

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4803460号  
(P4803460)

(45) 発行日 平成23年10月26日(2011.10.26)

(24) 登録日 平成23年8月19日(2011.8.19)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	C 0 7 K 14/82
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06 Z N A
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 16 (全 20 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2007-529482 (P2007-529482)  
 (86) (22) 出願日 平成18年7月27日(2006.7.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/314896  
 (87) 国際公開番号 W02007/018047  
 (87) 国際公開日 平成19年2月15日(2007.2.15)  
 審査請求日 平成20年3月24日(2008.3.24)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-230657 (P2005-230657)  
 (32) 優先日 平成17年8月9日(2005.8.9)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 599045903  
 学校法人 久留米大学  
 福岡県久留米市旭町67番地  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 稔  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 卓二  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100138911  
 弁理士 櫻井 陽子  
 (72) 発明者 伊東 恭悟  
 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学  
 医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A - A 2 4 分子結合性扁平上皮癌抗原由来ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 3】

請求項 2 記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 3 記載のベクターを含む、扁平上皮癌を処置または予防するための医薬組成物。

【請求項 5】

配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドを含む、癌ワクチンである請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

扁平上皮癌を処置または予防するための医薬の製造における、請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 3 記載のベクターの使用。

【請求項 7】

医薬が配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドを含む癌ワクチンである、請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】

HLA-A24陽性扁平上皮癌患者より採取された末梢血単核細胞を請求項 1 に記載のペプチドと接触させることを含む、扁平上皮癌反応性細胞傷害性 T 細胞を誘導する方法。

【請求項 9】

請求項 8 記載の方法により誘導された細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のペプチドを含む、扁平上皮癌反応性細胞傷害性 T 細胞を誘導するためのキット。

【請求項 11】

HLA-A24陽性扁平上皮癌患者に由来する抗原提示能を有する細胞に、請求項 1 に記載のペプチドを取り込ませること、または請求項 3 記載のベクターを導入することを含む、扁平上皮癌抗原由来ペプチドとHLA-A24分子との複合体を細胞表面に提示する抗原提示細胞を調製する方法。

10

【請求項 12】

請求項 11 記載の方法により調製された抗原提示細胞。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 3 記載のベクターを含む、扁平上皮癌抗原由来ペプチドとHLA-A24分子との複合体を細胞表面に提示する抗原提示細胞を調製するためのキット。

【請求項 14】

配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドを含む、食道癌を処置または予防するための医薬組成物。

20

【請求項 15】

配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドにより誘導された細胞傷害性 T 細胞を含む食道癌治療または予防用医薬組成物。

【請求項 16】

配列番号 5 または 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドにより誘導された細胞傷害性 T 細胞を含む扁平上皮癌治療または予防用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、HLA-A24陽性扁平上皮癌患者に対する特異的免疫療法に有用な扁平上皮癌抗原由来ペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

扁平上皮癌抗原(SCCA)は、扁平上皮癌(SCC)細胞に発現する癌関連抗原である(非特許文献1)。SCCAは、正常扁平上皮や健常人の唾液、気道内分泌物、および羊水でも検出されるが(非特許文献2、3)、SCCの有用なマーカーと考えられている(非特許文献4)。現在SCCAは、頭頸部、肺、および外陰のSCCで無病生存率および全生存率の予測に使用されている(非特許文献5-7)。さらに、子宮頸部SCC患者でSCCAレベルの上昇が疾患の重症度と相関することが、いくつかの研究によって確認された(非特許文献8-12)。これら一連の証拠は、SCCAが扁平上皮癌に対する抗腫瘍免疫療法の開発にとって有望な候補分子であることを示唆する。

40

【0003】

本発明者らは、各種癌関連抗原および癌反応性の細胞傷害性T細胞(CTL)に認識されるそれらのエピトープペプチドを同定し(非特許文献13-15)、各種癌に対するペプチド基盤ワクチンの臨床試験を行っている(非特許文献16-19)。この臨床試験において、幾つかのCTL誘導性ペプチドは、in vivoで細胞性免疫応答と液性免疫応答の両方を引き起こす能力を示した。さらに、ペプチドワクチン投与をうけた進行性癌患者のワクチン投与後の血清中の抗ペプチド抗体のレベルは、その全生存率と非常によく一致した(非特許文献20)。

50

## 【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977;40:1621-8.

【非特許文献 2】Kato H, Morioka H, Aramaki S, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor-antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol* 1979;25:51-6.

【非特許文献 3】Takeshima S, Suminami Y, Takeda O, Abe H, Kato H. Origin of CA125 and SCC antigen in human amniotic fluid. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1993;19:199-204.

【非特許文献 4】Kato H, Miyauchi F, Morioka H, Fujino T, Torigoe T. Tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma: correlation of circulation levels with disease progress. *Cancer* 1979;43:585-90.

10

【非特許文献 5】Lara PC, Cuyas JM. The role of squamous cell carcinoma antigen in the management of laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Cancer* 1995;76:758-64.

【非特許文献 6】Snyderman CH, D'Amico F, Wagner R, Eibling DE. A reappraisal of the squamous cell carcinoma antigen as a tumor marker in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1294-7.

【非特許文献 7】Hefler L, Obermair A, Tempfer C, et al. Serum concentration of squamous cell carcinoma antigen in patients with vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer. *Int J Cancer* 1999;84:299-303.

20

【非特許文献 8】Senekjian EK, Young JM, Weiser PA, Spencer CE, Magic SE, Herbst AL. An evaluation of squamous cell carcinoma antigen in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:433-9.

【非特許文献 9】Duk JM, de Bruijn HWA, Groenier KH, et al. Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations. *Gynecol Oncol* 1989;89:186-94.

【非特許文献 10】Bolli JA, Doering DL, Bosscher JR, et al. Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1994;55:169-73.

【非特許文献 11】Daver A, Dalifard I, Pons-Anicet D, et al. Diagnosis value of SCC-TA-4 determination in 4 localizations of epidermoid cancers. An experience of the FNCLCC subgroup of ratio-nalaysis. *Bull Cancer* 1990;77:781-92.

30

【非特許文献 12】Bolger BS, Dabbas M, Lopes A, Monaghan JM. Prognostic value of preoperative squamous cell carcinoma antigen level in patients surgically treated cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997;65:309-13.

【非特許文献 13】Ito M, Shichijo S, Tsuda N, Ochi M, Harashima N, Saito N, Itoh K. Molecular Basis of T Cell-mediated Recognition of Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* 2001;61:2038-46.

【非特許文献 14】Shichijo S, Nako M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:277-88.

40

【非特許文献 15】Yang D, Nako M, Shichijo S, et al. Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitope capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:4056-63.

【非特許文献 16】Noguchi M, Kobayashi K, Suetsugu N, et al. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate* 2003;57:80-92.

