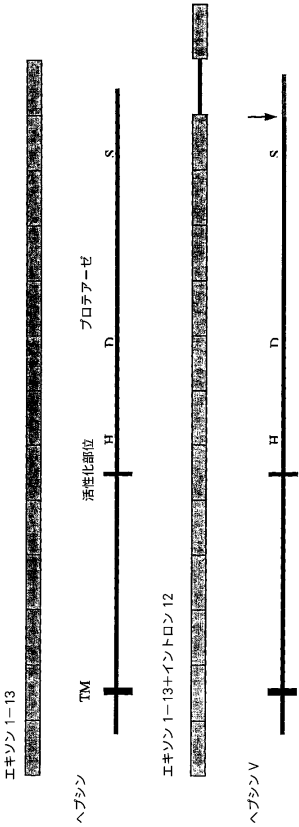
【図 2 9】



【図 3 0】



【図 3 1】



【図 3 2】

ヘプシン QGDSGGPFVC EDSISRTPRW RLCGIVSWGTCALAQKPGV
ヘプシン V 12 QGDSGGPFVC EDSISRTPRW RLCGIVSWGTCALAQKPGV

ヘプシン YTKVSDFREW IFQAIKTHSE ASGMVTQL* ~ ~ 配列番号 194
ヘプシン V 12 YTKVSDFREW IFQAIKVKVG SRWEPGWGRL GV*, 配列番号 195

【配列表】

0004960093000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 オブライアン, ティモシー
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 7 リトル ロック ノース ピアース 2 6 1 0
- (72)発明者 カノン, マーティン ジェイ
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 2 7 リトル ロック グレンリー ドライヴ 6
- (72)発明者 ビアード, ジョン
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 2 リトル ロック キャントレル ナンバー 3 0 8
3 7 0 0
- (72)発明者 サンティン, アレッサンドロ
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 5 リトル ロック エヌ パーム ストリート 1
0 2 1
- (72)発明者 重政 和志
日本国 7 3 4 - 0 0 0 2 広島県広島市南区西旭 1 1 - 3 - 2 0 3

審査官 安藤 公祐

- (56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 2 3 5 2 4 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 2 7 1 8 1 (U S , A 1)
SANTIN, A.D. et al, Novel immunotherapeutic strategies in gynecologic oncology. Dendritic cell-based immunotherapy for ovarian cancer, Minerva Ginecol, 2 0 0 2 年, Vol.54, No.2, p.133-44
CANNON, M.J. et al, Novel target antigens for dendritic cell-based immunotherapy against ovarian cancer, Expert Rev Anticancer Ther, 2 0 0 2 年, Vol.2, No.1, p.97-105
LEYTUS, S.P. et al, A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells, Biochemistry, 1 9 8 8 年, Vol.27, No.3, p.1067-74

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/09
A61K 35/76
A61K 38/48
A61K 39/00
A61K 39/39
A61K 39/395
A61K 48/00
A61P 35/00
C12N 9/64
C12Q 1/02
C12Q 1/04
C12Q 1/37
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed