

(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
2016年6月16日(16.06.2016)



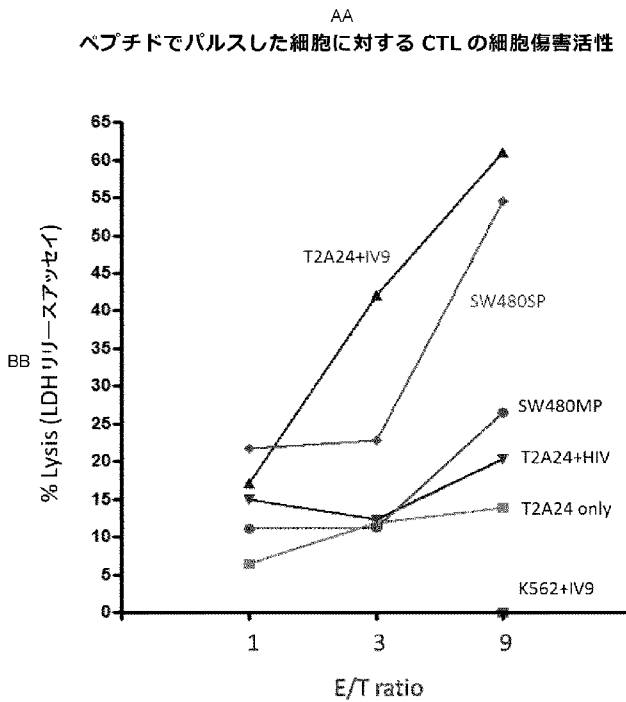
(10) 国際公開番号
WO 2016/093243 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/084428
- (22) 国際出願日: 2015年12月8日(08.12.2015)
- (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 2014-249169 2014年12月9日(09.12.2014) JP
- (71) 出願人: 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAP-
PORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0608556
北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番
地85 Hokkaido (JP). 大日本住友製薬株式会社
(SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町2
丁目6番8号 Osaka (JP).

- (72) 発明者: 佐藤 昇志(SATO, Noriyuki); 〒0608556 北
海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公
立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 鳥越
俊彦(TORIGOE, Toshihiko); 〒0608556 北海道札幌
市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法
人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 廣橋 良彦
(HIROHASHI, Yoshihiko); 〒0608556 北海道札幌市
中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人
札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 金関 貴幸
(KANASEKI, Takayuki); 〒0608556 北海道札幌市
中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人
札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 宮本 昇
(MIYAMOTO, Sho); 〒0608556 北海道札幌市中央
区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌
医科大学内 Hokkaido (JP). コーチン ビタリー
(KOCHIN, Vitaly); 〒0608556 北海道札幌市中央
区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医
科大学内 Hokkaido (JP). 後藤 正志(GOTO, Mas-
ashi); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3
丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社内
Osaka (JP).

[続葉有]

- (54) Title: TUMOR ANTIGEN PEPTIDE
(54) 発明の名称: 腫瘍抗原ペプチド



AA Cytotoxic activity of CTL with respect to peptide-pulsed cells
 BB % Lysis (LDH release assay)

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a detection agent for specifically detecting a cancer stem cell; a tumor antigen peptide specifically presented by cancer stem cells; a medicinal composition useful in preventing and/or treating cancer, said medicinal composition comprising the aforementioned tumor antigen peptide as an active ingredient; a method for screening the tumor antigen peptide; etc. To achieve the abovementioned purpose, provided are: peptides represented by Y₀-X₀-Z₀; a polyepitope peptide consisting of a plurality of epitope peptides connected together, said polyepitope peptide containing at least one of the abovementioned peptides as one of the epitope peptides; a polynucleotide encoding the aforementioned peptides and/or polyepitope peptide; a medicinal composition comprising the same as an active ingredient; a prophylactic and/or therapeutic agent for cancer characterized by inducing CTL; etc.

(57) 要約: 本発明は、がん幹細胞を特異的に検出するための検出剤、がん幹細胞特異的に提示される腫瘍抗原ペプチド、これを有効成分として含有するがんの予防および/または治療に有用な医薬組成物、およびかかる腫瘍抗原ペプチドをスクリーニングする方法等を提供することを目的とする。Y₀-X₀-Z₀で表されるペプチド、前記ペプチドの少なくとも一つをエピトープペプチドの一つとして含む、複数のエピトープペプチドを連結したポリエピトープペプチド、前記ペプチドもしくはポリエピトープペプチドの少なくともひとつをコードするポリヌクレオチド、およびこれらを有効成分として含有する医薬組成物、CTLを誘導することを特徴とする、がんの予防および

／または治療剤等を提供することにより、上記課題が解決された。

WO 2016/093243 A1



- (74) 代理人：葛和 清司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 4 番 1 号 西新宿三井ビルディング 17 階 葛和国际特許事務所 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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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))

明 細 書

発明の名称：腫瘍抗原ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、がん幹細胞に特異的に発現する遺伝子を利用したがん幹細胞を検出するための検出剤、およびがんの予防および／または治療剤として有用な、該遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドおよびそれらの利用に関する。さらに本発明は、かかる腫瘍抗原ペプチドをスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] これまでに開発された抗がん剤の治療効果は十分ではなく、がんを完治できる確率は極めて低い。その原因として、がん組織の根幹をなす細胞を、従来の治療剤が選択的にターゲティングできていないことが挙げられる。近年になって、かかる「がん組織の根幹をなす細胞」として、がん幹細胞の存在が報告されている。がん幹細胞は、がんの発生、再発および転移に関わる原因細胞と考えられており、したがってがん幹細胞をターゲティングすることができれば、がんの増殖、再発および転移を効果的に抑制できる可能性が高いと期待される。すなわち、がん幹細胞の検出技術とがん幹細胞を標的とする新規治療剤の開発は、がん医療にとって重要な課題となっている。

[0003] 一方、生体による腫瘍細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（CTL）が重要な働きをしている。例えば腫瘍細胞の排除の場合、CTLは、腫瘍細胞上の抗原ペプチド（腫瘍抗原ペプチド）と主要組織適合遺伝子複合体（MHC：Major Histocompatibility Complex）クラスⅠ抗原（ヒトの場合はHLAクラスⅠ抗原と称する）との複合体を認識し、腫瘍細胞を攻撃・破壊する。つまり腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアーゼにより細胞内で分解されることによって生成される。そして生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスⅠ抗原（HLAクラスⅠ抗原）と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される

。この抗原提示に係る複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆるがん免疫療法剤（がんワクチン）として利用することにより、がん患者の体内のがん特異的CTLを増強させる治療法が開発されつつある。

中でも特に、がん幹細胞を免疫的に排除することが可能な新しいがんワクチンの開発が望まれている（例えば特許文献1）。

[0004] ASB4 (Ankyrin repeat and SOCS box-containing 4) はもともと刷り込み遺伝子スクリーニングの過程で同定された遺伝子の1つであるが、近年ではリプログラミングに関わる遺伝子としても同定されており、ヒトの正常組織では特定の分化段階の精巢を除いて発現はみられないことが知られている。ASB4と癌に関連する事象としてはこれまでに、肝癌細胞において発現していることや、ASB4遺伝子の発現と腫瘍の浸潤性が正に相関することなどが報告されている（例えば非特許文献1～4）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2010/050268号パンフレット

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Mizuno Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Feb 8; 290(5):1499-505.

非特許文献2：Yang CS, et al. Cell Rep. 2014 Jul 24;8(2):327-37.

非特許文献3：Kim SK, et al. Mol Cells. 2008 Apr 30;25(2):317-21.

非特許文献4：Au V, et al. Biosci Trends. 2014 Apr;8(2):101-10.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、がん幹細胞を特異的に検出するための検出剤、がん幹細胞特異的に提示される腫瘍抗原ペプチド、これを有効成分として含有するが

んの予防および／または治療に有用な医薬組成物、およびかかる腫瘍抗原ペプチドをスクリーニングする方法等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 腫瘍細胞、とくにがん幹細胞に特異的に抗原提示されるペプチドを探索する中で、がん幹細胞に特異的に発現するタンパク質の配列中にHLAと結合すると予測されるエピトープ領域が複数存在したとしても、当該タンパク質のどの部分が実際に生体内でHLAと結合して細胞表面に抗原提示され得るか同定することは容易ではない。そこで、本発明者らはかかる課題を解決するため、実際にかん幹細胞に抗原提示されているペプチド（ナチュラルペプチド）を直接同定する方法を開発し、いくつかのナチュラルペプチドを同定した。そしてかかるペプチドのうち、がん幹細胞のみに特異的に抗原提示されているペプチドがASB4タンパク質由来のペプチドであることを見出し、さらに鋭意研究を続け、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明に下記に掲げるものに関する：

[1] $Y_0-X_0-Z_0$

で表される、がん幹細胞特異的な抗原ペプチドであって、

X_0 が、以下の(1)～(4)：

(1) ASB4タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチド；

(2) (1)の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド；

(3) ASB4タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のア

ミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチド；または

(4) (3) の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチド；

のいずれかであり、

Y₀およびZ₀が、互いに独立して0個から数個のアミノ酸からなるペプチドである、前記抗原ペプチド。

[0010] [2] X₀が、以下の(1')～(4')：

(1') A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチド；

(2') (1') の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド；

(3') A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチド；または

(4') (3') の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシ

ンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチド；

のいずれかであり、

Y₀およびZ₀が、互いに独立して

0個もしくは1個のアミノ酸であるか；または

0～3個のアミノ酸からなるペプチドであって、ここでY₀-X₀-Z₀が全体で9～14アミノ酸長であるASB4タンパク質の部分ペプチドもしくはそのX₀ホモログとなる；

であることを特徴とする、[1]の抗原ペプチド。

[0011] [3] X₀が、配列番号3～7、9～19、21～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]または[2]の抗原ペプチド。

[4] X₀が、配列番号3～7、9～19、21～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなり、Y₀およびZ₀が存在しない、[1]または[2]の抗原ペプチド。

[5] X₀が、配列番号3～7、9～11、13～19、21～23および26～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、N末端から第2番目のアミノ酸がメチオニン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、バリンもしくはイソロイシンに置換されているアミノ酸配列からなり、Y₀およびZ₀が存在しない、[1]または[2]抗原のペプチド。

[0012] [6] X₀が、配列番号3、5～7、9～14、16、19、21～26、28、30～32、34～37および39～46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、N末端から第2番目のアミノ酸がメチオニンもしくはチロシンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列からなり、Y₀およびZ₀が存在しない、[1]または[2]の抗原ペプチド。

[7] X₀が、[4]～[6]のX₀であり、Y₀またはZ₀のいずれか一方が1個のアミノ酸であり、もう一方が存在しない、[1]または[2]の抗原ペプチド。

[8] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4、6、7、10、14、15、17~19、21~23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]~[3]の抗原ペプチド。

[9] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号9、21、25、30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]~[3]の抗原ペプチド。

[10] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4~12および15~23のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]~[3]の抗原ペプチド。

[11] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号3~9、13、14、25、26および28~30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]~[3]の抗原ペプチド。

[12] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4~9のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、[1]~[3]の抗原ペプチド。

[13] 複数のエピトープペプチドが連結されたポリエピトープペプチドであって、該エピトープペプチドとして、[1]~[12]の抗原ペプチドを少なくとも1つ含む、前記ポリエピトープペプチド。

[0013] [14] ASB4遺伝子の発現産物を検出するためのASB4検出剤を含む、がん幹細胞検出剤。

[15] 心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および血液からなる群から選択される1または2以上の生体試料に由来する細胞を含む細胞集団においてがん幹細胞を検出するための、[14]のがん幹細胞検出剤。

[16] ASB4遺伝子の発現産物が、mRNAおよび/または内在性ポリペプチドである、[14]または[15]のがん幹細胞検出剤。

[17] ASB4遺伝子の発現産物がmRNAであり、RT-PCR法により検出することを含む、[14]~[16]のがん幹細胞検出剤。

[18] ASB4 遺伝子の発現産物が内在性ポリペプチドであり、該内在性ポリペプチドと特異的に反応する ASB4 検出剤により検出することを含む、[14] ~ [16] のがん幹細胞検出剤。

[19] ASB4 検出剤が、抗体である、[18] のがん幹細胞検出剤。

[20] ASB4 検出剤が、ASB4 遺伝子の発現産物である mRNA を検出するための前記遺伝子に相補的な塩基配列を有するプローブおよび／またはプライマーである、[14] ~ [17] のがん幹細胞検出剤。

[0014] [21] [14] ~ [20] のがん幹細胞検出剤を使用して、検査対象においてがん幹細胞を検出する方法。

[22] (i) がん治療薬の候補化合物を、対象に投与する前に、該対象における ASB4 遺伝子の発現産物の検出量 A を測定する工程、

(ii) 前記候補化合物を前記対象細胞集団に投与した後に、該対象における ASB4 遺伝子の発現産物の検出量 B を測定する工程、および

(iii) 前記検出量 A と B とを比較し、該検出量 A が B より有意に大きい場合に、前記候補化合物を、がん幹細胞を標的とすることを特徴とするがん治療薬候補であると判定する工程、

を含む、がん治療薬のスクリーニング方法。

[23] [1] ~ [12] の抗原ペプチドまたは [13] のポリエピトープペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチド。

[24] [23] のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[25] [24] の発現ベクターを含む、遺伝子導入用組成物。

[0015] [26] 以下の (a) ~ (d) :

(a) [1] ~ [12] の抗原ペプチドまたは [13] のポリエピトープペプチド、

(b) [23] のポリヌクレオチド、

(c) [24] の発現ベクター、

(d) ASB4 タンパク質、ASB4 タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

のいずれかを有効成分として含む、医薬組成物。

[27] [1] ~ [12] の抗原ペプチド、および/または、[13] のポリエピトープペプチドを有効成分として含む、[22] の医薬組成物。

[28] アジュバントをさらに含む、[26] または [27] の医薬組成物。

[29] がんの予防および/または治療剤である、[26] ~ [28] の医薬組成物。

[30] がんの予防および/または治療用ワクチンである、[26] ~ [29] の医薬組成物。

[0016] [31] 以下の (a) ~ (d) :

(a) [1] ~ [12] の抗原ペプチドまたは [13] のポリエピトープペプチド、

(b) [23] のポリヌクレオチド、

(c) [24] の発現ベクター、

(d) ASB4 タンパク質、ASB4 タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

のいずれかを有効成分として含有する、細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。

[32] (A) [1] ~ [12] の抗原ペプチドまたは [13] のポリエピトープペプチド、あるいは、

(B) 前記 (A) のペプチドおよび/またはポリエピトープペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドと、抗原提示能を有する細胞とを、in vitro で接触させることを含む、抗原提示細胞の製造方法。

[0017] [33] (A) [1] ~ [12] の抗原ペプチドまたは [13] のポリエピトープペプチド、あるいは、

(B) 前記 (A) のペプチドおよび/またはポリエピトープペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチド

と、末梢血リンパ球とを、in vitro で接触させることを含む、細胞障害性 T 細胞の誘導方法。

[34] [1] ~ [12] の抗原ペプチドとHLAとを含む、HLAマルチマー。

[35] [34] のHLAマルチマーを含む、診断薬。

[36] [1] ~ [12] の抗原ペプチドを認識する抗体。

[37] [1] ~ [12] の抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識する、T細胞受容体様抗体。

[0018] [38] [36] の抗体および／または [37] のT細胞受容体様抗体を含有する腫瘍検出剤。

[39] [1] ~ [12] の抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識する、キメラ抗原受容体。

[40] [1] ~ [12] の抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識するT細胞受容体を含む、人工CTL。

[41] [26] ~ [30] の医薬組成物を用いたがんの処置方法が有効な治療対象患者を選択するための診断薬であって、[14] ~ [20] のがん幹細胞検出剤、[34] のHLAマルチマー、[36] の抗体および／または [37] のT細胞受容体様抗体を含む、前記診断薬。

[42] 配列番号3~30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、がん幹細胞特異的な抗原ペプチド。

発明の効果

[0019] 本発明により、がん幹細胞を特異的に攻撃するCTLの誘導剤として有用な腫瘍抗原ペプチド、およびこれを有効成分として含有するがんの予防および／または治療に有用な医薬組成物等が提供される。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1は、ヘキスト33342/P1染色したヒト大腸がん細胞株(SW480)のベラパミル(Verapamil)有無によるフローサイトメトリーの結果を示す。

[図2-1]図2-1は、SW480-SPクローン細胞株およびSW480-MPクローン細胞株からそれぞれ単離した1細胞を培養し、ヘキスト3334

2/P1染色したフローサイトメトリーの結果を示す。

[図2-2]図2-2は、SW480-SPクローン細胞株およびSW480-MPクローン細胞株それぞれの共焦点顕微鏡画像を示す。

[図3]図3は、SW480-SPクローン細胞株およびSW480-MPクローン細胞株それぞれをマウスに移植し、形成された腫瘍を評価した結果を示す。

[図4]図4は、SW480-SPクローン細胞株およびSW480-MPクローン細胞株それぞれのライセートから、抗HLA-A24抗体を用いてHLAとペプチドとの複合体を免疫沈降し、それから単離したペプチドを、マスマスペクトロメトリーを用いて配列解析した結果を示す。

[図5]図5は、SW480-SPおよびSW480-MPそれぞれのmRNAを抽出しRT-PCRによる遺伝子発現の検討を行った際の電気泳動の写真を示す。SW480-SPクローン細胞株に特異的な遺伝子としてASB4遺伝子が確認された。

[図6]図6は、ASB4のヒト成人正常組織由来mRNAを用いてRT-PCRを行った結果を示す。

[図7]図7は、ASB4の種々のがん細胞株由来mRNAを用いてRT-PCRを行った結果を示す。

[図8]図8は、ASB4ペプチド(IV9;配列番号3)のHLA-A24に対する結合能を示す。IV9およびHIV(配列番号51)、GK12(配列番号52)等各種合成ペプチドをT2-A24細胞にパルスし、フローサイトメトリーを用いHLA-A24発現量を評価した。

[図9]図9は、IFN- γ をコートしたELISPOTプレートを用いた種々のペプチドによりパルスしたT2-A24細胞のELISPOTアッセイの結果を示す。

[図10]図10は、PBMCから誘導したエフェクター細胞(CTL)の、種々のペプチドをパルスしたT2-A24細胞およびパルスしていないSW480-SP細胞に対する細胞傷害活性を評価した結果を示す。エフェクター