【非特許文献 17】Sato Y, Shomura H, Maeda Y, et al. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cell

50

ular response to peptide. Cancer Sci 2003;94: 802-8.

【非特許文献18】 Mine T, Gouhara R, Hida N, et al. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. Cancer Sci 2003;94: 548-56.

【非特許文献19】 Tsuda N, Mochizuki K, Harada M, et al. Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. J Immunother 2004;27:60-72.

【非特許文献20】 Mine T, Sato Y, Noguchi M, et al. Humoral responses to peptides correlated with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. Clin Cancer Res 2004;10:929-37.

【0005】

上記文献を含む本願明細書に記載の文献の内容は、引用により本願明細書の一部を構成する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、日本人の約6割が発現するHLA-A24分子に提示され、SCC細胞を傷害しうるCTLを誘導可能なSCCA由来ペプチド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】

【0007】

本発明は、SCCA由来ペプチドであって、HLA-A24分子に結合でき、かつ細胞性免疫に認識されるペプチドを提供する。具体的には、本発明は、配列番号5または7に示すアミノ酸配列からなるペプチドまたはその誘導体を提供する。また本発明は、本発明のペプチドまたは誘導体をコードする核酸分子、該核酸分子を含むベクターを提供する。

【0008】

本発明はまた、本発明のペプチド、誘導体、またはベクターを含む扁平上皮癌を処置または予防するための医薬組成物、特に癌ワクチンである該医薬組成物、を提供する。

【0009】

本発明はまた、本発明のペプチド、誘導体、またはベクターを被験者に投与することを含む扁平上皮癌を処置または予防するための方法、特に該ペプチド、誘導体、またはベクターを癌ワクチンとして投与する該方法、を提供する。

【0010】

本発明はまた、扁平上皮癌を処置または予防するための医薬の製造における本発明のペプチド、誘導体またはベクターの使用、特に医薬が癌ワクチンである該使用、を提供する。

【0011】

さらに、本発明は、HLA-A24分子陽性扁平上皮癌患者より採取された末梢血単核細胞を本発明のペプチドまたは誘導体と接触させることを含む、扁平上皮癌反応性細胞傷害性T細胞を誘導する方法を提供する。

【0012】

また、本発明は、HLA-A24分子陽性扁平上皮癌患者に由来する抗原提示能を有する細胞に、本発明のペプチドまたは誘導体を取り込ませること、または本発明のベクターを導入することを含む、扁平上皮癌抗原由来ペプチドまたはその誘導体とHLA-A24分子との複合体を細胞表面に提示する抗原提示細胞を調製する方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、HLA-A24陽性癌患者においてSCCA発現癌細胞を傷害しうるCTLを誘導することができるSCCA由来ペプチドが提供された。本発明は、HLA-A24陽性SCC患者に対する特異的免疫療法を可能とする。SCCは上皮性癌の大部分を占めることから、本発明は多数の

10

20

30

40

50

癌患者の治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、各種SCCおよび非SCC細胞株におけるSCCA mRNA発現を示す。AがSCC細胞株、Bが非SCC細胞株の結果である。縦軸およびグラフ上部の値は、YES-1のSCCA mRNA発現量を1とした場合の相対的発現量を示す。

【図2】図2は、抗SCCA抗体による免疫組織化学染色の結果を示す。写真は、食道SCC(A-C)、肺SCC(D-F)、および胃腺癌(G-I)の代表的結果である。A、D、およびGがヘマトキシリン・エオジン染色であり、C、F、およびIがウサギIgによる対照染色である。矢印は正常気管支上皮を示す。点線で囲まれた部分が、SCCA発現部位である。倍率は、Aが200倍、他の8枚が100倍である。SCC組織は大部分がSCCAを発現していたが、非SCC組織ではSCCA発現はわずかであった。

【図3】図3は、癌患者血漿由来のIgGのペプチド特異性を示す。アスタリスクは、両側スチューデントt検定で $P < 0.05$ を意味する。対応ペプチドによる吸収試験により、ペプチド反応性IgGのペプチド特異性が確認された。

【図4A】図4Aは、2種類の食道SCC細胞株(YES-1およびYES-2)におけるHLA-A24分子の発現を示す。点線は、一次抗体を使用しなかった場合の結果を示す。YES-1はHLA-A24分子陰性であり、YES-2はHLA-A24分子陽性であった。

【図4B】図4Bは、SCCAペプチド反応性CTLの細胞傷害活性を示す。以下の細胞を標的細胞として使用し、標準的6時間 $^{51}\text{Cr}$ 放出試験を行った：YES-1(HLA-A24分子陰性、SCCA陽性)、YES-2(HLA-A24分子陽性、SCCA陽性)、およびPHA刺激T芽球化細胞(HLA-A24分子陽性、SCCA陰性)。癌患者4人(Pts. 2、5、7、および8)の代表的結果を示す。アスタリスクは、両側スチューデントt検定で $P < 0.05$ を意味する。SCCAペプチド刺激により誘導されたCTLは、YES-2に対して、YES-1およびPHA刺激T芽球化細胞に対してよりも高レベルの細胞傷害活性を示した。

【図5A】図5Aは、SCCAペプチド反応性CTLの、HLAクラスI拘束性およびCD8陽性T細胞依存性の細胞傷害活性を示す。標的細胞として、YES-2(HLA-A24分子陽性、SCCA陽性)を使用した。アスタリスクは、両側スチューデントt検定で $P < 0.05$ を意味する。SCCAペプチド刺激により誘導されたCTLの細胞傷害活性は、抗HLAクラスI抗体および抗CD8抗体によって有意に抑制された。

【図5B】図5Bは、SCCAペプチド反応性CTLの細胞傷害活性のペプチド特異性を示す。アスタリスクは、両側スチューデントt検定で $P < 0.05$ を意味する。SCCAペプチド反応性CTLの細胞傷害活性は、対応ペプチドをパルスしたCIR-A24細胞により阻害された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明において「SCCA由来ペプチド」または「SCCAペプチド」とは、SCCAのアミノ酸配列の一部からなるペプチド断片を意味する。SCCAのアミノ酸配列は、Genebankアクセシオン番号U19556にて開示されている。

【0016】

「HLA-A24分子に結合できる」とは、ペプチドがHLA-A24分子と複合体を形成し細胞表面に提示されうることを意味する。一般にHLA分子に結合するペプチドは、HLAの型に依存する規則性あるアミノ酸配列を有する。その規則性あるアミノ酸配列は、結合モチーフと呼ばれる。HLA-A24分子に対する結合モチーフとは、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシンまたはフェニルアラニンであり、C末端アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである配列をいう。HLA-A24分子結合モチーフを有するペプチドのHLA-A24分子に対する結合は、Bioinformatics and Molecular Analysis Section(NIH, Bethesda, MD)等のコンピューター解析により決定することができる(Parker KC, et al., J. Immunol., 152: 163-175, 1994)。