細胞は、配列番号3で示されるASB4ペプチドIV9で誘導したものをを用いた。ネガティブコントロールとしてMHCクラスI発現を欠くK562細胞を用いた。

[図11]図11は、配列番号4で表されるペプチド(As80_9)の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸は一定の播種細胞数あたりのスポット数を表す。AはHLA-A*02:01遺伝子導入マウス、BはHLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した試験の結果をそれぞれ示す。また、黒棒(「w/peptide」)および白棒(「w/o」)は、それぞれ、ペプチド投与マウス由来の脾細胞を投与ペプチドの存在下および非存在下で再刺激培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差は、各ペプチドの投与によってマウス生体内で誘導されたペプチド特異的CTLの数を示す。

[図12]図12は、配列番号5で表されるペプチド(As82_10)の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図13]図13は、配列番号6で表されるペプチド(As124_10)の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図14]図14は、配列番号7で表されるペプチド(As125_9)の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図15]図15は、配列番号8で表されるペプチド(As184_12)の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図16]図16は、配列番号9で表されるペプチド (As135_10) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図17]図17は、配列番号10で表されるペプチド (As83_10) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図18]図18は、配列番号11で表されるペプチド (As87_9) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図19]図19は、配列番号12で表されるペプチド (As307_10) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図20]図20は、配列番号13で表されるペプチド (As301_11) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図21]図21は、配列番号14で表されるペプチド (As405_9) の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、A、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図22]図22は、配列番号3で表されるペプチドIV9の、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、B、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

。

[図23]図23は、配列番号15で表されるペプチド (As35_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図24]図24は、配列番号16で表されるペプチド (As92_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図25]図25は、配列番号17で表されるペプチド (As152_9) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図26]図26は、配列番号18で表されるペプチド (As186_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図27]図27は、配列番号19で表されるペプチド (As236_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図28]図28は、配列番号20で表されるペプチド (As265_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図29]図29は、配列番号21で表されるペプチド (As280_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図30]図30は、配列番号22で表されるペプチド (As383_10_5L) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図31]図31は、配列番号23で表されるペプチド (As416_10) の、HLA-A*02:01遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図32]図32は、配列番号24で表されるペプチド (As76_10) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図33]図33は、配列番号25で表されるペプチド (As192_10) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図34]図34は、配列番号26で表されるペプチド (As211_10) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図35]図35は、配列番号27で表されるペプチド (As289_10) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図36]図36は、配列番号28で表されるペプチド (As318_10) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図37]図37は、配列番号29で表されるペプチド (As365_12) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図38]図38は、配列番号30で表されるペプチド (As365_9) の、HLA-A*24:02遺伝子導入マウスを利用した、インターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図11と同じものを示す。

[図39]図39は、配列番号4で表されるペプチド (As80_9) の、HLA-A*02:01陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸は播種細胞数 (約 1×10^5 個) あたりのスポット数を表す。黒棒 (「w/ peptide」) および白棒 (「w/o」) は、それぞれ、ペプチドの存在下および非存在下で刺激培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差は、各ペプチドの添加によって誘導されたペプチド特異的CTLの数を示す。

[図40]図40は、配列番号5で表されるペプチド (As82_10) の、HLA-A*02:01陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

[図41]図41は、配列番号6で表されるペプチド (As124_10) の、HLA-A*02:01陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

[図42]図42は、配列番号8で表されるペプチド (As184_12) の、HLA-A*02:01陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

[図43]図43は、配列番号9で表されるペプチド (As135_10) の、HLA-A-

A*02:01陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

[図44]図44は、配列番号5で表されるペプチド(As82_10)の、HLA-A*24:02陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

[図45]図45は、配列番号8で表されるペプチド(As184_12)の、HLA-A*24:02陽性の健常人由来の末梢血単核細胞を用いたインターフェロン γ ELISPOTアッセイによるin vivoでのCTL誘導能力の評価結果を示す。縦軸、黒棒および白棒は、それぞれ、図39と同じものを示す。

発明を実施するための形態

[0021] 以下本発明について詳細に説明する。

本発明において「エピトープペプチド」とは、MHC（ヒトにおいてはHLA）と結合して、細胞表面に抗原提示され、かつ抗原性を有する（T細胞に認識され得る）ペプチドを意味する。エピトープペプチドには、MHCクラスIと結合して抗原提示され、CD8陽性T細胞に認識されるエピトープペプチドであるCTLエピトープペプチド、およびMHCクラスIIと結合して抗原提示され、CD4陽性T細胞に認識されるエピトープペプチドであるヘルパーエピトープペプチドが含まれる。

[0022] エピトープペプチドのうち、腫瘍細胞において特異的にあるいは過剰に発現しているタンパク質由来のペプチドを、特に腫瘍抗原ペプチドという。抗原提示とは、細胞内に存在するペプチドがMHCと結合し、このMHC/抗原ペプチド複合体が細胞表面に局在化する現象をいう。上述のとおり、細胞表面に提示された抗原はT細胞などにより認識された後、細胞性免疫や液性免疫を活性化することが知られており、MHCクラスIに提示された抗原は、細胞性免疫を活性化するとともに、ナイーブT細胞のT細胞受容体に認識され、ナイーブT細胞を、細胞傷害活性を有するCTLへと誘導するため、

免疫療法に用いられる腫瘍抗原ペプチドとしては、MHCクラスIと結合し、抗原提示されるペプチドが好ましい。

[0023] 本発明において、「腫瘍(tumor)」は、良性腫瘍および悪性腫瘍（がん、悪性新生物）を含む。がん(cancer)は、造血器の腫瘍、上皮性の悪性腫瘍（癌、carcinoma）と非上皮性の悪性腫瘍（肉腫、sarcoma）とを含む。本発明において「がん幹細胞」とは、がん組織中に存在する細胞のうち、幹細胞様の性質を示す細胞のことをいい、がんの発生、再発および転移に関わる原因細胞であると考えられている細胞である。一般的に「がん幹細胞」はがん組織中に僅かしか存在しないため、他の細胞と区別することが困難であるが、当該技術分野においてはがん幹細胞を単離／濃縮する方法は知られており、例えばSP分画法などが挙げられる。したがって本発明において「がん幹細胞」は、公知のがん幹細胞単離／濃縮法により単離／濃縮された細胞集団を意味し得る。

[0024] 本発明では、実際に細胞表面に抗原提示されているナチュラルペプチドを単離／同定することができる下記の方法を用いることによって、本発明のナチュラルペプチドを単離／同定した。なお、本発明において、「ナチュラルペプチド」は、実際に細胞表面に抗原提示されているペプチドのことをいう。また「ナチュラル抗原ペプチド」は、ナチュラルペプチドのうち抗原性が確認できたものをいう。このナチュラル抗原ペプチドをがん細胞から単離し、配列およびその由来を決定することにより、CTLを用いたがんの標的治療に有用な知見を得ることが可能である。

[0025] 本発明で用いたナチュラルペプチドの単離／同定方法には、ナチュラルペプチドを提示しているがん幹細胞を溶解し、その溶解物（ライセート）からMHCとナチュラルペプチドとの複合体を単離する工程、単離した複合体をMHC分子とナチュラルペプチドに分離してナチュラルペプチドを単離する工程、単離したナチュラルペプチドを同定する工程が含まれる。

MHCとナチュラルペプチドとの複合体の単離には、MHCに対する特異抗体を用いた免疫沈降法によるペプチド／MHC複合体の抽出法を採用した

。

適切な抗MHC抗体として、抗HLA-A02抗体、抗HLA-A24抗体などの、HLAクラスIに対する抗体を使用した。

[0026] 複合体をMHC分子とナチュラルペプチドとに分離する工程では、弱酸を用いたペプチド単離を行った。

さらに、上記単離ナチュラルペプチドの配列を液体クロマトグラフィーとタンデムマスマスペクトロメトリーとを組み合わせたペプチド配列解析法を用いて解析し、実際に細胞表面に抗原提示されているナチュラルペプチドを同定した。

上記により単離したナチュラルペプチドの抗原性を確認する方法として、細胞傷害性試験、ELISPOTアッセイ、TCR様抗体を用いたアッセイなどを採用した。

[0027] 本発明者らは、上記方法により、ヒトがん幹細胞において抗原提示されているナチュラル抗原ペプチドを解析した。その結果、がん幹細胞において抗原提示されているナチュラル抗原ペプチドとして、ASB4タンパク質に由来するペプチド（配列番号3）が同定された。かかる知見を基にさらに研究を進めた結果、ASB4遺伝子のがん幹細胞において特異的に高発現しており、がん幹細胞に対する分子標的治療の有用な候補遺伝子であることを見出した。ASB4が腫瘍抗原であること、さらにはASB4由来のペプチドが腫瘍細胞表面にHLAクラスI抗原と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示されていることは、これまで全く知られていなかった新たな知見である。

[0028] <1>本発明のペプチド

本発明において、「ヒトASB4タンパク質」は、Mizuno Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 8;290(5):1499-505やYang CS, et al. *Cell Rep.* 2014 Jul 24;8(2):327-37で報告されている公知のタンパク質を意味し、具体的には配列番号2に記載のアミノ酸配列（Genbank Accession No: NP_057200; ASB4 isoform a）で表されるタンパク質、そのアイソフォーム

、およびそのホモログをいう。当該アイソフォームとしては、例えばスプライシングバリエント、個体差に基づくSNP等のバリエント等が挙げられる。具体的には、(1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質、(2) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1または複数、好ましくは1~数個、さらに好ましくは、1~10個、1~5個、1~3個、1もしくは2個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。そのようなバリエントとして、ASB4 isoform aのスプライシングバリエントである、Genbank Accession No.:NP_665879として登録されているアイソフォーム(ASB4 isoform b)や、17番目のアミノ酸がバリン(V)からロイシン(L)に置換されたdbSNP RefSNP No.:rs35047380のSNP等を例示することができる。本明細書において単に「ASB4タンパク質」といった場合は、別段の記載のない限り、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるヒトASB4タンパク質を意味する。

[0029] ヒトASB4タンパク質として、好ましくは配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質、または前記タンパク質において、1~3個、好ましくは1もしくは2個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。さらに好ましくは配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。

本発明のペプチドは、一態様において、ヒトASB4タンパク質の部分ペプチドであって、MHC、特にHLAと結合するペプチド、好ましくはMHC、特にHLAにより抗原提示されるペプチド、さらに好ましくはMHC、特にHLAにより抗原提示されてCTLを誘導可能なペプチドを含む。HLAにはいくつかの型が存在するが、本発明のペプチドは、好ましくはHLAクラスIに結合可能であり、より好ましくはHLA-A02またはHLA-A24に結合可能であり、さらに好ましくはHLA-A02およびHLA-A24の両方に結合可能(すなわちデュアル結合性)である。本発明のペプ

チドは、MHCに結合する前にプロセッシングなどの処理を経てもよく、それらの処理の結果エピトープペプチドを生成するようなペプチドも本発明のペプチドに含まれる。したがって、本発明のペプチドは、エピトープペプチドのアミノ酸配列を含む配列であれば、アミノ酸長は特に限定されない。しかしながら、本発明のペプチドそのものがエピトープペプチドであることが好ましく、したがってアミノ酸長は約8～14アミノ酸程度が好ましく、約8～11アミノ酸程度がより好ましく、約9～約11アミノ酸程度が特に好ましい。

[0030] ヒトのMHCクラスIであるHLAクラスIと結合するエピトープペプチドは、約8～14アミノ酸長、好ましくは約9～11アミノ酸長であり、その配列中に結合するHLA特有の結合モチーフを有することが知られている。例えばHLA-A02と結合するペプチドは、N末端から2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／またはC末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるという結合モチーフを有し、HLA-A24と結合するペプチドは、N末端から2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／またはC末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるという結合モチーフを有する。

[0031] したがって本発明のペプチドは、好ましい一態様において、ASB4タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチドであるエピトープペプチドを含み、より好ましくは該エピトープペプチドそのものである。中でも特に好ましいのは、配列番号4、6、7、10、14、15、17～19、21～23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるエピトープペプチドである。

[0032] また、別の好ましい一態様において、前記部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチドであるエピトープペプチドを含み、より好ましくは該エピトープペプチドそのものである。中でも特に好ましいのは、配列番号4、6、7、10、14、15、17～19、21～23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているエピトープペプチドである。

[0033] 本発明のペプチドは、別の好ましい一態様において、ASB4タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチドであるエピトープペプチドを含み、より好ましくは該エピトープペプチドそのものである。中でも特に好ましいのは、配列番号9、21、25、30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるエピトープペプチドである。

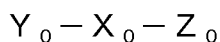
[0034] また、別の好ましい一態様において、前記部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチドであるエピトープペプチドを含み、より好ましくは該エピトープペプチドそのものである。中でも特に好ましいのは、配列番号9、21、25、30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン

、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているエピトープペプチドである。

[0035] 本発明のペプチドは、別の好ましい一態様において、上記の部分ペプチドまたは置換された部分ペプチドにおいて、さらにN末端および／またはC末端に1個から数個のアミノ酸が付加されたペプチドである。

中でも特に好ましいのは、配列番号4、6、7、10、14、15、17～19、21～23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチド、該ペプチドにおいてN末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド、配列番号9、21、25、30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドあるいは該ペプチドにおいてN末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチドにおいて、さらにN末端および／またはC末端に1個から数個のアミノ酸が付加されたペプチドである。

[0036] したがって、本発明のペプチドは一態様において、



と表すことが可能である。ここで、 X_0 、 Y_0 および Z_0 はいずれもペプチドである。

かかる態様において、 X_0 は以下の(1)～(4)：

(1) A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸、好ましくは8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンも

しくはイソロイシンであるペプチド；

(2) (1) の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド；

(3) A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸、好ましくは8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチド；または

(4) (3) の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチド；

から選択されるペプチドである。ここで(2)は(1)の置換ホモログであり、(4)は(3)の置換ホモログであるため、 X_0 が(2)または(4)のペプチドである $Y_0-X_0-Z_0$ を特に、「 X_0 ホモログ」という。

[0037] また、 Y_0 および Z_0 は、互いに独立して、0から数個のアミノ酸からなる任意のペプチドである。ここで、「0から数個のアミノ酸」は、具体的には0～5個のアミノ酸を意味し、例えば0個、1個、2個、3個、4個あるいは5個のアミノ酸が挙げられ、さらに好ましくは、0個、1個、2個もしくは3個のアミノ酸が挙げられ、特に好ましいのは0個もしくは1個である。本発明において、 Y_0 および／または Z_0 が「存在しない」という場合、 Y_0 および／または Z_0 が0個のアミノ酸からなるペプチドである場合を意味する。

ここで Y_0 および／または Z_0 を構成するアミノ酸には特に限定が無く、タンパク質を構成する天然アミノ酸20種類の任意のものが挙げられるが、好ましくは、生体内に存在する酵素によって切断され得るアミノ酸を挙げるこ

とができる。また、A S B 4 タンパク質のアミノ酸配列において前記部分ペプチドのN末端側および／またはC末端側のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列であることが望ましい。

- [0038] したがって、中でもさらに特に好ましいのは、 X_0 が配列番号4、6、7、10、14、15、17～19、21～23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチド、該ペプチドにおいてN末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド、配列番号9、21、25、30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは該ペプチドにおいてN末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチドのいずれかであり、さらに Y_0 および／または Z_0 が1個のアミノ酸である場合であり、さらに好ましくは、 Y_0 または Z_0 のいずれか一方が1個のアミノ酸であり、もう一方が存在しない場合である。
- [0039] また、別の好ましい一態様において、 X_0 が、8～11アミノ酸からなる上記(1)～(4)のいずれかであり、 Y_0 および／または Z_0 が、互いに独立して0～3個のアミノ酸からなるペプチドであり、 $Y_0-X_0-Z_0$ が全体で9～14アミノ酸長であるA S B 4 タンパク質の部分ペプチドをまたはその X_0 ホモログを構成する場合が挙げられる。かかる態様は、これに限定するものではないが、例えば X_0 が配列番号3～7および9～19、21～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、かかる X_0 のN末端側および／またはC末端側に0～3個のアミノ酸からなるペプチド Y_0 および／または Z_0 が付加されているが、かかる $Y_0-X_0-Z_0$ もまたA S B 4 タンパク質の部分ペプチドとなる場合が挙げられる。
- [0040] 本発明のペプチドは、好ましい一態様において、 X_0 が、配列番号3～7、

9～28および30のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドを含む。この態様において、より好ましくは、本発明のペプチド（すなわち $Y_0-X_0-Z_0$ ）がいずれも上記ASB4タンパク質の部分ペプチドとなる。かかるより好ましい態様において、例えば本発明のペプチドは、配列番号3～30のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0041] 配列番号3～30で表されるペプチドはそれぞれ、上記ASB4のアミノ酸の位置が319番目～327番目に対応する9アミノ酸（配列番号3）、80番目～88番目に対応する9アミノ酸（配列番号4）、82～91番目の10アミノ酸（配列番号5）、124～133番目の10アミノ酸（配列番号6）、125～133番目の9アミノ酸（配列番号7）、184～195番目の12アミノ酸（配列番号8）、135～144番目の10アミノ酸（配列番号9）、83～92番目の10アミノ酸（配列番号10）、87～95番目の9アミノ酸（配列番号11）、307～316番目の10アミノ酸（配列番号12）、301～311番目の11アミノ酸（配列番号13）および405～413番目の9アミノ酸（配列番号14）、35～44番目の10アミノ酸（配列番号15）、92～101番目の10アミノ酸（配列番号16）、152～160番目の9アミノ酸（配列番号17）、186～195番目の10アミノ酸（配列番号18）、236～245番目の10アミノ酸（配列番号19）、265～274番目の10アミノ酸（配列番号20）、280～289番目の10アミノ酸（配列番号21）、383～392番目の10アミノ酸（配列番号22）、416～425番目の10アミノ酸（配列番号23）、76～85番目の10アミノ酸（配列番号24）、192～201番目の10アミノ酸（配列番号25）、211～220番目の10アミノ酸（配列番号26）、289～298番目の10アミノ酸（配列番号27）、318～327番目の10アミノ酸（配列番号28）、365～376番目の12アミノ酸（配列番号29）、365～373番目の9アミノ酸（配列番号30）からなるペプチドであり、いずれのペプチドも、H

L A - A 0 2 および / または H L A - A 2 4 と結合可能であることが本発明者らにより見出されたものである。中でも配列番号 3 ~ 2 3、2 5、2 6、および 2 8 ~ 3 0 で表されるペプチドは、さらに C T L 誘導能も有することが本発明者らにより見出された。

[0042] さらに好ましい一態様において、 X_0 が配列番号 4 ~ 7、9 ~ 1 2 および 1 5 ~ 1 9 および 2 1 ~ 2 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドを含む。この態様において、より好ましくは、本発明のペプチド（すなわち $Y_0 - X_0 - Z_0$ ）がいずれも上記 A S B 4 タンパク質の部分ペプチドとなる。かかるより好ましい態様において、例えば本発明のペプチドは、配列番号 4 ~ 1 2 および 1 5 ~ 2 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0043] 配列番号 4 ~ 1 2 および 1 5 ~ 2 3 で表されるいずれのペプチドも、H L A - A 0 2 と結合可能であり、かつ C T L 誘導能を有することが本発明者らにより見出されたものである。