【0017】

ペプチドが「細胞性免疫に認識される」とは、そのペプチドが特異的なCTLに認識され

10

20

30

40

50

る、言い換えればペプチド特異的CTLを誘導する能力を有することを意味する。ペプチドがCTLに認識されるか否かは、例えばCTLがそのペプチドをパルスした抗原提示細胞に反応してサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）を産生するか否かをELISA法等により測定して判断することができる。また、誘導されたCTLの細胞傷害活性は、 $^{51}\text{Cr}$ 放出試験等により確認することができる。CTLによる認識性を考慮すると、本発明のペプチドのアミノ酸残基数は8～14個の範囲内であることが好ましく、より好ましくは8～11個、特に好ましくは9または10個である。

#### 【0018】

ペプチドが「液性免疫に認識される」とは、そのペプチドに特異的なIgGが生体内に存在すること、つまりはペプチド特異的IgGが血漿から検出されることを意味する。細胞性免疫と液性免疫の両方に認識されるペプチドは、免疫原性が高くCTL誘導能に優れると期待されるため、本発明のペプチドとして好ましい。血漿中の特異的IgGは、常套的なELISA法等によって測定することができる。

10

#### 【0019】

本発明のペプチドとして特に好ましいのは、配列番号5または7に示すアミノ酸配列からなるペプチドである。

#### 【0020】

本発明において、SCCA由来ペプチドの誘導体とは、SCCA由来ペプチドのアミノ酸配列において1または2個のアミノ酸の置換、欠失および/または付加が導入されたアミノ酸配列からなり、かつHLA-A24分子に結合でき、細胞性免疫に認識されうるペプチドを意味する。誘導体が所望の性質を有するか否かは、前述の方法により調べることができる。

20

#### 【0021】

アミノ酸の置換は、ペプチドの性質を変化させない観点から、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等）の間で行うことが好ましい。アミノ酸の欠失および付加は、誘導体のアミノ酸残基数が8～11個となるように行うことが好ましい。

#### 【0022】

また、アミノ酸の置換、欠失および/または付加は、HLA分子結合モチーフ上許容されるものが好ましい。すなわち、アミノ酸の置換、欠失および/または付加は、誘導体のアミノ酸配列のN末端から第2番目のアミノ酸がチロシンまたはフェニルアラニンであり、C末端アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンとなるように行うことが好ましい。

30

#### 【0023】

本発明に特に好適な誘導体は、配列番号5のアミノ酸配列のN末端から第2番目のアミノ酸をフェニルアラニンで置換し、および/またはC末端アミノ酸をイソロイシンまたはフェニルアラニンで置換したアミノ酸配列からなる誘導体、および配列番号7のアミノ酸配列のN末端から第2番目のアミノ酸をフェニルアラニンで置換し、および/またはC末端アミノ酸をイソロイシンまたはフェニルアラニンで置換したアミノ酸配列からなる誘導体である。

#### 【0024】

SCCA由来ペプチドおよびその誘導体を構成するアミノ酸は、天然のアミノ酸またはアミノ酸アナログであってよく、アミノ酸アナログとしては、アミノ酸のN-アシル化物、O-アシル化物、エステル化物、酸アミド化物、アルキル化物等が挙げられる。SCCA由来ペプチドおよびその誘導体は、機能を著しく損なわない限りにおいてその構成アミノ酸またはカルボキシル基などが修飾されていてもよい。修飾は、N末端や遊離のアミノ基にホルミル基、アセチル基、t-ブトキシカルボニル基等を結合するものや、C末端や遊離のカルボキシル基にメチル基、エチル基、t-ブチル基、ベンジル基等を結合するものが挙げられる。

40

#### 【0025】

本発明のペプチドおよび誘導体は、通常の方法により製造することができる。そのような方法として、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

50

The Proteins, Vol2, Academic Press Inc., New York, 1976 ; ペプチド合成、丸善 (株)、1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株)、1985 ; 医薬品の開発続 第十四巻・ペプチド合成、広川書店、1991) などに記載されている方法が挙げられる。

【0026】

本発明のペプチドおよび誘導体は、本発明のペプチドまたは誘導体のアミノ酸配列を含む長いペプチドが細胞内で断片化されることで生じる場合もある。本発明は、そのような態様で本発明のペプチドまたは誘導体を利用することも包含する。本発明のペプチドまたは誘導体を提供できる限り、本発明のペプチドまたは誘導体のアミノ酸配列を含むペプチドのアミノ酸残基数およびアミノ酸配列は任意である。

【0027】

本発明のペプチドおよび誘導体は、HLA-A24分子陽性SCCA発現癌細胞を傷害するCTLを効率的に誘導し増殖させることができ、SCCAを発現する各種癌の治療に有用である。SCCAは、SCC患者における腫瘍マーカーとして知られている (非特許文献4)。さらに本発明者らは、実施例において大部分のSCCがSCCAを発現することを示している。それゆえ本発明のペプチドおよび誘導体は、SCCの治療に特に有用である。SCCとしては、例えば食道癌、子宮頸癌、および肺SCC等が挙げられる。

【0028】

本発明は、本発明のペプチドまたは誘導体を含む、SCCを処置または予防するための医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、1種類のペプチドまたは誘導体を含むものであってもよく、2種類以上のペプチドおよび/または誘導体を組み合わせて含んでも良い。癌患者のCTLは相異なる癌抗原ペプチドを認識する細胞の集合なので、複数種類のペプチドおよび/または誘導体を組み合わせて使用するとさらに効果的である。本発明のペプチド以外の癌抗原ペプチドと組み合わせても良い。

【0029】

本発明の医薬組成物は、ペプチドまたは誘導体に加えて、医薬上許容される担体などを含むことができる。担体としては、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が使用できる。本発明の医薬組成物は、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤などであってもよい。また、免疫応答が効果的に成立するように、従来からワクチン投与に用いられることが知られているアジュバントとともに投与することもできる。投与方法は、例えば皮内投与または皮下投与などである。

【0030】

本発明の医薬組成物は、癌ワクチンとして使用可能である。投与量は、疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常医薬組成物中のペプチドまたは誘導体の量は、0.0001mg ~ 1000mg、好ましくは0.001mg ~ 100mg、より好ましくは0.01mg ~ 10mg、より一層好ましくは0.1 ~ 5mgまたは0.5 ~ 3mgである。これを数日、数週または数ヶ月に1回、1 ~ 3年間継続して投与することが好ましい。

【0031】

本発明は、本発明のペプチドまたは誘導体をコードする核酸分子および前記核酸分子を含むベクターを提供する。本発明の核酸分子を含むベクターは、抗原提示細胞に導入されると本発明のペプチドまたは誘導体を発現し、それらをHLA分子との複合体として細胞表面に提示させる。この抗原提示細胞は、ペプチド特異的にSCCA発現癌細胞を傷害するCTLを効率的に増殖させることができる。