[0044] 別のさらに好ましい一態様において、 X_0 が、配列番号 3 ~ 7、9、1 3、1 4、1 8、2 4 ~ 2 8 および 3 0 のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドを含む。この態様において、より好ましくは、本発明のペプチド（すなわち $Y_0 - X_0 - Z_0$ ）がいずれも上記 A S B 4 タンパク質の部分ペプチドとなる。かかるより好ましい態様において、例えば本発明のペプチドは、配列番号 3 ~ 9、1 3、1 4、2 5、2 6 および 2 8 ~ 3 0 に記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0045] 配列番号 3 ~ 9、1 3、1 4、2 5、2 6 および 2 8 ~ 3 0 で表されるいずれのペプチドも、H L A - A 0 2 4 と結合可能であり、かつ C T L 誘導能を有することが本発明者らにより見出されたものである。

[0046] また、別の好ましい一態様において、 X_0 が、配列番号 4 ~ 7、9 および 1 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドを含む。この態様において、より好ましくは、本発明のペプチド（すなわち

Y₀-X₀-Z₀) がいずれも上記 A S B 4 タンパク質の部分ペプチドとなる。かかるより好ましい態様において、例えば本発明のペプチドは、配列番号 4～9 に記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0047] 配列番号 4～9 で表されるいずれのペプチドも、HLA-A02 および HLA-A24 の両方と結合可能であり、かつ CTL 誘導能を有することが本発明者らにより見出されたものである。中でも特に配列番号 4～6、8 および 9 で表されるペプチドが好ましく、配列番号 5 および 8 で表されるペプチドが最も好ましい。

[0048] 本発明のペプチドは、その N 末端および／または C 末端が修飾されていてもよい。当該修飾として具体的には、N-アルカノイル化（例えば、アセチル化）、N-アルキル化（例えば、メチル化）、C 末端アルキルエステル（例えば、エチルエステル）、および C 末端アミド（例えばカルボキサミド）等が挙げられる。

本発明のペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる既知の方法に準じて行うことができる。かかる既知の方法としては文献（Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966；The Proteins, Vol 2, 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 1 4 巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991、これらの文献は引用により本願の一部を構成する）などに記載されている方法が挙げられる。

[0049] 本発明のペプチドは、後述する CTL 誘導方法や、ヒトモデル動物を用いたアッセイ（WO 02/47474 号公報、Int J. Cancer:100,565-570 (2002)）等に供することにより、in vivo での活性を確認することができる。

[0050] 本発明のペプチドは、別の態様において、HLA-A02 および／または HLA-A24 に結合するペプチドを含む。具体的には、これに限定するものではないが、例えば配列番号 3～30 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。これらのペプチドは、必ずしも HLA-A02 または HLA-A24 の結合モチーフを有するものではないが、本発

明者らにより実際にHLA-A02および／またはHLA-A24に結合することが確認されたペプチドである。中でも配列番号3～23、25、26および28～30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、さらにCTL誘導能も有することが確認されており、好ましい。

[0051] 本発明のペプチドには、さらに、前記本発明のペプチドを少なくとも1つ含む複数のエピトープペプチドを連結したペプチド（ポリエピトープペプチド）も含まれる。したがって、該ポリエピトープペプチドであって、CTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

本発明のポリエピトープペプチドは、具体的には、

(i) 本発明のペプチド（エピトープペプチド）および任意の本発明のペプチド以外の1または2以上のCTLエピトープペプチドを直接、または適宜スペーサーを介して連結したペプチド、

(ii) 本発明のペプチドおよび任意の1または2以上のヘルパーエピトープペプチドを直接、または適宜スペーサーを介して連結したペプチド、若しくは、

(iii) 上記(i)に記載のポリエピトープペプチドに、さらに1または2以上ヘルパーエピトープペプチドを、直接、または適宜スペーサーを介して連結したペプチド

であって、抗原提示細胞内にてプロセッシングを受け、生じたエピトープペプチドが抗原提示細胞に提示され、CTL誘導活性を導くペプチドとして定義され得る。

[0052] ここで、(i)における本発明のペプチド以外のCTLエピトープペプチドとしては特に限定はないが、具体的には、例えば本発明に含まれない他のヒトASB4由来のエピトープペプチドや、ヒトOR7C1、ヒトDNAJB8由来のエピトープペプチド（例えば、国際公開第2010/050190号に記載されたペプチド）、ヒトFAM83B由来のエピトープペプチド（国際出願第PCT/JP2014/076625号）などが挙げられる。

スペーサーとしては、抗原提示細胞内におけるプロセッシングに悪影響を及ぼさないものであれば特に限定されず、好ましくはそれぞれのエピトープペプチドとペプチド結合で連結されるリンカーであり、例えばいくつかのアミノ酸が連結したペプチドリリンカーや、両端にアミノ基およびカルボキシ基を有するリンカーなどが挙げられる。具体的にはグリシンリンカーやPEG（ポリエチレングリコール）リンカーなどが挙げられ、グリシンリンカーとしてはポリグリシン（例えばグリシン6個からなるペプチド；Cancer Sci, vol.103, p150-153）が挙げられ、PEGリンカーとしては、PEGの両端にアミノ基およびカルボキシ基を有する化合物由来のリンカーが挙げられる（例えば、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ ；Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 7551-7556）。

[0053] 本発明のポリエピトープペプチドに含まれる本発明のエピトープペプチドは、1種または2種以上が選択されてよい。すなわち、同一のエピトープペプチドが複数個連結されていてもよいし、複数の異なるエピトープペプチドが連結されたものであってもよい。当然ながら、2種以上のエピトープペプチドが選択される場合であっても、選択されたエピトープペプチドのうちの1種または2種以上が複数個連結されてもよい。本発明のペプチド以外のエピトープペプチドについても、同様に複数種および／または複数個のエピトープペプチドが連結されてよい。本発明のポリエピトープペプチドは、2～12個のエピトープペプチドが連結されたものであってよく、好ましくは2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個のエピトープペプチドが連結されており、最も好ましくは2個のエピトープペプチドが連結されている。

ここで、本発明のペプチドに連結させるエピトープペプチドがヘルパーエピトープペプチドの場合、用いられるヘルパーエピトープペプチドとしては、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが挙げられる。また当該ヘルパーエピトープペプチドの長さとしては、13～30アミノ酸程度、好ましくは13～17アミ

ノ酸程度を挙げることができる。

[0054] このような複数のエピトープペプチドを連結させたペプチド（ポリエピトープペプチド）もまた、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープペプチドを連結させたポリエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。

すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたポリエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献（Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS(1985))に記載の方法などに準じて行うことができる。

[0055] 以上のようにして製造された複数のエピトープペプチドを連結させたポリエピトープペプチドを、前述のin vitroアッセイや、国際公開第02/47474号およびInt J. Cancer:100,565-570 (2002)（これらの文献は引用により本願の一部を構成する）に記載のヒトモデル動物を用いたin vivoアッセイに供すること等によりCTL誘導活性を確認することができる。

本発明のペプチド（ポリエピトープペプチドを含む）は、本明細書に記載のとおり、がんの予防および／または治療などに有用であり、医薬組成物の有効成分とすることができる。また、本発明のペプチドは、がんの予防および／または治療のためのものであってもよい。さらに、本発明は、がんの予防および／または治療のための医薬の製造への本発明のペプチドの使用にも関する。

[0056] <2>本発明のポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、前記本発明のペプチドを少なくとも1つコードするポリヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドは、cDNAやmRNA、cRNA、または合成DNAのいずれであってもよい。また1

本鎖、2本鎖のいずれの形態であってもよい。具体的には、これに限定するものではないが例えば、MHCとペプチドの結合予測プログラムであるBIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)、SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) およびIEDB (MHC-I processing predictions ; <http://www.iedb.org/>) などを用いて予測されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドなどが挙げられ、より具体的には配列番号3～46に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号3～46から選択される任意の2以上のペプチド、または配列番号3～46から選択されるペプチドおよびヘルパーエピトープを連結させたポリエピトープペプチドを、それぞれ発現可能なようにコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドなどが挙げられる。

[0057] 本発明のポリヌクレオチドは、1本鎖および2本鎖のいずれの形態もとることができる。本発明のポリヌクレオチドが2本鎖の場合、前記本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。すなわち本発明のポリヌクレオチドの範疇には、本発明の2本鎖型ポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入して作製された組換え発現ベクターも含まれる。

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のとおり、がんの予防および／または治療などに有用であり、医薬組成物の有効成分とすることができる。また、本発明のポリヌクレオチドは、がんの予防および／または治療のためのものであってもよい。さらに、本発明は、がんの予防および／または治療のための医薬の製造への本発明のポリヌクレオチドの使用にも関する。

[0058] 本発明で用いる発現ベクターは、用いる宿主や目的等に応じて様々なものを用いることができ、当業者であれば適宜選択することができる。本発明で用い得る発現ベクターとしては、例えばプラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラス

ミドベクター、 λ ZAP11、 λ gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pCEP4、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

[0059] 前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していてもよい。また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていてもよい。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパク質ベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pcDNA3.1/Myc-Hisなど）、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター（pET32a）などを用いることができる。

[0060] 前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。したがって、本発明には、前記発現ベクターを含む遺伝子導入用組成物が包含される。

形質転換に用いられる宿主としては、本発明のポリペプチドが有する機能を損なわない限りいかなる細胞を用いてもよく、例えば大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E.coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494（DE3）株などが挙げられる。また酵母としては、Saccharomyces cerevisiaeなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3

細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞、293-EbNA細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いればよい。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社) を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

[0061] 以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたペプチドは、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のペプチドを、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき、当該技術分野において知られた通常の方法を用いて容易に製造することができる。具体的には、通常DNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、前記エピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含する。

[0062] <3>本発明のペプチドを有効成分とするCTL誘導剤/医薬組成物

本発明のペプチドはCTL誘導活性を有し、腫瘍抗原ペプチドとして、C

TL誘導剤となり得る。また上述のとおり、本発明者らによりASB4タンパク質が腫瘍抗原であること、ASB4タンパク質由来のペプチドが腫瘍細胞表面にHLAクラスI抗原と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示されていることが初めて見出された。したがって、ASB4タンパク質そのものもまたCTL誘導剤となり得る。

すなわち、HLA-A02抗原またはHLA-A24抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、*in vitro*で本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を添加して刺激することにより、該ペプチドをパルスしたHLA-A02抗原陽性細胞、またはHLA-A24抗原陽性細胞を特異的に認識するCTLを誘導することができる（*J. Immunol.*, 154, p2257, 1995）。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を、例えばELISA法などによって測定することにより、確認することができる。また⁵¹Crで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（⁵¹Crリリースアッセイ、*Int. J. Cancer*, 58:p317, 1994）によっても確認することができる。

また、*Int. J. Cancer*, 39, 390-396, 1987、*N. Eng. J. Med.*, 333, 1038-1044, 1995等に記載の方法により、CTLクローンを樹立することもできる。

[0063] 本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質によって誘導されたCTLは、本発明のペプチドおよび／または他のASB4タンパク質由来のエピトープペプチドを抗原として提示する細胞に対する傷害作用やリンフォカインの産生能を有する。本発明のペプチドは上述のとおり腫瘍抗原ペプチドであり、またASB4タンパク質は細胞内で分解されて腫瘍抗原ペプチドを生じるため、それら機能を介して抗腫瘍作用、好ましくは抗がん作用を発揮することができる。したがって本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質ならびにそれにより誘導されたCTLは、がんの予防および／または治療のための医薬や医薬組成物の有効成分とすることができる。

本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を有効成分として含有するCTL誘導剤をがん患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A02抗原またはHLA-A24抗原に本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質由来のエピトープペプチドが提示され、HLA-A02抗原またはHLA-A24抗原と提示されたペプチドとの結合複合体特異的CTLが増殖してがん細胞を破壊することができ、その結果、がんを予防および／または治療することができる。したがって、本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤は、好ましくは、HLA-A02抗原またはHLA-A24抗原陽性の対象であって、ASB4陽性のがんに罹患している対象に対して使用することができる。ASB4陽性のがんとしては、例えば大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸部癌、甲状腺癌、精巣腫瘍、卵巣癌等のがん（腫瘍）などが挙げられ、本発明のCTL誘導剤は、これらのがんの予防および／または治療のために使用することができる。

[0064] ここでがんの「予防」には、患者のがんへの罹患の予防だけでなく、手術により原発巣の腫瘍を切除した患者における再発予防、手術、放射線療法もしくは薬物療法等のがん治療により完全に除去できなかった腫瘍の転移防止等が含まれる。また、がんの「治療」には、がんを縮小させるがんの治癒・症状改善のみでなく、がん細胞の増殖、腫瘍の拡大もしくは原発巣からのがん細胞の転移を抑制する進行防止等が含まれる。

[0065] 本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を有効成分とするCTL誘導剤は、例えば配列番号2に記載のASB4陽性のがんに罹患している、HLA-A02またはHLA-A24陽性のがん患者に対して特に有効である。具体的には、例えば、大腸癌、肺癌、卵巣癌等のがん（腫瘍）の予防または治療のために使用することができる。したがって、本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を有効成分として含む医薬組成物もまた、本発明に包含される。かかる医薬組成物は、好ましくはがんの予防および／または治療用の組成物、すなわちがんの予防および／または治療剤であ

る。また、本発明の医薬組成物は、がん細胞（好ましくはがん幹細胞）に特異的なCTLを誘導、すなわちがん細胞特異的な細胞性免疫を活性化することによりがんを予防および／または治療するものであるため、好ましくはがんの予防および／または治療用ワクチンである。

[0066] 本発明のペプチドを有効成分とする医薬組成物は、単一のCTLエピトープ（本発明のペプチド）を有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルパーエピトープ）と連結したポリエピトープペプチドを有効成分とするものであってもよい。近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したポリエピトープペプチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194（本文献は引用により本願の一部を構成する）には、がん抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2、-A3、-A11、-B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのポリエピトープペプチドが、*in vivo*でそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたポリエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなポリエピトープペプチドの形態で投与した場合、ポリエピトープペプチドが抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、がん細胞を破壊する。このようにしてがんの治療または予防が促進される。

[0067] 本発明のペプチドおよび／またはASB4タンパク質を有効成分とする医薬組成物は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントと混合して投与、または併用して投与することができる。

[0068] アジュバントとしては、文献（例えば、Clin Infect Dis.:S266-70, 2000）に記載のものなど、当該技術分野において既知のアジュバントが適用可能で

あり、具体的には、例えば、ゲルタイプとして水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびリン酸カルシウムなど、菌体タイプとしてCpG、モノホスホリルリピドA (monophosphoryl lipid A; MPL)、コレラ毒素、大腸菌易熱性毒素、百日咳毒素およびムラミルジペプチド (Muramyl dipeptide; MDP) など、油乳濁液タイプ (エマルジョン製剤) としてフロイント不完全アジュバント、MF59およびSAFなど、高分子ナノ粒子タイプとして免疫刺激複合体 (Immunostimulatory complex; ISCOMs)、リポソーム、生分解性マイクロスフェア (Biodegradable microsphere) およびサポニン由来のQS-21など、合成タイプとして非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルペプチドアナログ (Muramyl peptide analogue)、ポリホスファゼンおよび合成ポリヌクレオチドなど、サイトカインタイプとしてIFN- γ 、IL-2およびIL-12などを挙げるができる。

また、本発明のペプチドおよび/またはASB4タンパク質を有効成分とするCTL誘導剤/医薬組成物の剤形としては、特に限定はないが、油乳濁液 (エマルジョン製剤)、高分子ナノ粒子、リポソーム製剤、直径数 μm 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、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤などが挙げられる。

[0069] 投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などの既知の任意の投与方法が挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、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0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~1000mg、より好ましくは0.1mg~10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

本発明のペプチドを実際に医薬として作用させる手法としては、当該ペプチドを直接体内に導入するin vivo法の他に、ヒトからある種の細胞を採集し体外で本発明のペプチドを作用させ、その細胞を体内に戻すex vivo法があり (日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36 (1), 23-48 (1994)、実験医学増刊, 12 (15), (1994))

、およびこれらの引用文献等、これらの文献は引用により本願の一部を構成する)、当業者であれば、かかる手法に適切な細胞、投与方法、投与形態および投与量を選択することができる。

[0070] <4>本発明のポリヌクレオチドを有効成分とするCTL誘導剤/医薬組成物

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現させた細胞は、本発明のペプチドおよび/または他のASB4タンパク質由来のエピトープペプチドを抗原として提示する細胞となるため、T細胞受容体を介してT細胞に認識されるという特徴を有する。したがって、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドもまたCTLの誘導剤となり得る。誘導されたCTLは、本発明のペプチドおよび/またはASB4タンパク質によって誘導されたCTLと同様に、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用、好ましくは抗がん作用を発揮することができる。したがって本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、がんの治療または予防のための医薬や医薬組成物の有効成分とすることができる。本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有するCTLの誘導剤は、例えば、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドをがん患者に投与し発現させることで、がんを治療および/または予防し得るものである。

[0071] 例えば発現ベクターに組み込まれた本発明のポリヌクレオチドおよび/またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを以下の方法によりがん患者に投与すると、抗原提示細胞内で腫瘍抗原ペプチドが高発現する。その後、生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA-A02抗原またはHLA-A24抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、がん特異的CTLが体内で効率的に増殖し、がん細胞を破壊する。以上のようにして、がんの治療または予防が達成される。し

たがって、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物もまた、本発明に包含される。かかる医薬組成物は、好ましくはがんの予防および／または治療用の組成物、すなわちがんの予防および／または治療剤である。また、本発明の医薬組成物は、がん細胞（好ましくはがん幹細胞）に特異的なCTLを誘導、すなわちがん細胞特異的な細胞性免疫を活性化することによりがんを予防および／または治療するものであるため、好ましくはがんの予防および／または治療用ワクチンである。

[0072] 本発明のポリヌクレオチドを有効成分とするCTL誘導剤／医薬組成物は、好ましくは、HLA-A02抗原またはHLA-A24抗原陽性の対象であって、ASB4陽性のがんに罹患した対象に対して使用することができる。ASB4陽性のがんとしては、例えば大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸部癌、甲状腺癌、精巣腫瘍、卵巣癌等のがん（腫瘍）などが挙げられ、本発明のCTL誘導剤は、これらのがんの予防または治療のために使用することができる。

本発明のポリヌクレオチドおよび／またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁，月刊薬事，36（1），23-48（1994）、実験医学増刊，12（15），（1994）、およびこれらの引用文献等、これらの文献は引用により本願の一部を構成する）のいずれの方法も適用することができる。したがって、本発明の医薬組成物の一態様において、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが有効成分として含有される。

[0073] ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられ

る。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

[0074] 本発明のポリヌクレオチドおよび／またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを実際に医薬として作用させるには、当該ポリヌクレオチドを直接体内に導入する*in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外で本発明のポリヌクレオチドを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す*ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36（1）、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）、（1994）、およびこれらの引用文献等、これらの文献は引用により本願の一部を構成する）。*in vivo*法がより好ましい。

本発明のポリヌクレオチドおよび／またはASB4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路および投与形態を適宜選択して投与し得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に注射可能な形態で投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとり得るが、一般的には有効成分である本発明のポリヌクレオチドを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、医薬上許容されるキャリアー（担体）を加えてもよい。また、本発明のポリヌクレオチドを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

[0075] 製剤中の本発明のポリヌクレオチドの含量は、治療目的の疾患、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、ポリヌクレオチドの含量として、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～

10mgの本発明のポリヌクレオチドを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

当業者であれば、好適な細胞、ベクター、投与方法、投与形態および投与量を適宜選択することが可能である。

[0076] また近年、複数のCTLエピトープ（腫瘍抗原ペプチド）を連結したポリエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたポリエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925（本文獻は引用により本願の一部を構成する）には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、*in vivo*でそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。したがって、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、CTLの誘導剤の有効成分とすることができる。このようなCTLの誘導剤も、前記と同様の投与方法および投与形態をとることができる。

[0077] <5>本発明の抗原提示細胞

前記した本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、例えば、以下のように入 vitroで利用することができる。すなわち本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドのいずれかと抗原提示能を有する細胞とを*in vitro*で接触させることにより、抗原提示細胞を作製することができる。したがって本発明の一態様において、細胞表面にHLA-A02抗原またはHLA-A24抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞、およびその製造方法を提供するものである。上述のとおり、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドはがんを予防および／または治療するために利用することが可

能である。したがって本態様の抗原提示細胞またはその製造方法は、好ましくはがん患者由来の単離された細胞を利用するものである。具体的には、がん患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞と、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれかを *in vitro* で接触させることにより、当該細胞の細胞表面に H L A - A 0 2 抗原または H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞を製造する。

[0078] ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示することの可能な M H C、好ましくは H L A、より好ましくは H L A - A 0 2 抗原または H L A - A 2 4 抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、これらのうち、プロフェッショナル抗原提示細胞が好ましく、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞がより好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれであってもよい。

本発明の抗原提示細胞は、例えば、がん患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のペプチドを *in vitro* でパルスして、H L A - A 0 2 抗原または H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させることにより得られる (Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158, p1796, 1997、Cancer Res., 59, p1184, 1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、がん患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞を G M - C S F および I L - 4 存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

[0079] また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明のポリヌクレオチドを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該ポリヌクレオチドは、D N A の形態であっても、R N A の形態であってもよい。具体的には、D N A の場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996 や J. Immunol., 161: p5607, 1998

(これらの文献は引用により本願の一部を構成する)などを参考にして行うことができ、またRNAの場合はJ. Exp. Med., 184: p465, 1996 (本文献は引用により本願の一部を構成する)などを参考にして行うことができる。

[0080] 前記抗原提示細胞はCTLの誘導剤の有効成分とすることができる。当該抗原提示細胞を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与などが挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤を患者の体内に戻すことにより、ASB4陽性のがん罹患している患者の体内で、本発明のペプチドを抗原提示するがん細胞に特異的なCTLが効率良く誘導され、結果として本発明のペプチドを抗原提示するASB4陽性のがんを治療することができる。

[0081] <6>本発明の細胞傷害性T細胞(CTL)

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、例えば以下のようにin vitroで利用することができる。すなわち本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドのいずれかと末梢血リンパ球とをin vitroで接触させることにより、CTLを誘導することができる。したがって本発明の一態様において、本発明のペプチドを抗原提示する細胞を特異的に傷害するCTLおよびその誘導方法を提供するものである。上述のとおり、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドはがんを予防および/または治療するために利用することが可能である。したがって本態様のCTLおよびその誘導方法には、好ましくは癌患者由来の末梢血リンパ球を利用するものである。具体的には、がん患者由来の末梢血リンパ球と、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれかをin vitroで接触させることにより、本発明のペプチドを抗原提示する細胞を特異的に傷害するCTLを誘導する。

[0082] 例えばメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。またマウスのメラノーマにおいては、

脾細胞を、*in vitro*で腫瘍抗原ペプチドTRP-2により刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている（*J. Exp. Med.*, 185:453, 1997）。これは、抗原提示細胞のMHCと腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLを*in vitro*で増殖させた結果に基づくものである。したがって、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを用いて、*in vitro*で患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

[0083] 当該CTLは、がんの治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。該治療剤または予防剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与などが挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなるがんの治療剤または予防剤を患者の体内に戻すことにより、本発明のASB4陽性のがんに罹患した患者の体内でCTLによるがん細胞の傷害作用が促進され、がん細胞を破壊することにより、がんを治療することができる。

[0084] 本発明のCTLは、腫瘍細胞に抗原提示されている本発明のペプチドとHLAとの複合体を標的として細胞傷害活性を発揮することができる。すなわち本発明のCTLのT細胞受容体（TCR）は、本発明のペプチドとHLAとの複合体を認識するものである。近年、CTLに発現する特定のペプチド-HLA複合体を認識するTCR遺伝子をクローニングし、当該TCR遺伝子をがん患者より採取したCD8+T細胞に遺伝子導入して人工的にCTLを作製し、大量に培養した後、患者体内に戻す養子免疫療法が考案されている（例えばOchi et al., *Blood*, 2011 Aug 11;118(6):1495-503など）。本発明において、「人工CTL」という場合、前述のようにペプチドとHLAとの複合体を認識するTCRをコードする遺伝子を、T細胞に遺伝子導入して作製されたCTLを意味し、これもまた上述の天然のCTLと同様にがんの治療に用いることができるものである。したがってかかる人工CTLもまた

、本発明のCTLに包含される。かかる態様において、人工CTLに遺伝子導入される、本発明のペプチドとHLAとの複合体を認識するTCRは、該複合体に対する結合親和性や細胞傷害活性を上げるために、適宜改変されてもよい。したがって、「人工CTL」には、本発明のペプチドとHLAとの複合体を認識するTCRをコードする遺伝子を、適宜遺伝子改変したのち患者由来のT細胞に遺伝子導入して作製されたCTLも包含される。人工CTLの作製には、当該技術分野において知られた方法を用いることができる。

[0085] <7>本発明のペプチドを用いた腫瘍特異的CTL検出剤

本発明のペプチドは、腫瘍特異的CTLに認識され得るため、腫瘍特異的CTL検出剤の成分として有用である。したがって、本発明はまた、本発明のペプチドを含む、腫瘍特異的CTL検出剤に関する。一態様において、本発明の腫瘍特異的CTL検出剤は、本発明のペプチドとHLA-A02またはHLA-A24とを含有するHLAマルチマー（モノマー、ダイマー、テトラマー、ペンタマーおよびデキストラマー）を含む。

[0086] 例えば、HLAテトラマーとは、HLAの α 鎖と β 2ミクログロブリンをペプチド（エピトープペプチド）と会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。現在では種々の抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーが市販されており（例えば（株）医学生物学研究所より）、本発明のペプチドとHLA-A02またはHLA-A24とを含有するHLAテトラマーを容易に作製することができる。また、HLAダイマーおよびHLAペンタマーも同様な原理に基づいており、これらにおいては、それぞれ、前記HLAモノマーが2量体化および5量体化されている。したがって、本発明のペプチドとHLA-A02またはHLA-A24とを含有するHLAマルチマーもまた、本発明の一態様である。

[0087] 具体的には、例えば配列番号3～14のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドとHLA-A02またはHLA-A24とを含有するHLA

テトラマーが挙げられる。当該HLAテトラマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の既知の検出手段により結合したCTLを容易に選別または検出することができるように蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニクロロフィルプロテイン（PerCP）などにより標識されたHLAテトラマーが挙げられる。

[0088] HLAテトラマーの製法例としては、例えば、Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)などの文献に記載のものが挙げられ、簡単に述べると以下のようなになる。

まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA-A24あるいはHLA-A02の α 鎖発現ベクターおよび β 2ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌（例えばBL21）を用いることが好ましい。得られた単量体HLA-A24あるいはHLA-A02複合体と本発明のペプチドとを混合し、可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させる。次にHLA-ペプチド複合体におけるHLA-A02あるいはHLA-A24の α 鎖のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化する。このビオチン化されたHLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを4:1のモル比で混合することにより、HLAテトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク質精製を行うことが好ましい。

[0089] <8>がん幹細胞検出剤

上述のとおり、本発明者らはASB4ががん幹細胞において特異的に高発現していることを初めて見出した。すなわち本発明者らにより、ASB4は、がん幹細胞を含まないがん細胞や、通常の体細胞においては発現が見られないが、がん幹細胞においては高発現している遺伝子であることが初めて明らかとなった。かかる知見からASB4は、がん細胞、特にがん幹細胞を識別するためのマーカーとして利用可能であることが見出された。したがって本発明は一側面において、ASB4の発現産物を検出するためのASB4検

出剤を含む、がん幹細胞検出剤に関する。

[0090] 本発明において、単にASB4という場合、別段の記載のない限りASB4遺伝子を意味する。好ましくはヒトASB4遺伝子であるが、そのホモログであってもよい。

本発明において「遺伝子の発現」とは、該遺伝子の転写を起点とする一連の生体反応をいい、「発現産物」とは、例えばmRNAや内在性ポリペプチドなど、この一連の生体反応によって生成される分子をいう。遺伝子の発現産物である内在性ポリペプチドは、好ましくは当該遺伝子の発現により最終的に産生されるタンパク質である。

本発明において「ASB4検出剤」とは、ASB4遺伝子またはその発現産物を、定性的および／または定量的に検出するための剤を意味する。

[0091] 本発明のがん幹細胞検出剤は、ASB4の発現産物を検出するためのASB4検出剤を含む。検出対象においてASB4の発現産物が検出された場合、検出対象のがん幹細胞を有する、すなわちがん幹細胞が検出されたと決定できる。本発明のがん幹細胞検出剤は、*in vivo*でも*in vitro*でも用いることが可能であるが、好ましくは生物個体（検査対象）から採取された生体試料由来の細胞集団（検出対象）に対して*in vitro*で用いる。この場合、検出対象である生体試料由来の細胞集団においてがん幹細胞が検出されたことは、すなわち検査対象である生体試料が採取された生物個体においてもがん幹細胞が検出された、すなわち該生物個体のがん幹細胞を有することを意味する。したがって、後述するように、本発明のがん幹細胞検出剤を使用して、検査対象においてがん幹細胞を検出する方法も本発明に包含される。

検査対象である生物個体は、腫瘍を有し得る生物個体であればいかなる生物個体であってもよいが、好ましくはヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどの齧歯類、チンパンジーなどの霊長類、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目、ウマなどの奇蹄目、ウサギ、イヌ、ネコなど）の個体であり、より好ましくはヒトの個体である。

検出対象の細胞集団は、上記検査対象から得られた任意の生体試料由来の

細胞集団に対して用いることが可能であるが、好ましくはヒトから得られた生体試料に由来する細胞集団であり、より好ましくは組織の細胞においてASB4がほとんど発現していないことが確認されている、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および血液からなる群から選択される1または2以上の生体試料に由来する細胞を含む細胞集団である。

[0092] 本発明のがん幹細胞検出剤に含まれるASB4検出剤は、検出する発現産物に依拠して変化し得、当業者であれば適宜最適なものを選択し得る。具体的には、例えば発現産物がmRNAである場合、当該技術分野において公知である任意のmRNA検出法を用いることができ、これに限定するものではないが、例えばRT-PCR法、in situハイブリダイゼーション法、ノーザンブロットリング法、リアルタイムRT-PCRなどが挙げられ、中でも検出感度の高さ、実験手技の簡便さなどから、RT-PCR法が好ましい。例えば発現産物が内在性ポリペプチド（好ましくはASB4タンパク質）である場合は、これに限定するものではないが、例えばウェスタンブロットリング法、免疫組織染色法などが挙げられる。用いるASB4検出剤は、検出する発現産物や採用する検出法に依存して変化し得、当業者は適宜最適なものを選択し得る。具体的には、例えば内在性ポリペプチドを検出する場合はASB4特異抗体（好ましくはモノクローナル抗体）など、mRNAを検出する場合は配列番号1に記載の塩基配列（Genbank Accession No: NM_016116.2の72～1352番目）の一部に相補的な塩基配列を有するプローブおよび／またはプライマーなどが挙げられるが、これに限定するものではない。また検出する発現産物は、単一の発現産物であっても複数の発現産物を組み合わせて用いてもよい。

[0093] <9>本発明のペプチドを認識する抗体

上述のとおり本発明のペプチドは、がん細胞、特になん幹細胞によりCTLエピトープペプチドとして提示される。この際、MHCと複合体を形成して細胞表面に提示される。したがって本発明のペプチドや、前記複合体を特

異的に認識する抗体を用いることで、本発明のペプチドを腫瘍マーカーや抗体医薬の標的として利用できる。このような抗体としては、例えば、本発明のペプチドと特異的に結合する抗体（好ましくはモノクローナル抗体）、本発明のペプチドとHLAとの複合体、好ましくはHLA-A24もしくはHLA-A02との複合体を認識するTCR（T細胞抗原受容体）様抗体が挙げられる。したがって、本発明はまた、本発明のペプチドを認識する抗体および該ペプチドとMHCとの複合体を認識するT細胞抗原受容体様抗体にも関する。

本発明において「抗体」といった場合、免疫グロブリン分子だけでなく、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dsFv、Diabodyおよびsc(Fv)₂などの、抗体の機能的断片も含まれる。また、これら機能的断片の多量体（例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー）も、本発明の抗体に含まれる。

本発明において「TCR様抗体」は、断片化された抗原由来のペプチドと主要組織適合性抗原複合体（MHC）分子との複合体（pMHC）に対してTCR様の結合力（抗原認識能）を有する分子である。例えば、Eur J Immunol. 2004;34:2919-29等で報告されているように、腫瘍抗原由来のペプチドとMHCとの複合体を認識するTCR様抗体は、CTLが標的とし得る腫瘍抗原ペプチドを提示しているがん細胞、がん細胞を貪食してMHCクラスI上に腫瘍抗原ペプチドを提示している樹状細胞などを認識することができる。

[0094] また、ウイルス等由来のペプチドとMHCとの複合体を認識する前記TCR様抗体は、提示した抗原が感染細胞上でどのような提示動態およびCTL応答等を示すのかを、定量的・経時的に解析できる。

前記TCR様抗体は、Eur J Immunol. 2004;34:2919-29等で記載されている方法で作製することができる。例えば、MHCとペプチド複合体をマウス等の動物に免疫することにより複合体特異的な抗体を取得できる。また、ファージディスプレイ法を利用して複合体特異的な抗体を取得することも可能である。

[0095] 上述のとおり、本発明のペプチドや、該ペプチドを提示するMHC複合体を認識することにより、該MHC複合体を細胞表面に提示する腫瘍細胞を検出することが可能である。したがって本発明は、上記抗体やTCR様抗体を含む腫瘍検出剤にも関する。また本発明のペプチドは、腫瘍細胞の他、抗原提示細胞、特に樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞にも同様に提示されるため、上記抗体は、本発明のペプチドを提示する抗原提示細胞等の検出にも有用である。

また上述のとおり本発明のペプチドは、がん細胞、特にがん幹細胞によりCTLエピトープペプチドとして提示されるため、本発明のペプチドや、該ペプチドとHLAとの複合体、好ましくはHLA-A24もしくはHLA-A02との複合体を認識する抗体やTCR様抗体は、対象におけるがんの予防および／または治療剤としても有用である。したがって、本発明はまた、本発明の抗体および／またはTCR様抗体を含む、がんの予防および／または治療剤にも関する。

[0096] 本発明のペプチドは、腫瘍細胞によりCTLエピトープペプチドとして提示されるため、本発明のペプチドや、該ペプチドとHLAとの複合体、好ましくはHLA-A24との複合体を認識する抗体および／またはTCR様抗体は、対象において細胞表面に存在する前記ペプチドおよび／または前記複合体と結合することができる。抗体が腫瘍細胞表面に結合すると、該抗体のFc部位にマクロファージやNK細胞などのエフェクター細胞のFc受容体が結合し、該エフェクター細胞が腫瘍細胞を攻撃する抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が生じることで腫瘍を処置することができる。したがって上記抗体および／またはTCR様抗体は、がんの予防および／または治療剤の有効成分として用いることができる。

[0097] また近年では、2つの異なる抗原結合部位を持ち、それぞれ異なる抗原と結合するように改変した二重特異性抗体が開発されている。一方の抗原結合部位で抗原提示されたペプチドやMHC-抗原ペプチド複合体などのがん細胞表面抗原を認識し、もう一方の抗原結合部位でCD3などのリンパ球表面

抗原を認識する二重特異性抗体は、がん細胞の近傍にCTLやエフェクター細胞などのリンパ球表面抗原を有する細胞を拘束、集積化することが可能となる。がん細胞近傍に拘束されたリンパ球は、自身がADCC活性などの抗腫瘍活性を示すだけでなく、サイトカインなどの分泌によりがん細胞周辺のナイーブな免疫細胞を抗腫瘍性に活性化するバイスタンダーな効果を発揮することでがん細胞を攻撃することができる。

[0098] したがって本発明は、本発明のペプチドおよび／または該ペプチドとHLAとの複合体と、リンパ球表面抗原とを特異的に認識する二重特異性抗体も包含する。特異的に認識されるリンパ球表面抗原は、リンパ球の表面に特異的に発現している抗原であれば特に限定されないが、好ましくはCD3、CD16、CD64などが挙げられる。特にCD3はCTLの細胞傷害活性の誘導に関与している細胞表面抗原であり、CD3に抗体が結合するとHLA-がん抗原複合体を認識せずにHLA非拘束的にCTLが活性化でき、強力な細胞傷害活性を発揮することが期待できるため好ましい。

[0099] さらに、近年、腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体の一部に遺伝子操作を加えて改変したキメラ抗原受容体(CAR)を患者由来のT細胞に遺伝子導入し、この遺伝子改変T細胞を体外で増幅培養した後に患者に輸注するという新たな免疫細胞治療法が考案されている(Nat Rev Immunol, 2012;12:269-81)。具体的には、患者から採取された末梢血単核球を抗CD3抗体とIL-2等の存在下で培養することによりT細胞を活性化したのち、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなどの形質転換用ベクターを用いてCARをコードする遺伝子をT細胞に導入することにより、遺伝子改変T細胞を作製する。