【0032】

本発明の核酸分子を組み込むベクターとしては、各種プラスミドおよびウィルスベクター、例えばアデノウィルス、アデノ関連ウィルス、レトロウィルス、ワクシニアウィルス等が挙げられる (Liu M, Acres B, Balloul JM, Bizouarne N, Paul S, Slos P, Squiban P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A 101 Suppl, 14567-71, 2004)。ベクターの調製方法は当業界にて周知である (Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory)。

10

20

30

40

50

## 【0033】

本発明のベクターは、患者体内の抗原提示細胞においてSCCA由来ペプチドまたはその誘導体を発現させるため患者に投与することができる。あるいは、患者体外において例えば患者由来の樹状細胞に本発明のベクターを導入し、SCCA由来ペプチドまたは誘導体を発現させた細胞を患者に戻しても良い。これら方法は当業界において周知である（Hrouda D, Dalgleish AG. Gene therapy for prostate cancer. Gene Ther 3: 845-52, 1996）。

## 【0034】

本発明のベクターを患者に投与する場合、投与量は疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により変化するが、例えばDNA量として、0.1  $\mu$ g ~ 100mg、好ましくは1  $\mu$ g ~ 50mgである。投与方法には、静脈注射、皮下投与、皮内投与等が挙げられる。

10

## 【0035】

本発明のCTL誘導方法は、HLA-A24分子陽性SCCA発現癌細胞を傷害するCTLを誘導するものである。CTLについて「SCC反応性」とは、SCC細胞上の癌抗原ペプチドとHLA分子との複合体を認識し、その細胞を傷害する能力を有することを意味する。CTLの誘導は、例えば、HLA-A24陽性SCC患者から採取された末梢血単核細胞（PBMC）を、*in vitro*で本発明のペプチドまたは誘導体の存在下培養することにより行う。本発明のCTL誘導方法は、PBMCを採取した患者の体内に誘導したCTLを戻して癌細胞を傷害する養子免疫療法に有用である。

## 【0036】

本発明のCTL誘導キットは、前記CTL誘導方法を実施するために用いられる。本発明のキットは、本発明のペプチドおよび/または誘導体を1または2種類以上含み、さらに適当な緩衝液や培地などを含む場合もある。

20

## 【0037】

本発明の抗原提示細胞調製方法は、HLA-A24分子陽性SCCA発現癌細胞を傷害するCTLを誘導しうる抗原提示細胞を調製するものである。本発明の抗原提示細胞調製方法は、例えば、HLA-A24陽性SCC患者由来の抗原提示能を有する細胞を本発明のペプチドまたは誘導体とともに培養し、そのペプチドまたは誘導体をHLA分子に結合および提示させることにより行う。あるいはそのようなペプチドを発現可能なベクターを、HLA-A24陽性SCC患者由来の抗原提示能を有する細胞に導入し発現させてもよい。抗原提示能を有する細胞は、例えば樹状細胞である。患者由来の樹状細胞は、例えば、患者より採取したPBMCから培養プレート接着細胞を分離し、その細胞をIL-4およびGM-CSFの存在下で約1週間培養することで得られる。本発明の方法により調製された抗原提示細胞は、その細胞表面に提示するペプチドまたは誘導体とHLA-A24分子との複合体を特異的に認識するCTLを誘導することができ、SCC患者に投与された場合患者体内でSCC反応性CTLの誘導を促進することができる。

30

## 【0038】

本発明の抗原提示細胞調製キットは、前記抗原提示細胞調製方法を行うために用いられる。本発明のキットは、本発明のペプチドおよび/または誘導体を1または2種類以上含み、さらに適当な緩衝液や培地などを含む場合もある。

## 【0039】

上記記載から明らかなように、本発明はさらに、本発明のペプチド、誘導体、またはベクターを患者に投与することを含む、SCCを処置または予防する方法を提供する。また本発明は、SCCを処置または予防するための医薬を製造するための本発明のペプチド、誘導体、またはベクターの使用を提供する。

40

## 【0040】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はいかなる意味においてもこれら実施例により制限されるものではない。

## 【実施例】

## 【0041】

## 1. 方法

## 1.1 患者および細胞株

50

久留米大学病院において、食道癌、子宮頸癌、肺癌、胃癌、大腸癌、および乳癌の患者、並びに健常人(HD)より、PBMCおよび血漿を採取した。被験者はすべてヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染していなかった。血漿およびPBMCは、使用するまでそれぞれ-80 および-196 で低温保存した。PBMC上のHLAクラスI抗原の発現は、フローサイトメトリー解析により調べた。一次抗体として抗HLA-A24モノクローナル抗体(mAb)(One Lambda, Inc.)、二次抗体としてFITC結合抗マウスIgG mAb(Cappel)を使用した。「YES-1」および「YES-2」は、山口大学外科部門において常法に従い確立した食道SCC細胞株である。本実施例で使用した他の癌細胞株は、図1A(SCC)および図1B(腺癌および肺小細胞癌)に示す。

#### 【0042】

##### 1.2 定量的PCR

ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いたリアルタイムPCRにより、SCCA mRNA発現量を調べた(Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996;6:986-94)。RNAは、RNA-Bee RNA Isolation Reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)を用いて、製造元の説明に従い抽出した。mRNA由来のcDNAは、5 $\mu$ gのトータルRNAより、SuperScript Preamplification System (Invitrogen)を用いて製造元の説明に従い調製した。cDNA試料のリアルタイムPCRは、1X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems)およびプライマーとプローブとの混合物(1.25 $\mu$ l)を含む、全量12.5 $\mu$ l中で行った。本実施例で使用したプライマーおよびTaqManプローブは、Applied Biosystemsより購入した(Assay ID#: Hs00199468\_m1)。PCRは、50 2分間、95 10分間、そして95 15秒間の変性と60 1分間のアニーリング伸長を40サイクル、として行った。SCCA mRNAの発現量は、 $\beta$ -アクチン mRNAの発現量により標準化した。

#### 【0043】

##### 1.3 免疫組織化学

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で0.02 U/ml Vibrio Cholerae由来 2-3,6,8-ニューラミニダーゼ(CALBIOCHEM EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA, USA)と室温で1時間インキュベートして抗原性を回復した。続いてその切片を3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有PBSで処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。免疫組織化学的試験は、1:100希釈のウサギポリクローナル抗SCCA1/2抗体(H-390: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)およびHISTONE, SAB-PO(登録商標)キット(Nichirei Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用して行った。ペルオキシダーゼ反応は3,3-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリドにより可視化し、核はヘマトキシリンで対比染色した。

#### 【0044】

##### 1.4 ペプチド

SCCA由来ペプチドは、BioSynthesis (Lewisville, TX, USA)から購入した。HLA-A24結合モチーフを有するHIVペプチド(RYLRQQLLGI: 配列番号10)を陰性対照として使用した。ペプチドは全て、ジメチルスルホキシドに10 mg/mlの用量で溶解した。