本発明において、「キメラ抗原受容体」は、がん細胞の細胞表面に存在する分子を認識する抗体の抗体可変領域の軽鎖と重鎖を直列に結合させた単鎖抗体(scFv)をN末端側に、T細胞受容体(TCR)/CD3複合体を構成する分子のうちCD3鎖をC末端側に持つように設計されたキメラタンパク分子である。このキメラ抗原受容体は、scFv領域で特定の抗原を

認識すると、CD3と鎖を介してT細胞の活性化が生じる。T細胞の活性化を増強するために、scFvと鎖の間に1または2以上の共刺激分子（例えばCD28、4-1BB、ICOSなど）を組み込んでもよい。本発明においては、scFvとして、本態様のTCR様抗体（TCR様抗体から設計され得る抗体分子またはその断片を含む）を用いてCARを作製することができる。腫瘍抗原由来のペプチドとMHCとの複合体を認識するCARは、CTLが標的とし得る腫瘍抗原ペプチドを提示しているがん細胞、がん細胞を貪食してMHCクラスI上に腫瘍抗原ペプチドを提示している樹状細胞などを認識することができるため、前記CARを導入した遺伝子改変T細胞は、人工CTLと同様に、前記腫瘍抗原に特異的ながんの予防および／または治療剤として有用である。したがって、本発明はまた、本発明の腫瘍抗原由来のペプチドとMHCとの複合体を認識するCARを導入した遺伝子改変T細胞または人工CTLを含む、がんの予防および／または治療剤にも関する。

[0100] <10>腫瘍の検出方法（検査方法、診断方法）

本発明は、前述した本発明のCTL検出剤、あるいはがん幹細胞検出剤または腫瘍検出剤を利用した腫瘍の検出方法（検査方法、診断方法）を提供するものである。

本発明のCTL検出剤を用いる本発明の検出方法（診断方法）は、典型的には、被験者の血液を採取するか、若しくは腫瘍が疑われる被験組織の一部をバイオプシ等で採取し、そこに含まれるASB4由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を認識するCTLの量を、本発明のCTL検出剤によって検出・測定することにより、大腸癌、肺癌、腎癌、乳癌、口腔癌、子宮頸部癌、甲状腺癌、精巣腫瘍、卵巣癌等のASB4陽性のがん（腫瘍）の罹患の有無またはその程度を検出、検査または診断するものである。

[0101] 本発明のがん幹細胞検出剤を用いる本発明の検出方法（検査方法、診断方法）は、典型的には、被験者の血液を採取するか、もしくは腫瘍が疑われる被験組織の一部をバイオプシ等で採取し、そこに含まれるASB4発現産物

の量を、本発明のがん幹細胞検出剤によって検出・測定することにより、大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸部癌、甲状腺癌、精巣腫瘍、卵巣癌等の A S B 4 陽性のがん（腫瘍）の罹患の有無またはその程度を検出、検査または診断するものである。

本発明の腫瘍検出剤を用いる本発明の検出方法（検査方法、診断方法）は、典型的には、被験者の血液を採取するか、もしくは腫瘍が疑われる被験組織の一部をバイオプシ等で採取し、そこに含まれる A S B 4 由来の腫瘍抗原ペプチドと H L A 抗原との複合体を提示する細胞の量を、本発明の腫瘍検出剤によって検出・測定することにより、大腸癌、肺癌、乳癌、口腔癌、子宮頸部癌、甲状腺癌、精巣腫瘍、卵巣癌等の A S B 4 陽性のがん（腫瘍）の罹患の有無またはその程度を検出、検査または診断するものである。

[0102] 本発明の検出（検査、診断）方法は、例えば腫瘍を有する患者において、該腫瘍の改善のために治療薬を投与した場合における、該腫瘍の改善の有無またはその程度を検出（検査、診断）することもできる。さらに本発明の検出（検査、診断）方法は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを有効成分とする医薬を有効に適用できる治療対象患者の選択や、当該医薬による治療効果の予測や判定などにも利用できる。また、本発明の腫瘍検出剤を用いる態様においては、本発明のペプチドを有効成分とするがんワクチンを投与することにより患者生体内で誘導される C T L が実際に標的とし得る、腫瘍抗原ペプチドを提示しているがん細胞を検出することが可能である。

[0103] 本発明の C T L 検出剤を用いる本発明の検出（検査）方法の特定の態様は、次の（a）および（b）、および任意に（c）の工程を含むものである：

（a）被験者から得られた生体試料と本発明の C T L 検出剤とを接触させる工程、

（b）該生体試料中の A S B 4 由来の腫瘍抗原ペプチドと H L A 抗原との複合体を認識する C T L の量を、上記 C T L 検出剤が結合した細胞の量を指標として測定する工程、

（c）（b）の結果をもとに、がんの罹患を判断する工程。

本発明のCTL検出剤を用いる本発明の診断方法の特定の態様は、上記（a）、（b）および（c）の工程を含む。

[0104] 本発明のがん幹細胞検出剤を用いる本発明の検出（検査）方法の特定の態様は、次の（d）および（e）、および任意に（f）の工程を含むものである：

（d）被験者から得られた生体試料と本発明のがん幹細胞検出剤とを接触させる工程、

（e）該生体試料中のASB4発現産物の量を測定する工程、

（f）（e）の結果をもとに、がんの罹患を判断する工程。

本発明のがん幹細胞検出剤を用いる本発明の診断方法の特定の態様は、上記（d）、（e）および（f）の工程を含む。

本発明のがん幹細胞検出剤を用いるがん幹細胞を検出する方法の態様は、上記（d）、（e）の工程および（f）に代えて下記（f'）の工程を含む：

（f'）（e）の結果をもとに、生体試料中のがん幹細胞の存在または不存在を決定する工程。

ここで用いられる生体試料としては、被験者の生体組織（がん細胞の存在が疑われる組織およびその周辺組織、または血液など）から調製される試料を挙げることができる。具体的には、該組織から採取された組織細胞を含む試料などを挙げることができる。

[0105] 本発明の腫瘍検出剤を用いる本発明の検出（検査）方法の特定の態様は、次の（g）および（h）、および任意に（i）の工程を含むものである：

（g）被験者から得られた生体試料と本発明の腫瘍検出剤とを接触させる工程、

（h）該生体試料中のASB4由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を提示する細胞の量を、上記腫瘍検出剤が結合した細胞の量を指標として測定する工程、

（i）（h）の結果をもとに、がんの罹患を判断する工程。

本発明の腫瘍検出剤を用いる本発明の診断方法の特定の態様は、上記（g）、（h）および（i）の工程を含む。

ここで用いられる生体試料としては、被験者の生体組織（がん細胞の存在が疑われる組織およびその周辺組織、または血液など）から調製される試料を挙げることができる。具体的には、該組織から採取された組織細胞を含む試料などを挙げることができる。

[0106] 本発明のCTL検出剤を用いる本発明の検出方法（検査方法、診断方法）の一態様は、生体試料中の本発明のペプチド特異的CTLを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には、文献（Science, 274:p94, 1996、本文献は引用により本願の一部を構成する）に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体の4量体（HLAテトラマー）を作製し、これを用いてがんが疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより行うことができる。

[0107] 腫瘍の有無の予測、判定、判断または診断は、例えば、被験者の血液や腫瘍が疑われる被験組織における本発明のペプチド特異的CTLの量、または、本発明のペプチドを提示する細胞の量を測定することにより行うことができる。その際、場合によっては正常な対応組織におけるASB4遺伝子発現レベル、本発明のペプチドレベルまたはCTLレベル等を基準値として、該基準値と被験者から得られた試料における前記レベルとを比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

ここで被験者の被験組織と正常な対応組織との前記レベルの比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の正常な組織を用いて均一な測定条件で測定して得られた本発明のペプチド特異的CTLの量または本発明のペプチドを提示する細胞の量の平均値または統計的中間値を、正常者の値すなわち基準値として、比較に用いることができる。

[0108] 被験者が、がん罹患しているかどうかの判断は、例えば該被験者の組織における本発明のペプチド特異的CTLの量、または、本発明のペプチドを提示する細胞が、正常者のそれらのレベルと比較して例えば2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。

また、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを投与されている被験者において、本発明のペプチド特異的CTLの量を測定することにより、実際にCTLが誘導されているか否かを判定することも可能である。例えば、該被験者の組織における本発明のペプチド特異的CTLの量が、正常者のそれらのレベルと比較して例えば2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドによる治療が有効であると判定することができる。

[0109] < 11 > がんの予防および／または治療方法

本発明はまた、対象におけるがんを予防および／または治療する方法であって、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、CTL、抗原提示細胞、抗体および／またはTCR様抗体、人工CTL、遺伝子改変T細胞からなる群から選択される有効成分の有効量を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法にも関する。

本発明における「対象」は、がん罹患し得る生物個体であればいかなる生物個体であってもよいが、好ましくはヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどの齧歯類、チンパンジーなどの霊長類、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目、ウマなどの奇蹄目、ウサギ、イヌ、ネコなど）の個体であり、より好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、がんの予防および／または治療が企図される場合には、典型的にはがん罹患しているか、罹患するリスクを有する対象を意味する。本発明の一態様において、対象はHLA-A02陽性またはHLA-A24陽性である。本発明の一態様において、対象はASB4陽性のがんに罹患しているか、罹患するリスクを有する。本発明の一態様において、対象はHLA-

A O 2 陽性または H L A - A 2 4 陽性であり、かつ、A S B 4 陽性のがんに罹患しているか、罹患するリスクを有する。

[0110] 本発明の予防／治療方法に用いる本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、C T L、抗原提示細胞、抗体および／または T C R 様抗体、人工 C T L、および遺伝子改変 T 細胞としては、本明細書に記載の任意のものが挙げられる。本発明における有効量とは、例えば、がんの症状を低減し、またはその進行を遅延もしくは停止する量であり、好ましくは、がんを抑制し、または治療する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、培養細胞などを用いた *in vitro* 試験や、マウス、ラットなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。有効成分の具体的な用量は、それを必要とする対象に関する種々の条件、例えば、症状の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、対象の性別、食事、投与の時期および頻度、併用している医薬、治療への反応性、剤形、および治療に対するコンプライアンスなどを考慮して決定され得る。

[0111] 具体的な用量としては、例えば、本発明のペプチドの場合、通常 0.0001 mg ~ 1000 mg、好ましくは 0.001 mg ~ 1000 mg、より好ましくは 0.1 mg ~ 10 mg であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。また、本発明のポリヌクレオチドの場合、通常、0.0001 mg ~ 100 mg、好ましくは 0.001 mg ~ 10 mg であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。また、本発明の抗体および／または T C R 様抗体の場合、通常、0.0001 mg ~ 2000 mg、好ましくは 0.001 mg ~ 2000 mg であり、これを 1 週間 ~ 4 週間に 1 回投与するのが好ましい。本発明の遺伝子改変 T 細胞または人工 C T L の場合、通常、 1×10^4 ~ 1×10^8 、好ましくは 1×10^5 ~ 1×10^7 であり、これを 1 日 ~ 4 週間に 1 回投与するのが好ましい。また、投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などの既知の任意の適切な投与方法を用いることができる。また、本発明のペプチドやヌクレオチ

ドを直接体内に投与する *in vivo*法その他、ヒトからある種の細胞を採集し、体外で本発明のペプチドやポリヌクレオチドを用いてCTLや抗原提示細胞を誘導した後、これらの細胞を体内に戻す *ex vivo*法を用いることもできる。

[0112] 本発明の予防／治療方法の一態様は、投与する工程の前に、HLA-A02陽性またはHLA-A24陽性の対象を予防／治療の対象として選択する工程をさらに含む。本発明のこの態様は、上記選択する工程の前に、対象のHLA型を決定する工程をさらに含んでもよい。対象のHLA型の決定は、既知の任意の手法により行うことができる。また、本発明の予防／治療方法の一態様は、投与する工程の前に、ASB4陽性のがんを有する対象を予防／治療の対象として選択する工程をさらに含む。本発明のこの態様は、上記選択する工程の前に、対象におけるASB4陽性のがんを検出する工程をさらに含んでもよい。対象におけるASB4陽性のがんの検出は、上記<9>に記載の腫瘍の検出方法を用いることができる。本発明の予防／治療方法の一態様は、投与する工程の前に、HLA-A02陽性またはHLA-A24陽性であり、かつ、ASB4陽性のがんを有する対象を予防／治療の対象として選択する工程をさらに含む。本発明のこの態様は、上記選択する工程の前に、対象のHLA型を決定する工程および対象におけるASB4陽性のがんを検出する工程をさらに含んでもよい。

[0113] <12>がん幹細胞を標的とするがん治療薬のスクリーニング方法

本発明のがん幹細胞検出剤を用いる態様において、検出対象におけるASB4発現産物の発現量は、検出対象中のがん幹細胞の量と相関していると考えられる。したがって、検出対象に対してがん治療薬の候補化合物を投与する前後におけるASB4発現産物の発現量を比較することで、投与した候補化合物ががん幹細胞を標的とするがん治療薬として有用であるか否かを判定することができる。

[0114] 本発明のスクリーニング方法は、以下の工程(1)、(11)および任意に(111)を含むものである：

(1) がん治療薬の候補化合物を、対象に投与する前に、該対象における

A S B 4 遺伝子の発現産物の検出量 A を測定する工程、

(1 1) 前記候補化合物を前記対象細胞集団に投与した後に、該対象における A S B 4 遺伝子の発現産物の検出量 B を測定する工程、および

(1 1 1) 前記検出量 A と B とを比較し、該検出量 A が B より有意に大きい場合に、前記候補化合物を、がん幹細胞を標的とすることを特徴とするがん治療薬候補であると判定する工程。

本発明のスクリーニング方法の特定の態様は、上記工程 (1) ~ (1 1 1) を含む。ここで工程 (1) および (1 1) の検出量を測定する工程は、それぞれ上記検出 (検査、診断) 方法における工程 (d) および (e) を含む。

[0115] 本明細書中で言及する全ての特許、出願および他の出版物は、その全体を参照により本明細書に援用する。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例

[0116] 実験例 1 : ヒト大腸がん細胞の S P 画分の検出とサブクローニング

a) 試薬の調製

培地として 5 % のウシ胎仔血清 (F C S (HyClone Laboratories 社)) 補充 D M E M (Sigma-Aldrich 社) 培地を調製し、 3 7 ° C に温めておいた。ベラパミル (Sigma-Aldrich 社) は 5 0 m M に調整し、 5 % F C S 補充 D M E M 培地で、 5 m M に希釈した。ヘキスト 3 3 3 4 2 (Lonza 社) は 5 % F C S 補充 D M E M 培地で 2 5 0 μ g / m L に調整した。D N a s e I (Qiagen 社) は D D W で 1 m g / m L に調整し、 0 . 2 μ m のフィルターでろ過滅菌した。

[0117] b) フローサイトメトリー (F A C S) 用の細胞の調整

ヒト大腸がん細胞株 (S W 4 8 0 (A T C C)) を 4 m L の 5 % F C S 補充 D M E M 培地で懸濁し、細胞数を数えた。さらに 5 % F C S 補充 D M E M 培地を加えて細胞濃度を 1 0 × 1 0 ⁶ 個 / m L に調整し、検体を得た。検体の

一部を用いて分注し、主検体にはベラパミルを添加せず（ベラパミル（-）サンプル）、副検体にはベラパミルを最終濃度 $75 \mu\text{M}$ になるように添加した（ベラパミル（+）検体）。その後、ベラパミル（+）検体およびベラパミル（-）検体にヘキスト 33342 の最終濃度が $5.0 \mu\text{M}$ となるようにヘキスト 33342 溶液を添加した。

両検体を 37°C で 90 分間振盪培養後、氷上にて冷却した。 1500 rpm 、 4°C で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。5% FCS 補充 $1 \times \text{PBS}$ で懸濁して、氷冷しておいた FACS チューブに移した。再び 1500 rpm 、 4°C で 5 分間遠心分離して上清を取り除き、5% FCS 補充 $1 \times \text{PBS}$ で懸濁した。同様の洗浄を 1 回繰り返した後、 2 mM の EDTA 入り 2% FCS 補充 $1 \times \text{PBS}$ 2 mL で懸濁した。DNase I 液を $2 \mu\text{L}$ 加え、混和後、FACS 用フィルター（ベクトン・ディッキンソン (BD) 社）にて細胞集塊を除去した。 1 mg/mL のプロピジウム・アイオダイド (PI) (Sigma-Aldrich 社) を $2 \mu\text{L}$ 添加後、フローサイトメーターとして BD FACS Aria II special edition (登録商標) (BD 社) を用い、流動速度 $1000 \sim 2000$ 個/秒で解析した。

[0118] c) フローサイトメトリー (FACS)

FACS の操作は取扱説明書に従って行った。

まず、ベラパミル（-）検体の細胞を解析し、主体となる細胞群 (main population (MP)) と比較して、発光強度の低い細胞群 (side population (SP)) 細胞を検出した (図 1)。SP 細胞が ABC トランスポーター特異的にヘキスト 33342 色素低染色性であることを確認するため、ベラパミル（+）検体を同じ条件で解析し、SP 細胞が消失することを確認した (図 1)。

SP 細胞を単離し、細胞を 4°C 、 1500 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を取り除いた後、 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ の $1 \times \text{PBS}$ で懸濁した。

[0119] d) 単一細胞レベルでのサブクローニング

SW480 由来 SP 細胞を前記 c) にて検出し、その SP および MP 細胞

分画をそれぞれ96ウェルプレートに1細胞/1ウェルになるようにシングルセルソーティングを行った(図2-1)。各ウェルには1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加10%FC S補充DMEM培地を予め入れておいた。

2~3週間培養後、各ウェルにおいて増殖した細胞株をそれぞれ、SW480-SPクローン細胞株、SW480-MPクローン細胞株とした。「SW480-SP-X」または「SW480-MP-Y」のXおよびYはそれぞれクローン番号とする。

共焦点顕微鏡でその形態を観察したところ、MPクローン細胞株は主に単層で増殖し、各細胞は紡錘形を示した。一方で、SPクローン細胞株は重層化傾向を示し、各細胞は円形~類円形を示した。得られた代表的なSPクローンおよびMPクローンの顕微鏡画像を図2-2に示す。

[0120] 実験例2：腫瘍形成能実験

実験例1で得られたSW480-SPおよびSW480-MPクローン細胞株それぞれのin vivoにおける造腫瘍能を確認するために、SPクローンおよびMPクローンそれぞれの代表的な3クローンを用いて、NOD/SCID免疫不全マウス(オリエンタル工房社)に移植した。

具体的には、同数のSPおよびMPクローン細胞をそれぞれ氷上で100 μ Lの1 \times PBSに懸濁し、100 μ Lのマトリゲル(BD社)と混和した。100 μ Lの細胞マトリゲル混合液をNOD/SCIDマウス(オリエンタル工房社)の背部皮下にSPおよびMPクローン細胞をそれぞれ、100個、1000個、10000個、各グループ5匹にて接種し、腫瘍形成を観察した。腫瘍長径・短径の長さを測り、腫瘍体積を(体積=長径 \times 短径 \times 2/2)の計算式にて算出した。10000個移植したマウスの腫瘍増大曲線を図3に示す。

[0121] その結果、10000個細胞移植群において、細胞接種後8週間にてSW480-MPクローン移植群では腫瘍形成が全くみられなかった。一方、SW480-SPクローン移植群では全てのマウスで腫瘍形成が観察され、作

った腫瘍の体積はSW480-MPクローン群と比較して有意に高かった（図3）。これはがん幹細胞が腫瘍形成の大きな要因であり、SPクローン細胞にがん幹細胞が濃縮されるという見解（Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 20:781-786, 2004）と一致する。

[0122] 実験例3：ヒト大腸癌SP細胞のHLA-A24結合ナチュラルペプチドの
同定

以下の手順にてヒト大腸癌細胞株SW480のSP画分細胞にのみ特異的に提示されるHLA-A24結合ナチュラルペプチドの溶出と配列解析を行った。

a) 細胞株

前記大腸がん細胞株由来クローンであるSW480-MPおよびSW480-SP系統は、10%FCSおよび1%ペニシリン・ストレプトマイシン（Gibco社）を添加したDMEM培地にて培養し、細胞数をそれぞれ $1.5 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^9$ 個の範囲とした。

[0123] b) 抗体

抗HLA-A24抗体（C7709A2）を産生するハイブリドーマは、P. G. Colie博士（de Duve Institute, Brussel）より供与されたものである。ハイブリドーマを、10%FCS、1%ペニシリン・ストレプトマイシン、55 μ Mの2-メルカプトエタノール（Gibco社）、1mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco社）、2mMのL-グルタミン（Sigma-Aldrich社）および20mMのHEPES（Gibco社）を添加したRPMI-1640（Sigma-Aldrich社）培地にて培養し、培養上清からセルロースチューブとポリエチレングリコール（PEG-20000）とを用いた逆浸透法により濃縮抗体を得た。濃縮抗体は0.03%アジ化ナトリウムとプロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche Diagnostics社）とを添加し、4℃にて保存した。

[0124] c) 抗体とビーズの結合

30～40 mLの濃縮抗体を、3 mLのプロテインAセファロースビーズ (GE Healthcare社) と4℃で一晩攪拌し結合させ、その後0.1 Mのホウ酸と0.2 Mのトリエタノールアミン緩衝液 (pH 8.2) とで洗浄した。抗体とビーズとは20 mMのピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩含有トリエタノールアミン緩衝液 (pH 8.3) にて60～90分間室温で攪拌し共有結合させた。

d) HLA-A24結合ペプチドの免疫沈降

0.5% NP-40、50 mM トリス塩酸 (pH 8)、150 mM 塩化ナトリウムおよびプロテアーゼ阻害剤を含んだ緩衝液を用いて、実験例3a)の細胞 (SW480-SPおよびSW480-MP) をそれぞれ溶解した。細胞溶解液は段階的に遠心分離を行い (2000 gで10分間、38000 gで30分間、100000 gで90分間)、上清を回収した。回収した上清は0.5 mLのプロテインAセファロース懸濁液カラムを通過させ、プロテインAセファロースと非特異的に結合する成分を除去した後、実験例3c)で作製した抗体結合プロテインAセファロースビーズと混合し、4℃にて一晩ゆっくりと攪拌しながら、ナチュラルペプチドとHLA-A24分子との複合体を抗体ビーズに結合させた。

[0125] その後、抗体ビーズは4種類の緩衝液 ([1] 0.005%のNP-40、50 mMのトリス塩酸 (pH 8.0)、150 mMの塩化ナトリウム、5 mMのEDTAおよびプロテアーゼ阻害剤; [2] 50 mMのトリス塩酸 (pH 8.0) および150 mMの塩化ナトリウム; [3] 50 mMのトリス塩酸 (pH 8.0) および450 mMの塩化ナトリウム; ならびに [4] 50 mMのトリス塩酸 (pH 8.0)) を用いて段階的に洗浄した後、抗体に結合したペプチドおよびHLA-A24分子を10%酢酸処理にて溶出させた。続いて目的とするペプチドのみを3 kDaカットオフフィルター (Millipore社) により抽出した。このペプチド含有抽出液を濃縮乾燥し、0.1%ギ酸を溶媒として再溶解し、サンプルとした。

[0126] e) 溶出ペプチドの配列解析

実験例3d) で得られたサンプルを、ナノフローHPLC (Kya Technologies Corporation社) にて分画し、MALDI基質へスポットした後、マスマススペクトロメーター (Applied Biosystems社 ; MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF) にて解析した。マスマススペクトロメトリー解析およびペプチド配列解析には、Applied Biosystems 4000 Series Explorer software (ver. 3.5.3)、ProteinPilot 3.0ソフトウェア (Applied Biosystems社)、およびipi.HUMAN FASTA タンパクデータベース (ver. 3.71) を使用した。得られたペプチド配列のうち、SW480-SPに特異的であったもののうち、実験例4以降にて後述するASB4遺伝子に由来するペプチドの配列および解析スペクトラムを図4に示す。

[0127] f) 考察

抗HLA-A24抗体による免疫沈降とマスマススペクトロメトリー解析とを組み合わせた手法により、HLA-A24結合ペプチドの同定が可能であった。これらは大腸がん細胞の表面に提示されているナチュラルペプチドであると考えられる。また、MP分画細胞においても同様の手法を用いて解析を行い、両者を比較することにより、SP分画細胞に特異的に抗原提示されているナチュラルペプチドとして配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するナチュラルペプチドなどが同定された。

[0128] 実験例4 : HLA-A24結合ナチュラルペプチドをコードする遺伝子の発現

a) SP特異的な遺伝子発現

実験例3e) にてSP分画細胞に特異的なHLA-A24結合ナチュラルペプチドが複数同定された。このペプチドは大きく2つのグループに分類されることが考えられる。すなわち、ペプチドをコードする遺伝子がSP分画細胞特異的に発現しているグループと、ペプチドをコードする遺伝子はSP分画細胞、MP分画細胞ともに発現しているが、タンパク質発現レベルまたはペプチドプロセシングの差から、MPではナチュラルペプチドとしてHLA-A24によって抗原提示されないグループである。

上記で同定されたナチュラルペプチドをこの分類目的において分類するため、SW480-SPおよびSW480-MPそれぞれのmRNAを抽出してRT-PCRによる遺伝子発現の検討を行ったところ、SP分画細胞特異的に発現する遺伝子の1つとしてASB4遺伝子を確認した。遺伝子発現解析の結果を図5に示す。mRNA抽出と逆転写にはそれぞれTRIzol (Invitrogen社) およびSuperScript (登録商標) III Reverse Transcriptase (Invitrogen社) を製品添付書に従って使用した。RT-PCRに用いたプライマーおよびサーマルサイクラーの条件を下表に示す。RT-PCR産物は1.5%アガロースゲルを用いて、100Vで25分間電気泳動を行った。

[0129] [表1]

表1 : RT-PCR に用いたプライマー

プライマー情報

G3PDH	fw :	5'-accacagtccatgccatcac-3'	(配列番号 53)
	rv :	5'-tccaccaccctgttgctgta-3'	(配列番号 54)
		(予測される増幅産物の大きさ : 450bp)	
Asb4	fw :	5'-ctgtcttgtttggccatgtg-3'	(配列番号 55)
	rv :	5'-gcgtctctcatcttggttg-3'	(配列番号 56)
		(予測される増幅産物の大きさ : 288bp)	

[表2]

表2 : RT-PCR の条件

DreamTaq	0.1 μ l
10 \times buffer	2 μ l
2mM dNTPs	2 μ l
プライマーfw	1.2 μ l
プライマーrv	1.2 μ l
テンプレート	1 μ l
<u>H₂O</u>	<u>12.5 μl</u>
合計	20 μ l

[表3]

表3：サーマルサイクラーの条件

94°C	2 min	
94°C	15 sec	} 35 cycles
63°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	∞	

[0130] b) 正常細胞でのASB4遺伝子発現

実験例4 a) で確認されたASB4について、ヒト成人正常細胞において発現を調査した。ヒト成人正常組織由来mRNAパネルをクロンテック社から入手し、これを用いてRT-PCRを行った。mRNAパネルには、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血単核球の各成人正常細胞および組織由来のmRNAが含まれている。

まず、SuperScript (登録商標) III逆転写酵素 (インビトロジェン社製) を用いて、キットのプロトコールに従ってmRNAからcDNAを合成した。合成したcDNAを、順行 (Fw) プライマーおよび逆行 (Rv) プライマー (表1) を用いて、RT-PCRによりASB4のcDNAを増幅した。またコントロールとして、GAPDHのcDNAを同様の方法で増幅した。PCR条件を表2、3に示す。増幅した増幅物に対して1.5%アガロースゲルを用いて、100Vで25分間電気泳動を行った。結果を図6に示す。

[0131] c) がん細胞株におけるASB4遺伝子発現

大腸がん細胞株3種類 (SW480、SW620、HTC116)、肺がん細胞株4種類 (A549、LHK2、LK79、86-9)、腎細胞がん2種 (Caki 1、ACHN)、乳がん細胞株2種類 (MDAMB468、MCF7)、卵巣がん2種 (ES2、Tov21G)、子宮頸がん細胞株1種類 (HeLa)、膀胱がん細胞株1種類 (UMUC3)、骨肉腫1種類 (U205)、口腔がん細胞株2種類 (OSC70、HSC2) におけるA

S B 4 遺伝子発現を実験例 4 b) と同様の手法により確認した。結果を図 7 に示す。

[0132] d) 考察

大腸がん細胞の幹細胞である SW480SP 特異的に H L A - A 2 4 ペプチド提示される A S B 4 タンパクの遺伝子発現を確認した (図 5)。同遺伝子は死亡者数が国内および世界的に多い大腸癌および肺癌といった上皮性悪性腫瘍細胞株において発現が確認され、その一方で各種臓器における正常細胞には発現がみられない (図 6 および図 7)。すなわち、A S B 4 遺伝子およびその産物であるペプチドは、がんの治療標的として理想的な資質を有すると考えられる。

[0133] 実験例 5 : ペプチド結合アッセイ

マスマスペクトロメトリー解析で得られた A S B 4 タンパク由来ペプチド (I V 9 : 配列番号 3) の H L A - A 2 4 結合能を検証した。まず T 2 - A 2 4 細胞を 2 4 ° C で一晩培養し、翌日に、図 8 に示した濃度範囲 (0 . 3 μ M 、 1 μ M 、 3 . 3 μ M および 1 0 μ M) でペプチドをパルスし同温度のまま 3 時間、続いて 3 7 ° C で 2 . 5 時間インキュベートした。ポジティブコントロールとして H I V ₅₈₄₋₅₉₄ ペプチド (アミノ酸配列 : R Y L R D Q Q L L G I ; 配列番号 5 1) 、ネガティブコントロールとして G K 1 2 ペプチド (アミノ酸配列 : G Y I S P Y F I N T S K ; 配列番号 5 2) を用いた。遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m 、 5 分間) して上清を除き、単離した細胞成分を H L A - A 2 4 抗体 (C7709A2.6) で処理 (4 ° C 、 1 時間インキュベート) した。その後 P B S で洗浄し、遠心分離して上清を除去した後、二次抗体 (Goat anti-MouseIgG、F I T C) で処理 (4 ° C 、 3 0 分インキュベート) した。その後、細胞を P B S で洗浄し、1 % パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を加え、細胞を固定した。フローサイトメーター (F A C S c a n) を用いて F I T C 蛍光強度を計測し、細胞表面に発現する合成ペプチドと H L A - A 2 4 との複合体の量を定量した。結果を図 8 に示す。図 8 に示されるとおり、A S B 4 タンパク由来ペプチド I V 9 は H L A - A 2 4 に対する結合活性を有するこ

とがわかった。

[0134] 実験例6：細胞傷害性T細胞（CTL）誘導

a) ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の分離

インフォームドコンセントを得たHLA-A24陽性大腸がん患者またはHLA-A24陽性健常者の末梢血をヘパリン添加50mLシリンジにて採血した。全血を、リンフォプレップ（Nycomed社）を13mL添加した50mLチューブ（ファルコン社）に重層し、2000rpm、30分間遠心分離した。リンフォプレップ層上に沈殿したPBMC層をピペットにて回収し、PBSにて3回洗浄し、ヒトPBMCとした。

[0135] b) CD8陽性細胞（CD8⁺）およびCD8陰性細胞（CD8⁻）の分離

前記のように分離したPBMCを10mLのAIM-V培養液（Life Technologies社）に懸濁後、10cmプラスチックシャーレにて約2時間37℃にて培養した。10cmシャーレを緩やかに振盪し、浮遊細胞をAIM-V培養液とともに回収し、15mLチューブにて1500rpmで5分間遠心分離した。得られたペレットに、160μLの2mMのEDTA添加0.1%BSA補充PBSに懸濁し、40μLのCD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec社）を添加、混和後、4℃にて15分間培養し、2mMのEDTA添加0.1%BSA補充PBS5mLにて洗浄し、1500rpmで5分間遠心分離した。ペレットに、2mMのEDTA添加0.1%BSA補充PBS1mLを添加、混和し、マグネット装着カラムに添加し、2mMのEDTA添加0.1%BSA補充PBSにより5回洗浄後、カラムをマグネットから脱着しCD8⁺細胞を回収した。カラムに付着しなかった細胞をCD8⁻細胞とした。

[0136] c) 合成ペプチドによるCD8⁺細胞刺激

CD8⁻細胞およびCD8⁺細胞を、10%ヒトAB血清（HS）添加AIM-V培養液にて培養した。一部のCD8⁻細胞に、1mg/mLのフィトヘマグルチニン（PHA）（WAKO chemicals社）および100U/mLのインターロイキン2（IL-2）（武田薬品工業社）を添加し、7日間培養し、

PHA-blast細胞を作製した。PHA-blast細胞に、実験例3e)にて同定されたASB4由来のアミノ酸配列を有する合成ペプチドIV9(配列番号3)を $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加し、室温にて1時間培養した。ペプチドパルスPHA-blast細胞を放射線照射機(Softex社)にて100Gy照射し、10mLのPBS添加後、1500rpmで5分間遠心分離した。ペレットを1mLの10%HS添加AMI-Vに懸濁し、細胞濃度を計算した。 4×10^5 個のPHA-blast細胞を、 2×10^6 個のCD8⁺細胞に添加し、1mLの10%HS添加AIM-Vにて1週間37℃にて培養した。7日目に、同様にペプチドパルスしたPHA-blast細胞を100Gyの放射線で照射し、CD8⁺細胞に添加した。8日目、CD8⁺細胞に、 $20\text{U}/\text{mL}$ のIL-2を添加した。同様のPHA-blast細胞による刺激を14日目に行った。

[0137] 実験例7：インターフェロン(IFN)- γ ELISPOTアッセイ

a) ELISPOTプレートの作製

実験は、Human IFN γ ELISPOT set (BD社)を使用して行った。ELISPOTプレートに、200倍希釈した抗IFN γ 抗体を4℃で一晩静置してコートした。10%FCS補充RPMI (Sigma-Aldrich社)にてプレートを室温にて2時間培養し、ブロッキングし、ELISPOTプレートとした。

[0138] b) 細胞培養

$20\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度にて各ペプチドを、ヒトリンパ芽球様細胞T2細胞にHLA-A2402遺伝子を導入して発現させた細胞株であるT2-A24細胞(葛島先生、愛知県がんセンターより供与)に室温にて1時間パルスした。ペプチドパルス群は[1]ペプチドパルス無し、[2]HIVペプチドパルス、[3]ASB4ペプチドパルスの3群とした。ペプチドパルス後PBS添加、1500rpmで5分間遠心分離した。細胞ペレットを 5×10^5 個/mLになるように懸濁し、ELISPOTプレートに各ウェル 5×10^4 個ずつ播種した。CTLを各ウェル 5×10^4 個播種し、37℃にて一晩培養した。

[0139] c) スポットの検出

一晚培養したELISPOTプレートから培養液および細胞を除去後、Milli Q水にて2回、wash bufferにて3回洗浄した。各ウェルに250倍希釈したビオチン化検出抗体を添加、室温にて2時間培養した。Wash bufferにて3回洗浄後、100倍希釈したHRP標識ストレプトアビジンを各ウェルに添加、室温にて1時間培養した。Wash bufferにて3回洗浄およびPBSにて2回洗浄後、発色試薬を各ウェルに添加、室温にて15～30分間発色反応を行った。十分な可視スポット形成を確認後、Milli Q水にて洗浄し、反応を終了した。ニトロセルロース膜を乾燥後、KS ELISPOT (ZEISS社)にて検出、撮影した。図9に見られるように、ASB4ペプチドパルス群にてIFN γ スポットが検出された。

[0140] 実験例8：細胞傷害試験

T2-A24細胞、SW480-SP、SW480-MPおよびHLA-class I欠失の白血病細胞K562 (ATCCから入手)を 1×10^6 個/mLの細胞濃度で、10%FBS補充RPMIに懸濁した。10mLの10%FBS補充RPMIにて3回洗浄した。

T2-A24細胞に、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でIV9ペプチドおよびT2-A24細胞結合ポジティブコントロールとしてHIV₅₈₄₋₅₉₄ペプチドを室温にて1時間パルスした。ネガティブコントロールとしてはペプチドパルス無しの群を用いた。T2-A24細胞の実験群は、[1]ペプチドパルス無し、[2]HIV₅₈₄₋₅₉₄ペプチドパルス、[3]IV9ペプチドパルスの3群とした。また、K562にも同様の条件でIV9ペプチドをパルスした。SW480-SPおよびSW480-MPの両群は、ペプチドパルス無しで用いた。ペプチドパルス後、PBSにて2回洗浄した。各群細胞を 1×10^5 個/ $100 \mu\text{L}$ で各ウェルに播種した。

エフェクター細胞 (CTL) をエフェクター/ターゲット比 (E/T ratio) 1、3、9となるように各個数のCTLを各ウェルに播種した。自然遊離ウェルとしてエフェクター細胞 (CTL) を播種した。最大遊離ウェルには、