#### 【0045】

##### 1.5 抗ペプチド抗体の測定

抗ペプチド抗体(IgG)のレベルは、既報のようにLuminex(商標)システムにより測定した(Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, Itoh K. New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. Scand J Clin Lab Invest 2004;64:1-11)。説明すると、血漿をプレートシェーカーでペプチド結合カラーコードビーズ(25 $\mu$ l)とともに室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、その混合物を真空吸引機器を用いて洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ヒトIgG(鎖特異的)(BA-3080, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)(100 $\mu$ l)と室温で1時間インキュベートした。そのプレートを洗浄し、続いてストレプトアビジン-PE(S-866, Molecular Probes, Eugene, Oregon

10

20

30

40

50

、USA) (100  $\mu$ l) をウェルに添加し、プレートシェーカーにおいて室温で30分間インキュベートした。ビーズを3回洗浄し、続いてTween-PBS (100  $\mu$ l) を各ウェルに添加した。50  $\mu$ l の試料をLuminex (商標) システムにより測定した。SCCAペプチドに対するIgGの特異性を確認するため、血漿試料を対応SCCAペプチドまたは無関係なSCCAペプチドをコートしたプレートで37  $^{\circ}$ Cにて培養した。この吸収操作を3回繰り返し、得られた上清中の対応SCCAペプチド特異的IgGのレベルをLuminex (商標) システムにより測定した。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 1 . 6 ペプチド反応性CTLの誘導

HLA-A24陽性癌患者およびHD由来のPBMCをCTL誘導試験に使用した。ペプチド反応性CTLを誘導するため、既報のように、96ウェルマイクロカルチャープレート(Nunc)の4ウェルにおいて、PBMC( $1.5 \times 10^5$  細胞/ウェル)を各ペプチド (10  $\mu$ g/ml) とともにインターロイキン (IL) -2含有培養培地 (200  $\mu$ l) 中でインキュベートした(非特許文献18)。3または4日毎に、培養培地の半分を除去し、対応ペプチド(20  $\mu$ g/ml)およびIL-2 (100 U/ml) を含有する新しい培地と置き換えた。14日目に各ウェルより細胞を回収し、洗浄した。その細胞を4ウェルに分け、対応ペプチドまたは陰性対照であるHIVペプチドをパルスしたC1R-A24細胞に反応してインターフェロン (IFN) を産生する能力について、二つ組 (duplicate) にて調べた。C1R-A24は、HLA-A2402を発現するC1Rリンパ腫の亜細胞株である (Dr. M. Takiguchi, Kumamoto University, Japan)。18時間インキュベートした後上清を回収し、IFN- $\gamma$  のレベルをELISAにて測定した。

#### 【 0 0 4 7 】

##### 1 . 7 細胞傷害性試験

標準的6時間 $^{51}\text{Cr}$ 放出試験を行うのに十分な数の細胞を得るため、対応ペプチドに反応してIFN- $\gamma$  を産生するウェル中の培養細胞を回収し、IL-2のみで更に10-14日間培養した。以下の癌細胞株を標的として使用した: YES-1 (HLA-A24分子陰性、SCCA陽性食道扁平上皮癌)、およびYES-2 (HLA-A24分子陽性、SCCA陽性食道扁平上皮癌)。フィトヘマグルチニン(PHA) 刺激芽球化T細胞を陰性対照として使用した。抗体による阻害試験では、試験開始時に20  $\mu$ g/mlの抗HLAクラスI (W6/32, IgG2a) (BioLegend, Camino Santa Fe, San Diego, CA, USA)、抗HLAクラスII mAb (H-DR-1, IgG2a) (熊本大学西村泰治先生より供与)、抗CD4 mAb (Nu-Th/i, IgG1) (久留米大学免疫学講座にて樹立)、または抗CD8 mAb (Nu-Ts/c, IgG2a) (久留米大学免疫学講座にて樹立) を各ウェルに添加した。抗CD14 mAb (JML-H14, IgG2a) (久留米大学免疫学講座にて樹立) を陰性対照として使用した。コールド阻害試験では、対応SCCAペプチドまたはHIVペプチドを事前にパルスした非標識C1R-A24細胞を、コールド標的細胞/ホット標的細胞の比を10/1として各ウェルに添加した。エフェクター細胞 (CTL) /標的細胞の比は10/1とした。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 1 . 8 統計

統計学的解析は、両側スチューデントt検定により行った。

#### 【 0 0 4 9 】

##### 2 . 結果

##### 2 . 1 SCCおよび非SCC細胞株におけるSCCA mRNAの発現

始めに、SCC細胞株におけるSCCA mRNA発現を定量的リアルタイムPCR法により調べた。SCC細胞株であるYES-1のSCCA mRNAの発現を発現レベル1とみなし、SCCA mRNAの発現を相対的に示した。その結果、SCCA mRNAは、調べた食道癌細胞株5種類のうち4種類、肺癌細胞株4種類のうち1種類、および子宮頸癌細胞株4種類のうち3種類において発現していることがわかった (図1A)。

#### 【 0 0 5 0 】

さらに、非SCCにおけるSCCA発現に関する報告はなかったため、SCCAが非SCC細胞株において発現しているか否かについて調べた。2種類の肺小細胞癌細胞株を除き、癌細胞株は全て腺癌であった。SCCA mRNAは、試験した膵臓癌細胞株4種類のうち2種類、肺癌細胞株10種類のうち4種類、胃癌細胞株6種類のうち2種類、および大腸癌細胞株6種類のうち1種類

10

20

30

40

50

において発現していることがわかった(図1B)。肺小細胞癌細胞株はいずれもSCCA mRNAの発現が陽性であったが、4種類の乳腺癌細胞株は全て陰性であった。正常PBMCにおける発現は陰性であった。全体として、SCCA mRNAの発現量のレベルは、非SCC細胞株よりSCC細胞株の方が高かった。

【0051】

## 2.2 SCCおよび非SCC組織におけるSCCAの発現

SCCおよび非SCC組織におけるSCCAの発現を免疫組織化学染色により検討した。その結果、食道SCC組織3種類全て、子宮頸癌5種類のうち4種類、および肺SCC組織5種類のうち4種類がSCCA陽性であった。SCCA発現は、肺腺癌組織5種類および肺小細胞癌組織3種類ではいずれも検出されなかった。胃癌組織6種類のうち1種類はSCCA陽性であったが、大腸癌組織は6種類全てが陰性であった。全体結果を表1に示し、代表的結果を図2に示す。

10

【表1】

表1 各種癌組織におけるSCCA発現

癌	組織学	陽性/全体
食道癌	SCC	3/3 (100%)
子宮頸癌	SCC	4/5 (80%)
肺癌	SCC	4/5 (80%)
肺癌	腺癌	0/5 (0%)
肺癌	小細胞癌	0/3 (0%)
胃癌	腺癌	1/6 (17%)
大腸癌	腺癌	0/6 (0%)