ターゲット細胞に最終濃度 2% となるように、4% の NP-40 添加 PBS を添加した。37°C で 6 時間培養後、遠心し上清 100 μ l を新たなプレートに移し、LDH Cytotoxicity Detection Kit 反応液（タカラバイオ株式会社）を各ウェルに 100 μ l 加えた。10 分後に、各ウェルの蛍光強度をテラスキャンにて測定した。細胞傷害活性を下記計算式にて計算した。

細胞傷害活性 = (実験群の遊離量 - 実験群の自然遊離量) / (実験群の最大遊離量 - 実験群の自然遊離量) \times 100

図 10 に示すとおり、CTL は、[1] ペプチドパルス無し群、[2] HIV ペプチドパルス群、IV9 ペプチドパルス K562 群と比較して [3] IV9 ペプチドパルス群に対して高い細胞傷害活性を示した。このことは、CTL が ASB4 ペプチドに対して特異的細胞傷害活性を示す事を示唆する。また、SW480-SP 群はペプチドパルス無しでも [3] IV9 ペプチドパルス群と同等の細胞傷害活性を示した一方で、SW480-MP 群は [1] ペプチドパルス無し群および [2] HIV ペプチドパルス群と同程度の細胞傷害活性しか示さなかった。このことは、SW480 細胞株が SP 分画細胞においてのみ IV9 ペプチドを細胞表面に抗原提示していることを示唆する。

[0141] 実験例 9 : HLA-A*02:01 および HLA-A*24:02 結合モチーフを有する ASB4 由来ペプチド

MHC とペプチドの結合予測プログラムである BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)、SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) および IEDB (MHC-I processing predictions ; <http://www.iedb.org/>) などを用いて、HLA-A*02:01 および / または HLA-A*24:02 への結合が予測される ASB4 由来のペプチド (配列番号 4~46 で表されるペプチド) を抽出した。これらペプチドを Fmoc 法で化学合成した。合成したペプチドを以下の表 4 に示す。Start は、合成したペプチドの N 末端アミノ酸の、ASB4 (配列番号 2) におけるアミノ酸位置を示し、End は合成したペプチドの C 末端アミノ酸の、ASB4 (

配列番号2)におけるアミノ酸位置を示す。Lengthは合成したペプチドのアミノ酸数を表す。

[0142] [表4]

表4：合成したペプチド

配列番号	名称	Start	End	Length	ペプチド配列
4	As80_9	80	88	9	HL5VLFQHV
5	As82_10	82	91	10	SVLFGHVVECL
6	As124_10	124	133	10	KILCDRGAKL
7	As125_9	125	133	9	ILCDRGAKL
8	As184_12	184	195	12	HFGLSELVAFYV
9	As135_10	135	144	10	CYSLSGHTAL
10	As83_10	83	92	10	VLFGHVVECLL
11	As87_9	87	95	9	HVECLLVLL
12	As307_10	307	316	10	CYQLLNHGA
13	As301_11	301	311	11	AAQPEICYQLL
14	As405_9	405	413	9	PLLSLPLSL
15	As35_10	35	44	10	AILIQRQIDV
16	As92_10	92	101	10	LVLLDHNATI
17	As152_9	152	160	9	SILCARQLV
18	As186_10	186	195	10	GLSELVAFYV
19	As236_10	236	245	10	RMLLDYKAEV
20	As265_10	265	274	10	HVLMHMMLEA
21	As280_10	280	289	10	LMDINGCAAI
22	As383_10_5L	383	392	10	TLMHLSRCAI
23	As416_10	416	425	10	YLLLEPEGH
24	As76_10	76	85	10	ATGLHL5VLF
25	As192_10	192	201	10	AFYVEHGAIF
26	As211_10	211	220	10	PLAIAAYWAL
27	As289_10	289	298	10	IQYVLKVT5V
28	As318_10	318	327	10	RIYPPQFHKV
3	IV9	319	327	9	IYPPQFHKV
29	As365_12	365	376	12	KYWDFYHSLFTV
30	As365_9	365	373	9	KYWDFYHSL
31	As15_11	15	25	11	KLVKRNFL5AL
32	As29_9	29	37	9	DFGKLKAIL
33	As41_10	41	50	10	QIDVDTVFEV
34	As48_10	48	57	10	FEVEDENMVL
35	As63_9	63	71	9	GYWLPSYKL
36	As70_10	70	79	10	KLKSSWATGL
37	As145_10	145	154	10	HFCTTPSSIL
38	As157_10	157	166	10	KQLVWRGANV
39	As271_10	271	280	10	MLEAGAEANL
40	As290_9	290	298	9	QYVLKVT5V
41	As310_10	310	319	10	LLLNHGAARI
42	As311_9	311	319	9	LLNHGAARI
43	As340_9	340	348	9	VVVNAYEHI
44	As368_9	368	376	9	DFYHSLFTV
45	As403_9	403	411	9	AIPLLSLPL
46	As408_10	408	417	10	SLPLSLKKYL

[0143] 実験例10：ASB4由来ペプチドのHLA-A*02:01あるいはHL

A-A*24:02 結合性評価

ASB4由来ペプチドの各HLA分子への結合性評価はMHCクラスI発現安定化試験によって実施した。当試験ではヒトリンパ芽球様細胞株であるT2-A24細胞を利用した。T2細胞は細胞質から小胞体へのペプチドの輸送に關与する抗原ペプチド輸送体(TAP; transporter associated with antigen processing)を欠損している。MHCクラスI分子(HLA-A*02:01およびHLA-A*24:02)は、ペプチドが結合していない状態(empty MHC class I)では、構造が不安定であることが知られる。通常、T2細胞は細胞表面に低レベルのempty MHC class I分子しか発現できない。しかし、MHCクラスI分子に結合可能なペプチドを添加すると、empty MHC class I分子は該ペプチドと結合して細胞表面で安定化して存在できる。したがって、細胞表面MHCクラスI発現レベルはペプチドのMHCクラスI結合親和性に依存することとなる。

- [0144] T2-A24細胞は、37℃、5%CO₂下で継代培養した。ペプチドは、ASB4由来ペプチド(表4に記載のペプチド)、HLA-A02ポジティブコントロールとしてMelan A A27Lペプチド(アミノ酸配列: ELA G I G I L T V; 配列番号47)、HLA-A24ポジティブコントロールとしてHIV₅₈₄₋₅₉₂ペプチド(アミノ酸配列: R Y L R D Q Q L L; 配列番号48)、HLA-A02ネガティブコントロールとしてMAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ペプチド(アミノ酸配列: E A D P T G H S Y; 配列番号49)、HLA-A24ネガティブコントロールとしてVSV₅₂₋₅₉ペプチド(アミノ酸配列: R G Y V Y Q G L; 配列番号50)をそれぞれ100μg/mLの濃度で用いて結合性を評価した。これらペプチドはDMSOに溶解され、さらに、RPMI160培地で200倍に希釈された。細胞懸濁液とペプチド溶液とを混合し、5%CO₂、26℃の条件で16~18時間培養した。温度を37℃にして、さらに3時間共培養した後、遠心分離して上清を除き、細胞を単離した。単離した細胞を、3%FBSを含むPBSで洗浄し、FITCで蛍光標識した抗HLA-A02抗体(clone:BB7.2; 医学生物学研究

所) または抗HLA-A24抗体(clone:17A10; 医学生物学研究所) を加え、室温で30分静置した。その後、細胞を、3% FBSを含むPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を加え、室温で10分間静置することで細胞を固定した。固定した細胞は、フローサイトメーター(FACSscan)にて、FITC蛍光強度を計測した。平均蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)の溶媒比を算出した。

[0145] HLA結合試験の結果を表5に示す。表5に示すとおり、配列番号4~23で表されるペプチドのHLA-A*02:01に対するMFIが1.5以上を示し、配列番号3~14および24~30で表されるペプチドのHLA-A*24:02に対するMFIが1.5以上を示し、配列番号4~14で表されるペプチドのHLA-A*02:01およびHLA-A*24:02の両方に対するMFIが1.5以上を示した。

[0146]

[表5]

表 5 : HLA 結合試験の結果

配列 番号	HLA-A*02:01		HLA-A*24:02		MFI	
	陽性対照	陰性対照	陽性対照	陰性対照	HLA-A02	HLA-A24
4	3.3	1.0	3.3	1.0	1.6	2.1
5	3.3	1.0	3.3	1.0	3.3	2.7
6	3.3	1.0	3.3	1.0	1.6	2.2
7	3.5	1.0	2.6	1.0	1.9	1.8
8	3.9	1.0	3.3	1.0	3.1	3.2
9	3.5	1.0	2.6	1.0	1.6	2.4
10	3.5	1.0	2.6	1.0	3.6	2.8
11	3.3	1.0	3.3	1.0	1.5	1.6
12	3.3	1.0	3.3	1.0	2.5	1.9
13	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	2.0
14	3.3	1.0	3.3	1.0	2.2	2.8
15	3.3	1.0	3.3	1.0	3.4	1.1
16	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	1.1
17	3.3	1.0	3.3	1.0	1.8	1.3
18	3.3	1.0	3.3	1.0	2.6	1.1
19	3.3	1.0	3.3	1.0	3.3	1.0
20	3.3	1.0	3.3	1.0	2.0	1.3
21	3.3	1.0	3.3	1.0	3.1	1.2
22	3.5	1.0	2.6	1.0	2.4	1.0
23	3.3	1.0	3.3	1.0	2.8	1.4
24	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	2.1
25	3.5	1.0	2.6	1.0	1.1	2.2
26	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	2.1
27	3.3	1.0	2.8	1.0	1.2	1.5
28	3.3	1.0	3.3	1.0	1.4	3.6
3	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	3.3
29	3.3	1.0	2.8	1.0	1.0	2.4
30	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	2.5
31	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.0
32	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.0
33	3.3	1.0	3.3	1.0	1.2	1.1
34	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.4
35	3.5	1.0	2.6	1.0	1.1	1.2
36	3.3	1.0	3.3	1.0	1.1	1.0
37	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.2
38	3.3	1.0	3.3	1.0	1.2	1.0
39	3.3	1.0	2.8	1.0	1.0	1.2
40	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.3
41	3.3	1.0	3.3	1.0	1.3	1.2
42	3.5	1.0	2.6	1.0	0.9	0.9
43	3.5	1.0	2.6	1.0	0.9	1.0
44	3.5	1.0	2.6	1.0	1.0	1.1
45	3.3	1.0	2.8	1.0	0.9	1.1
46	3.3	1.0	3.3	1.0	1.0	1.0

[0147] 実験例 11 : HLA-A*02:01 遺伝子導入マウスおよび HLA-A*24:02 遺伝子導入マウスを用いた、in vivo での CTL 誘導能の評価
 実験例 10 において HLA-A*02:01 および / または HLA-A*

24 : 02に対するMFIが1.5以上のASB4由来ペプチドについて、そのCTL誘導能をHLA-A*02 : 01遺伝子導入マウスおよび／またはHLA-A*24 : 02遺伝子導入マウスを用いたin vivoのCTL誘導試験によって評価した。

HLA-A*02 : 01遺伝子導入マウス(C57BL/6CrHLA-A2.1DR1)は、マウスのMHCを欠損し、ヒトのMHCであるHLA-A*02 : 01およびHLA-DRB1*01 : 01を発現するマウスであり、当該マウスを用いることで、ヒトでCTLを誘導し得るペプチドの選択が可能である。また、HLA-A*24 : 02遺伝子導入マウスはヒトのMHCであるHLA-A*24 : 02を発現するマウスであり、当該マウスを用いることで、ヒトでCTLを誘導し得るペプチドの選択が可能である。そこで、各ペプチドがCTL誘導活性を有するか否かは、上記マウスへのペプチド投与によって投与ペプチドに反応可能なT細胞が誘導されるか否かで判断した。

[0148] 具体的には、次のとおり行った。まず、ペプチドをジメチルスルホキシドで80mg/mLに溶解したのち注射用水で希釈し、等量の不完全フロイントアジュバント(ISA51VG)と混合し、エマルション化させた。エマルション化させたペプチドは、マウスの尾根部皮内に250 μ g/箇所用量で2箇所投与した。1週間後に、マウスをCO₂ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。IFN γ 産生の測定には、IFN γ ELISPOTアッセイキット(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いた。脾細胞調製の前日に、ELISPOTプレートを抗IFN γ 抗体で処理し、当日に10%FBSを含むRPMI1640培地でブロッキングした。調製した脾細胞を0.25~1.0 \times 10⁶個/ウェルで、ブロッキングしたELISPOTプレートに播種した。投与したASB4由来ペプチドを、DMSOで40mg/mLに溶解し、さらに10%RPMI1640培地で20 μ g/mLに希釈した。希釈したペプチドを、50 μ L/ウェルでそのペプチドを投与した動物に由来する脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞

胞を、16～18時間、37℃、5%CO₂下で培養することでin vitroにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ELISPOTプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、KS-ELISPOTによって測定した。

[0149] IFN γ ELISPOTアッセイの結果は図11～38に示す。

本試験の結果、HLA-A*02:01遺伝子導入マウス由来の脾細胞において、ペプチド特異的なIFN γ 産生が確認されたことより、配列番号4～12および15～23で表されるASB4由来の各ペプチドがCTL誘導能を持つことがわかった。また、HLA-A*24:02遺伝子導入マウス由来の脾細胞において、ペプチド特異的なIFN γ 産生が確認されたことより、配列番号4～9、13、14、25、26および28～30で表されるASB4由来のペプチドがCTL誘導能を持つことがわかった。したがって、配列番号4～9で表されるASB4由来の各ペプチドが、HLA-A02型およびHLA-A24型の両方の対象においてCTL誘導能を有することが示された。

[0150] 実験例12：ヒト末梢血単核細胞を用いたCTL誘導能の評価

実験例13において、HLA-A02型およびHLA-A24型の両方の対象においてCTL誘導能を有することが確認された配列番号4～9で表される6種類のペプチドについて、当該ペプチドの刺激によって健常人由来末梢血単核細胞よりペプチド特異的T細胞が誘導されるか評価した。

具体的には、HLA-A*02:01陽性あるいはHLA-A*24:02陽性の健常人由来の末梢血単核細胞 (Cellular Technology Limited社製) を10%ヒト由来血清を含有するAIM-V培地でサスペンドしたのち、96穴U底プレートの各ウェルに約 1×10^5 個を播種し、37℃、5%CO₂下で培養した。このとき、ヒトIL-2を100U/mLおよびペプチドを20 μ g/mLで添加した。3日あるいは4日毎に培地を交換し、約2週間後にIFN γ ELISPOTアッセイを実施した。アッセイの前日に、ELISPOTプレートを抗IFN γ 抗体で処理し、当日に10%牛胎児由来

血清を含むRPMI 1640培地で約2時間室温にてブロッキングした。培養中のヒト末梢血単核細胞を10%ヒト由来血清を含有するAIM-V培地で洗浄し、ブロッキングしたELISPOTプレートの各ウェルに播種した。37℃、5%CO₂下で培養して16~18時間後に上清を除き、ELISPOTプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、Cellular Technology Limited社製ELISPOTアナライザーで測定した。

HLA-A*02:01陽性PBMCを利用して配列番号4、5、6、8および9について評価した結果を図39、40、41、42および43に、HLA-A*24:02陽性PBMCを利用して配列番号5および8について評価した結果を図44および45に示す。縦軸は各ウェルで認められたスポット数を、横軸は陽性のウェル番号を示す。また、黒棒はペプチド刺激条件下で検出されたスポットの数を、白棒はペプチド非パルス条件下で検出されたスポット（コントロール）の数を示す。即ち、黒棒と白棒の差がペプチド特異的なスポットを示している。

本試験の結果、配列番号4、5、6、8および9で表されるペプチドは、HLA-A*02:01陽性あるいはHLA-A*24:02陽性の健常人由来の末梢血単核細胞より、それらペプチド特異的CTLを誘導することが判明した。

また、配列番号5および8で表されるASB4由来の各ペプチドが、HLA-A*02型およびHLA-A*24型の両方の対象においてCTL誘導能を有することが示された。

産業上の利用可能性

[0151] 本発明は、がん幹細胞に実際に抗原提示されているASB4由来ナチュラルペプチドを同定することで、ペプチドワクチンにより誘導されたCTLが確実に癌細胞を殺傷し、効果の高い癌ワクチンの開発に寄与するものである。また同定されたがん幹細胞特異的ナチュラルペプチドから、がん幹細胞において特異的にASB4が発現していることが特定できたことから、ASB

4 をマーカーとしてがん幹細胞を特定することが可能となる。さらに同遺伝子由来のナチュラル抗原ペプチドは、少量でも大きな効果を有するがんの予防および／または治療剤として有用である。また、本発明により、CTLの誘導活性を有するASB4由来の腫瘍抗原ペプチド等が提供される。本発明のペプチドは、がんの予防および／または治療剤として有用である。

請求の範囲

[請求項1]

$Y_0 - X_0 - Z_0$

で表される、がん幹細胞特異的な抗原ペプチドであって、

X_0 が、以下の(1)～(4)：

(1) A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチド；

(2) (1)の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド；

(3) A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチド；または

(4) (3)の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチド；

のいずれかであり、

Y_0 および Z_0 が、互いに独立して0個から数個のアミノ酸からなるペプチド

である、前記抗原ペプチド。

[請求項2]

X_0 が、以下の(1')～(4')：

(1') A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであり、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチド；

(2') (1')の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されているペプチド；

(3') A S B 4 タンパク質の部分ペプチドであって、該タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～11アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであり、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであるペプチド；
または

(4') (3')の部分ペプチドにおいて、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているペプチド；

のいずれかであり、

Y_0 および Z_0 が、互いに独立して、0個もしくは1個のアミノ酸であるか；または、0～3個のアミノ酸からなるペプチドであって、ここで $Y_0-X_0-Z_0$ が全体で9～14アミノ酸長であるA S B 4 タンパク質の部分ペプチドもしくはその X_0 ホモログとなる；
であることを特徴とする、請求項1に記載の抗原ペプチド。

[請求項3]

X_0 が、配列番号3～7、9～19、21～28、30～46のい

ずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1または2に記載の抗原ペプチド。

[請求項4] X_0 が、配列番号3～7、9～19、21～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなり、 Y_0 および Z_0 が存在しない、請求項1または2に記載の抗原ペプチド。

[請求項5] X_0 が、配列番号3～7、9～11、13～19、21～23および26～28、30～46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、N末端から第2番目のアミノ酸がメチオニン、ロイシンもしくはイソロイシンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、バリンもしくはイソロイシンに置換されているアミノ酸配列からなり、 Y_0 および Z_0 が存在しない、請求項1または2に記載の抗原ペプチド。

[請求項6] X_0 が、配列番号3、5～7、9～14、16、19、21～26、28、30～32、34～37および39～46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、N末端から第2番目のアミノ酸がメチオニンもしくはチロシンに置換されており、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列からなり、 Y_0 および Z_0 が存在しない、請求項1または2に記載の抗原ペプチド。