20

【0052】

SCCA発現は、食道SCC(図2B)および肺SCC(図2E)、並びに正常気管支上皮(図中矢印)の一部で観察された。胃腺癌では、SCCA発現はわずかに観察されるのみであった(図2H)。

30

【0053】

これらの結果は、SCCAは大部分のSCC組織で発現しているが、非SCC組織ではあまり発現していないことを示す。

【0054】

## 2.3 癌患者およびHD血漿中のSCCAペプチド特異的IgG

HLA-A24分子に対する結合モチーフに基づき、9種類のSCCA由来ペプチドを調製した(表2)。以下SCCAペプチドは、アミノ酸配列の開始位置により表す。

40

【表 2】

表 2 SCCA由来ペプチド

位置	配列	配列番号	結合スコア <sup>a</sup>
10-19	KFMFDLFQQF	1	512
84-92	QFQKLLTEF	2	19.8
98-107	AYELKIANKL	3	554
107-116	LFGEKTYLFL	4	24
112-120	TYLFLQEYL	5	360
118-126	EYLDAIKKF	6	198
215-224	QYTSFH FASL	7	240
286-295	RFKVEESYDL	8	40
362-370	EFHCNHPFL	9	20

<sup>a</sup> ペプチド結合スコアは、ウェブサイト<sup>1</sup>で得たHLAクラスI分子からの予測解離半減期に基づき計算した (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, Computational Bioscience and Engineering Laboratory, Division of Computer & Technology, NIH)。

10

## 【 0 0 5 5 】

これら9種類のSCCA由来ペプチドを、癌患者のIgGに認識される能力に基づき選別した。ペプチド反応性IgGは、マルチプレックスフローサイトメトリーアッセイ(Luminex (商標))により測定した。血漿は、子宮頸部SCC患者35人、乳癌患者10人、膵臓癌患者10人、胃腺癌10人、大腸腺癌患者6人、およびHD10人より採取した。蛍光強度のレベルは、1/100希釈血漿の蛍光強度が100を上回った場合に有意と判断した。結果を表3に示す。

20

【表 3 - 1】

表 3 - 1 SCCA由来ペプチドに対する液性免疫応答

患者	血清	ペプチド								
		SCCA 10	SCCA 84	SCCA 98	SCCA 107	SCCA 112	SCCA 118	SCCA 215	SCCA 286	SCCA 362
		蛍光強度								
子宮頸癌	#1	25	20	11	20	3301	0	37	75	0
	#2	21	2	0	106	66	0	15	0	0
	#3	11	0	0	51	575	0	25	21	0
	#4	5	29	0	109	3138	0	68	229	0
	#5	14	15	0	55	76	0	28	58	3
	#6	786	922	1226	925	428	507	738	889	611
	#7	14	12	26	15	14	11	34	15	11
	#8	38	28	26	30	40	24	55	30	49
	#9	76	67	58	84	94	82	105	93	90
	#10	16	15	14	14	19	13	26	14	15
	#11	21	23	33	25	19	20	105	23	28
	#12	41	35	33	41	42	37	68	44	37
	#13	22	23	397	33	26	20	60	29	25
	#14	22	20	26	22	20	16	42	19	17
	#15	154	116	136	134	82	87	152	129	106
	#16	225	182	145	193	206	179	198	147	191
	#17	50	56	72	65	53	45	87	63	56
	#18	45	49	71	62	34	42	99	48	50
	#19	67	62	92	70	46	41	84	62	48
	#20	107	106	85	90	107	100	102	102	104
	#21	22	19	28	26	22	20	45	21	22
	#22	19	20	28	19	24	20	50	25	27
	#23	78	57	82	75	46	44	106	60	56
	#24	2277	1819	2650	1457	1008	1169	1822	1779	1234
#25	19	17	17	16	19	15	56	18	21	
#26	88	128	166	147	72	106	132	97	83	
#27	33	28	33	39	38	28	121	29	36	
#28	228	139	139	196	96	71	239	139	153	
#29	15	14	21	19	19	13	40	16	20	
#30	44	33	50	41	30	25	48	34	35	
#31	107	108	107	108	123	101	147	104	133	
#32	21	18	18	19	19	16	72	19	23	
#33	92	141	191	170	82	114	165	118	93	
#34	17	15	17	16	19	16	27	16	16	
#35	17	18	21	20	21	19	31	21	21	
乳癌	#36	66	95	44	211	26	5	281	292	10
	#37	0	0	18	242	0	23	47	54	24
	#38	27	31	12	146	0	1	142	95	8
	#39	38	34	20	149	0	1	102	117	11
	#40	0	5	10	146	567	0	30	32	7
	#41	201	182	214	269	113	123	236	321	215
	#42	0	11	12	219	62	14	76	47	19
	#43	44	26	12	136	5924	7	81	58	10
	#44	18	20	0	146	0	0	131	155	0
	#45	55	39	18	272	0	18	123	80	20

10

20

30

【表3 - 2】

表3 - 2 SCCA由来ペプチドに対する液性免疫応答 (続き)

血清		ペプチド									
		SCCA 10	SCCA 84	SCCA 98	SCCA 107	SCCA 112	SCCA 118	SCCA 215	SCCA 286	SCCA 362	
		蛍光強度									
患者											
腫瘍癌	#46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	#47	12	3	6	115	0	0	27	37	1	
	#48	206	344	369	431	137	404	468	946	339	
	#49	0	0	0	30	0	0	174	97	0	
	#50	311	0	0	29	280	0	10	0	0	
	#51	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	#52	172	108	100	286	185	79	198	275	104	
	#53	0	0	0	43	1150	0	50	41	0	
	#54	11	13	0	126	0	0	36	48	6	
	#55	0	0	0	0	0	0	6	24	0	
	胃癌	#56	38	18	2	38	11506	0	152	243	0
		#57	11	7	0	114	0	0	8	9	0
		#58	0	0	0	133	0	0	9	27	6
		#59	177	118	16	237	2549	21	1453	258	10
		#60	4	0	1	24	1371	0	17	79	0
		#61	81	102	8	282	0	5	47	286	1
		#62	0	0	0	37	195	0	0	0	0
		#63	0	0	0	29	0	0	0	7	0
		#64	9	7	0	67	0	2	44	40	0
		#65	0	0	0	72	1312	0	10	37	0
	大腸癌	#66	5	0	0	40	257	2	16	4	0
#67		79	47	0	49	0	0	74	35	0	
#68		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
#69		2	0	0	20	317	0	41	8	0	
#70		17	0	0	91	105	0	59	16	1	
#71		6	8	26	70	0	17	23	45	19	
合計		12/71	14/71	12/71	27/71	23/71	7/71	24/71	19/71	10/71	
健康人	#1	0	0	0	53	607	0	0	21	0	
#2	68	79	35	297	52	47	164	219	37		
#3	0	0	0	67	0	0	14	9	0		
#4	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
#5	8	0	0	331	387	0	87	239	0		
#6	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
#7	0	0	0	0	990	0	0	0	0		
#8	345	332	361	454	496	324	427	516	283		
#9	34	33	39	246	1396	37	41	100	29		
#10	0	0	0	106	0	0	134	138	0		
合計		1/10	1/10	1/10	5/10	5/10	2/10	3/10	4/10	1/10	

対応ペプチドに反応するIgGは、1:100希釈血清の蛍光強度が100を上回った場合に有意と判断した。有意な値に下線を付した。

## 【0056】

SCCA107、SCCA112、SCCA215、およびSCCA286ペプチドに反応するIgGは、他の5ペプチドに反応するIgGよりも頻りに患者血漿中に検出された。その頻度はそれぞれ、27/71、23/71、24/71、および19/71であった。HD10人の血漿も同様の結果を示した。SCCA107、SCCA112、SCCA215およびSCCA286ペプチドそれぞれに反応するIgGの特異性は、吸収試験により確認した(図3)。4種類のSCCAペプチドそれぞれに反応するIgGは、対応SCCAペプチドをコートしたウェルで血漿試料を培養することにより吸収されたが、無関係なSCCAペプチドをコートしたウェルでは吸収されなかった。

## 【0057】

これらの知見に基づき、以下の実施例ではSCCA107、SCCA112、SCCA215およびSCCA286ペプチドに焦点を絞った。

## 【0058】

## 2.4 癌患者由来ペプチド反応性CTLの誘導

SCCA107、SCCA112、SCCA215およびSCCA286ペプチドが、HLA-A24陽性癌患者20人およびHLA-A24陽性健康人8人のPBMCからペプチド反応性CTLを誘導しうるかについて検討した。癌患者20人の内訳は、食道SCC患者4人、子宮頸部SCC患者4人、肺癌患者4人(腺癌2人、小細胞癌1人、SCC1人)、胃腺癌患者4人、および大腸腺癌患者4人であった。試験は、四つ組(quadruplicate)にて行った。1つのウェルの培養細胞を4つのウェルに分け、2つはSCCA

ペプチドをパルスしたC1R-A24細胞に、他の2つはHIVペプチドをパルスしたC1R-A24細胞に使用した。ペプチド反応性CTLの誘導は、少なくとも1つのウェルの上清が50 pg/mlを上回るIFN- $\gamma$ 産生を示し、統計学的有意差 (P値<0.05) を伴った場合に陽性と判断した。最良の応答を示した結果を示し、HIVペプチドに応答したバックグラウンドのIFN- $\gamma$ 産生を差し引いた。結果を表4に示す。

【表4】

患者#	癌	ペプチド				IFN- $\gamma$ 産生 (pg/ml)	EBV
		SCCA107	SCCA112	SCCA215	SCCA286		
1	食道癌	-	-	-	-	748	
2	食道癌	84	106	85	-	491	
3	食道癌	-	-	-	-	879	
4	食道癌	-	-	-	97	-	
5	子宮頸癌	-	678	117	-	-	
6	子宮頸癌	105	-	96	-	-	
7	子宮頸癌	-	-	210	169	-	
8	子宮頸癌	-	61	541	-	67	
9	肺小細胞癌	-	321	-	-	-	
10	肺腺癌	-	837	362	-	-	
11	肺SCC	-	75	83	-	-	
12	肺腺癌	-	319	-	-	62	
13	胃癌	500	148	-	-	-	
14	胃癌	-	-	129	-	109	
15	胃癌	-	958	340	-	291	
16	胃癌	-	-	-	-	61	
17	大腸癌	-	-	-	-	-	
18	大腸癌	-	171	121	-	-	
19	大腸癌	-	115	371	-	-	
20	大腸癌	-	430	118	-	70	
合計		3/20	12/20	12/20	3/20	9/20	
健康人#							
1		-	-	-	-	-	
2		-	-	-	-	-	
3		-	-	-	-	-	
4		-	-	-	-	635	
5		-	1239	-	-	51	
6		-	-	-	-	-	
7		259	-	-	-	-	
8		-	-	-	-	73	
合計		1/8	1/8	0/8	0/8	3/8	

値はIFN- $\gamma$ 産生量の平均である。HIVペプチドに応答したIFN- $\gamma$ 産生量をバックグラウンドとして差し引いた。有意な値 (両側スチューデントt検定でP<0.05) を示す。

【0059】

SCCA112またはSCCA215ペプチドは、いずれも癌患者20人のうち12人のPBMCからペプチド反応性CTLを誘導した。SCCA107およびSCCA286ペプチドは、いずれも癌患者20人のうち3人においてペプチド反応性CTLを誘導した。一方これら4種類のSCCAペプチドは、健康人8人のPBMCからペプチド反応性CTLを誘導する効率は低かった。

【0060】

これらの結果は、SCCA112ペプチドおよびSCCA215ペプチドがHLA-A24陽性のSCC患者および非SCC患者において効率的にペプチド反応性CTLを誘導できることを示す。

【0061】

10

20

30

40

50

## 2.5 SCCAペプチド特異的CD8陽性T細胞依存性の細胞傷害活性

SCCA112ペプチドまたはSCCA215ペプチドで誘導したSCC患者由来CTLが、癌細胞に対して細胞傷害活性を示しうるかについて検討した。図4Aに示すように、YES-1およびYES-2はいずれもSCCであるが、YES-2のみがHLA-A24分子陽性である。それゆえ、YES-2をSCCAおよびHLA-A24分子の両方を発現する陽性標的細胞として使用した。

### 【0062】

4人のSCC癌患者(Pts. 2、5、7および8)に由来するSCCAペプチド刺激PBMCは、YES-2に対して、YES-1およびHLA-A24分子陽性PHA刺激T芽球化細胞に対してよりも高レベルの細胞傷害活性を示した(図4B)。陰性対照として使用したHIVペプチド刺激PBMCは、細胞傷害活性を示さなかった(データ非提示)。

10

### 【0063】

次に、細胞傷害活性に関与する細胞について調べた。SCCAペプチドで刺激されたPBMCのYES-2に対する細胞傷害活性は、抗HLAクラスIまたは抗CD8mAbの添加により有意に阻害されたが、他のmAbの添加によっては阻害されなかった(図5A)。コールド阻害試験において、SCCAペプチド刺激PBMCの細胞傷害活性は、対応SCCAペプチドをパルスした非標識C1R-A24細胞の添加により阻害されたが、HIVペプチドをパルスした非標識C1R-A24細胞の添加によっては阻害されなかった(図5B)。