[請求項7] X_0 が、請求項4～6のいずれか一項に記載の X_0 であり、 Y_0 または Z_0 のいずれか一方が1個のアミノ酸であり、もう一方が存在しない、請求項1または2に記載の抗原ペプチド。

[請求項8] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4、6、7、10、14、15、17～19、21～23、26、28、31、33、36、39、41、42、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原ペプチド。

[請求項9] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号9、21、25、

30、32、35および37のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原ペプチド。

[請求項10] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4～12および15～23のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原ペプチド。

[請求項11] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号3～9、13、14、25、26および28～30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原ペプチド。

[請求項12] $Y_0-X_0-Z_0$ で表されるペプチドが、配列番号4～9のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原ペプチド。

[請求項13] 複数のエピトープペプチドが連結されたポリエピトープペプチドであって、該エピトープペプチドとして、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗原ペプチドを少なくとも1つ含む、前記ポリエピトープペプチド。

[請求項14] A S B 4 遺伝子の発現産物を検出するためのA S B 4 検出剤を含む、がん幹細胞検出剤。

[請求項15] 心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸および血液からなる群から選択される1または2以上の生体試料に由来する細胞を含む細胞集団においてがん幹細胞を検出するための、請求項14に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項16] A S B 4 遺伝子の発現産物が、m R N A および／または内在性ポリペプチドである、請求項14または15に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項17] A S B 4 遺伝子の発現産物がm R N A であり、R T - P C R 法により検出することを含む、請求項14～16のいずれか一項に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項18] A S B 4 遺伝子の発現産物が内在性ポリペプチドであり、該内在性ポリペプチドと特異的に反応するA S B 4 検出剤により検出すること

を含む、請求項14～16のいずれか一項に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項19] A S B 4 検出剤が、抗体である、請求項18に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項20] A S B 4 検出剤が、A S B 4 遺伝子の発現産物である m R N A を検出するための前記遺伝子に相補的な塩基配列を有するプローブおよび／またはプライマーである、請求項14～17のいずれか一項に記載のがん幹細胞検出剤。

[請求項21] 請求項14～20のいずれか一項に記載のがん幹細胞検出剤を使用して、検査対象においてがん幹細胞を検出する方法。

[請求項22] (i) がん治療薬の候補化合物を、対象に投与する前に、該対象における A S B 4 遺伝子の発現産物の検出量 A を測定する工程、

(i i) 前記候補化合物を前記対象細胞集団に投与した後に、該対象における A S B 4 遺伝子の発現産物の検出量 B を測定する工程、および

(i i i) 前記検出量 A と B とを比較し、該検出量 A が B より有意に大きい場合に、前記候補化合物を、がん幹細胞を標的とすることを特徴とするがん治療薬候補であると判定する工程、を含む、がん治療薬のスクリーニング方法。

[請求項23] 請求項1～12のいずれか一項に記載の抗原ペプチドまたは請求項12に記載のポリエピトープペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチド。

[請求項24] 請求項23に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[請求項25] 請求項24に記載の発現ベクターを含む、遺伝子導入用組成物。

[請求項26] 以下の (a) ～ (d) :

(a) 請求項1～12のいずれか一項に記載の抗原ペプチドまたは請求項12に記載のポリエピトープペプチド、

(b) 請求項23に記載のポリヌクレオチド、

(c) 請求項 2 4 に記載の発現ベクター、

(d) A S B 4 タンパク質、A S B 4 タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターのいずれかを有効成分として含む、医薬組成物。

[請求項27] 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチド、および／または、請求項 1 3 に記載のポリエピトープペプチドを有効成分として含む、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

[請求項28] アジュバントをさらに含む、請求項 2 6 または 2 7 に記載の医薬組成物。

[請求項29] がんの予防および／または治療剤である、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項30] がんの予防および／または治療用ワクチンである、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項31] 以下の (a) ~ (d) :

(a) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドまたは請求項 1 2 に記載のポリエピトープペプチド、

(b) 請求項 2 3 に記載のポリヌクレオチド、

(c) 請求項 2 4 に記載の発現ベクター、

(d) A S B 4 タンパク質、A S B 4 タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターのいずれかを有効成分として含有する、細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。

[請求項32] (A) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドまたは請求項 1 2 に記載のポリエピトープペプチド、あるいは、

(B) 前記 (A) のペプチドおよび／またはポリエピトープペプチドの少なくとも 1 つをコードするポリヌクレオチドと、抗原提示能を有する細胞とを、in vitro で接触させることを含む、抗原提示細胞の製造方法。

[請求項33] (A) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドまたは

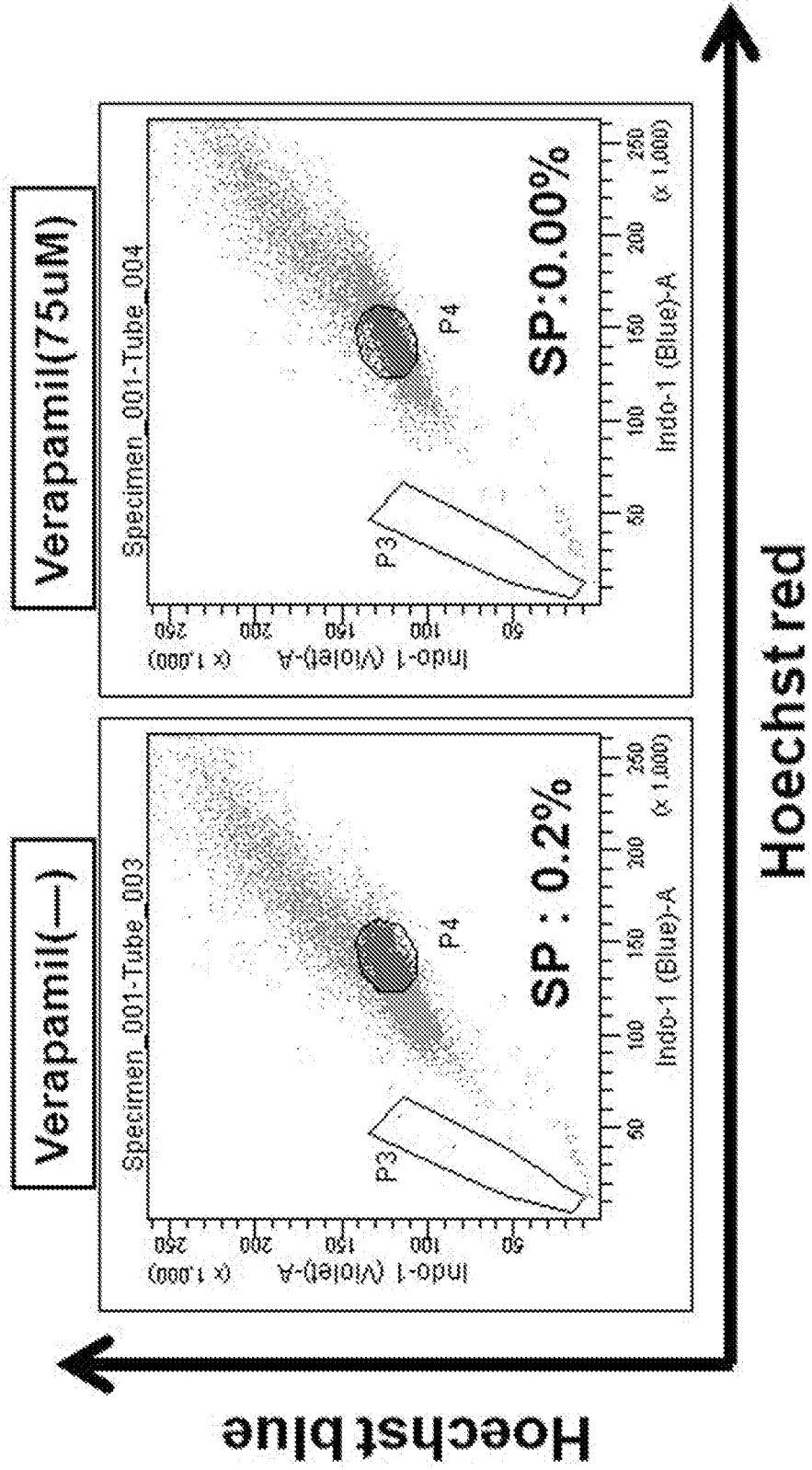
請求項 1 2 に記載のポリエピトープペプチド、あるいは、

(B) 前記 (A) の抗原ペプチドおよび／またはポリエピトープペプチドの少なくとも 1 つをコードするポリヌクレオチドと、末梢血リンパ球とを、*in vitro* で接触させることを含む、細胞障害性 T 細胞の誘導方法。

- [請求項34] 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドと H L A とを含む、H L A マルチマー。
- [請求項35] 請求項 3 4 に記載の H L A マルチマーを含む、診断薬。
- [請求項36] 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドを認識する抗体。
- [請求項37] 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドと H L A との複合体を認識する、T 細胞受容体様抗体。
- [請求項38] 請求項 3 6 に記載の抗体および／または請求項 3 7 に記載の T 細胞受容体様抗体を含有する腫瘍検出剤。
- [請求項39] 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドと H L A との複合体を認識する、キメラ抗原受容体。
- [請求項40] 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原ペプチドと H L A との複合体を認識する T 細胞受容体を含む、人工 C T L。
- [請求項41] 請求項 2 6 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の医薬組成物を用いたがんの処置方法が有効な治療対象患者を選択するための診断薬であって、請求項 1 4 ～ 2 0 のいずれか一項に記載のがん幹細胞検出剤、請求項 3 4 に記載の H L A マルチマー、請求項 3 6 に記載の抗体および／または請求項 3 7 に記載の T 細胞受容体様抗体を含む、前記診断薬。
- [請求項42] 配列番号 3 ～ 3 0 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、がん幹細胞特異的な抗原ペプチド。

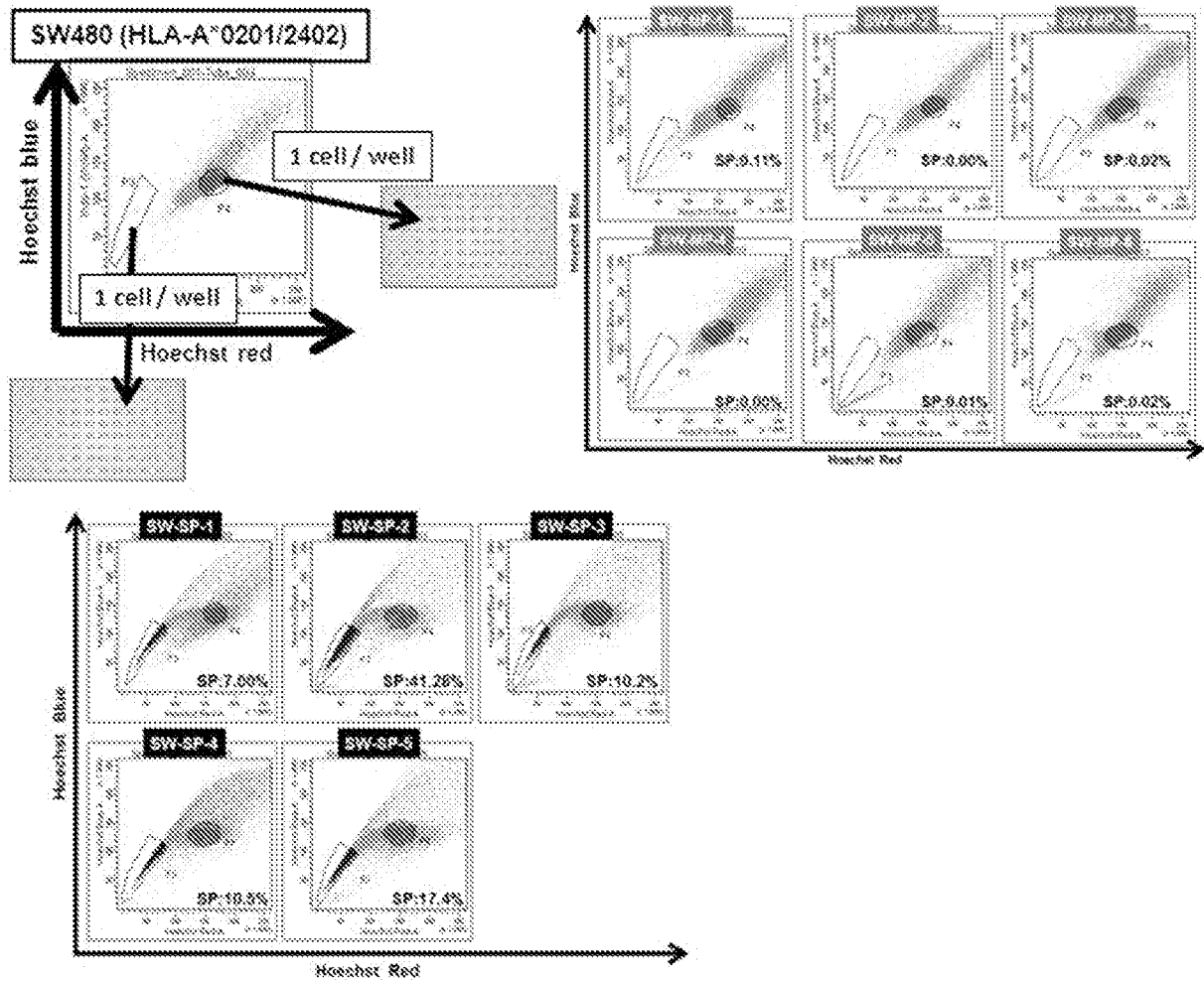
[図1]

SW480のヘキスト33342染色



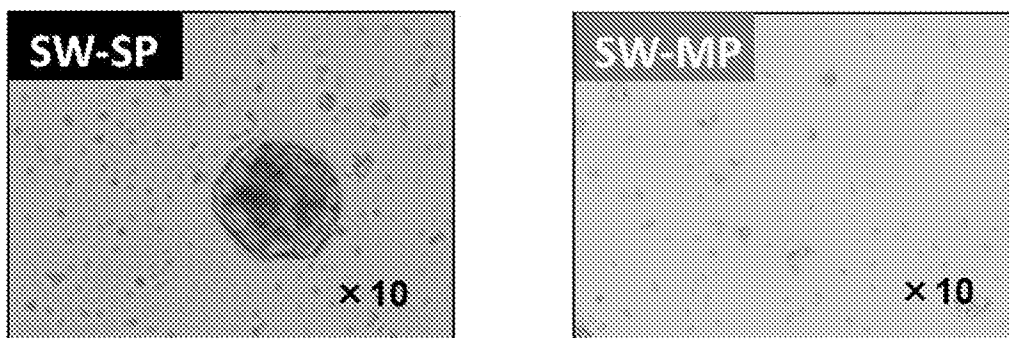
[図2-1]

SW480-SPと-MP細胞のクローニング



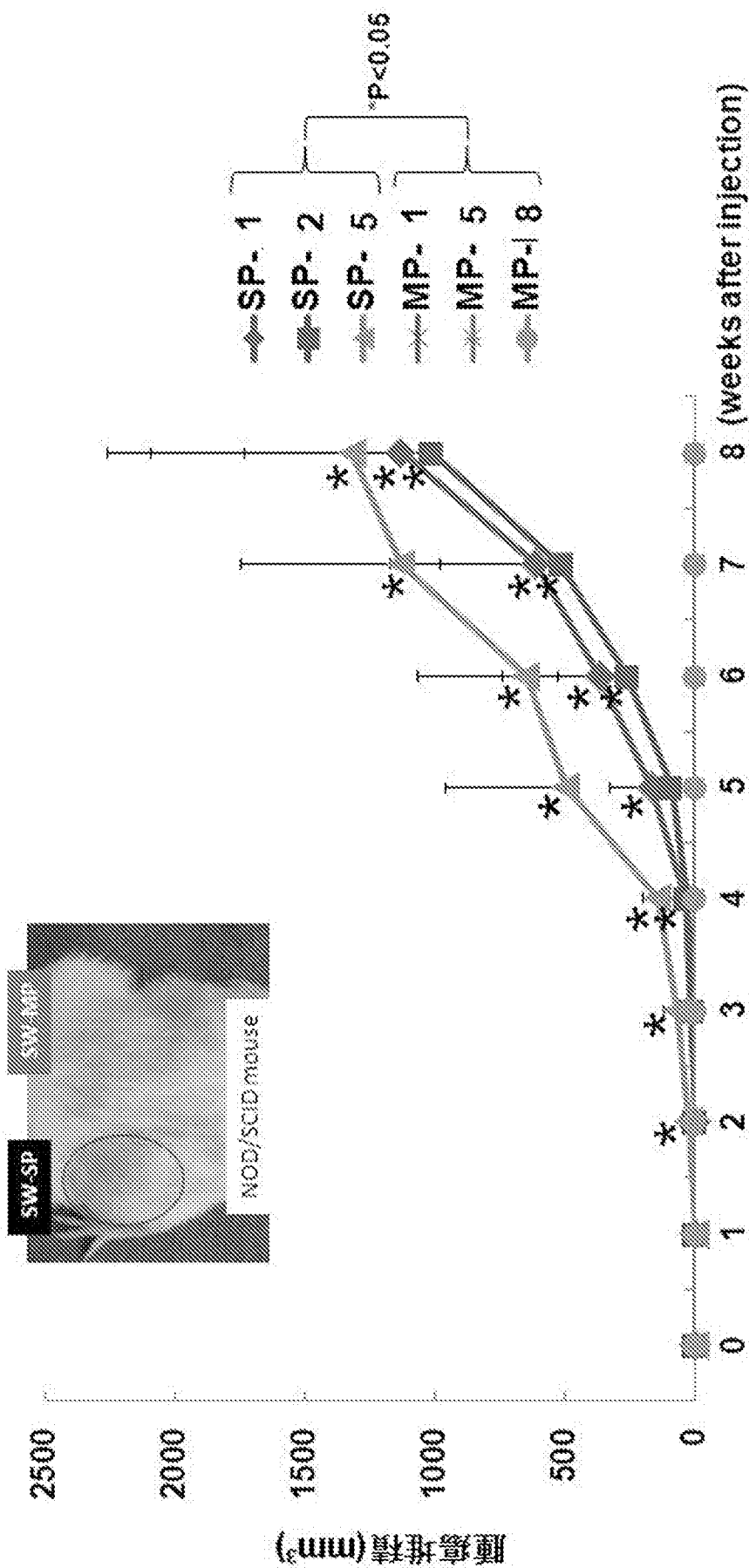
[図2-2]

SW480-SPと-MP細胞のスフェア形成能



[図3]

SW480-SPクローン細胞株の腫瘍形成能