### 【0064】

なお、SCC患者と同様に、SCCA112ペプチドまたはSCCA215ペプチドで刺激した腺癌患者(Pts. 10、15および20)由来のPBMCは、YES-2細胞に対してHLAクラスI拘束性に細胞傷害活性を示した(データ非提示)。

20

### 【0065】

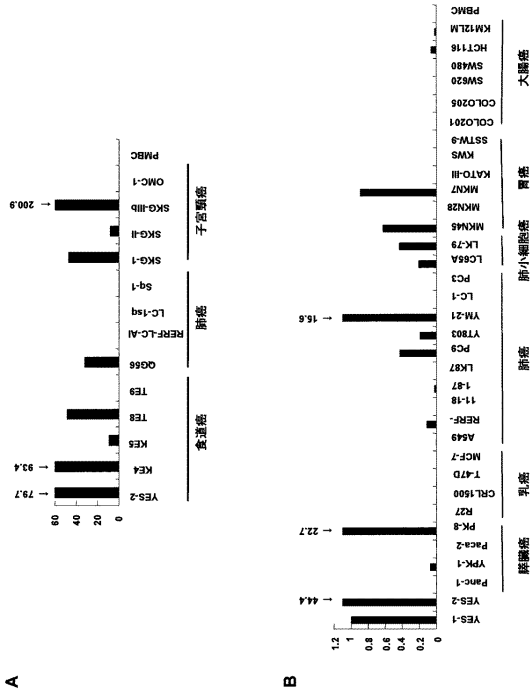
これらの結果は、SCCAペプチド刺激PBMCのYES-2に対する細胞傷害活性が、主にHLAクラスI拘束性SCCAペプチド特異的CD8陽性T細胞によることを示す。

### 【0066】

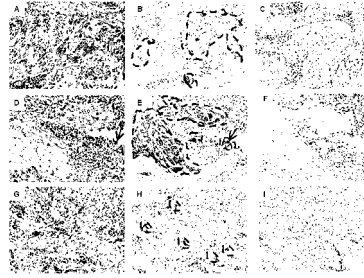
## 3.まとめ

以上の結果より、SCCA由来ペプチド、特にSCCA112ペプチドおよびSCCA215ペプチドが、HLA-A24陽性SCC患者においてSCC反応性CTLを効率的に誘導できることが明らかとなった。

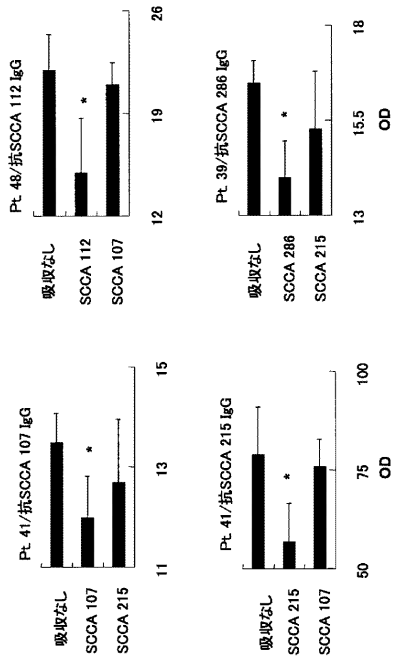
【 図 1 】



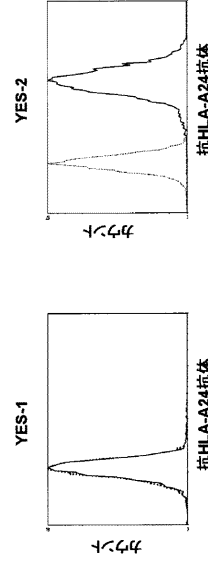
【 図 2 】



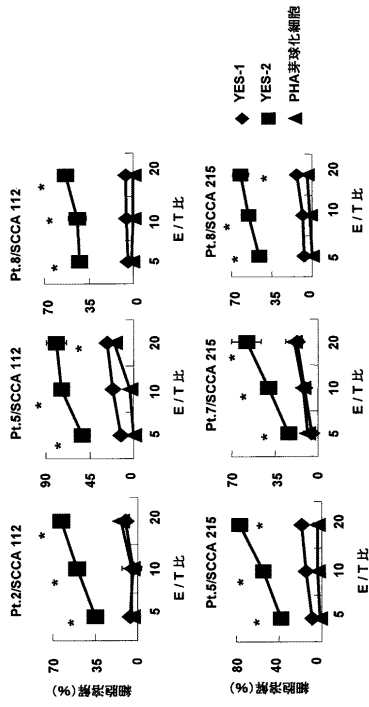
【 図 3 】



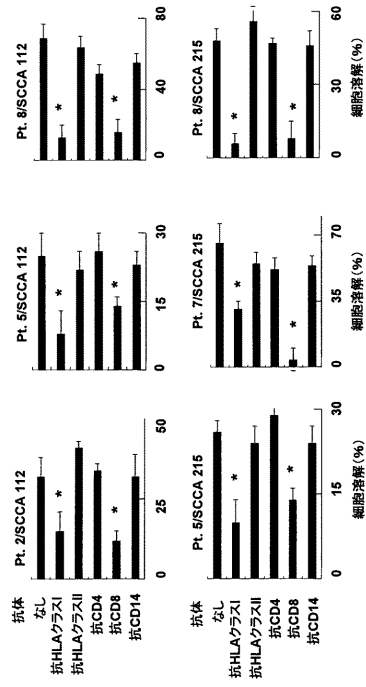
【 図 4 A 】



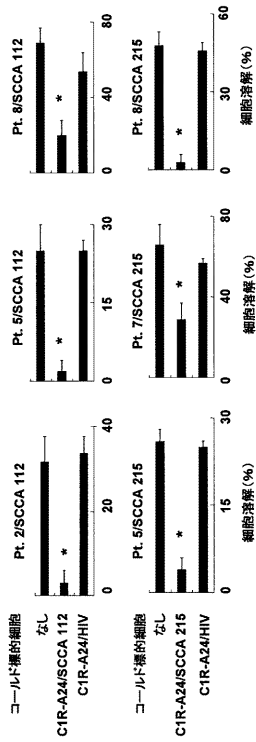
【 図 4 B 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



**【配列表】**

0004803460000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	

(72)発明者 原田 守  
福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学医学部内

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 Anticancer research. 2003, Vol.23, No.6a, p.4377-4381  
Anticancer research. 2002, Vol.22, No.6c, p.4255-4264  
伊東恭悟 他, 7. 癌抗原ペプチドワクチン 遺伝子同定から臨床研究へ, 日外会誌, 2000  
. 09. 01, 第101巻, 第9号, p. 612 - 617  
Clinical cancer research. 1999, Vol.5, No.8, p.2236-2241  
田中文明 他, 樹状細胞を用いた癌特異免疫治療, 現代医療, 2004. 07. 10, Vol.  
36, No. 7, p. 191 - 195

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 1/00-19/00

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq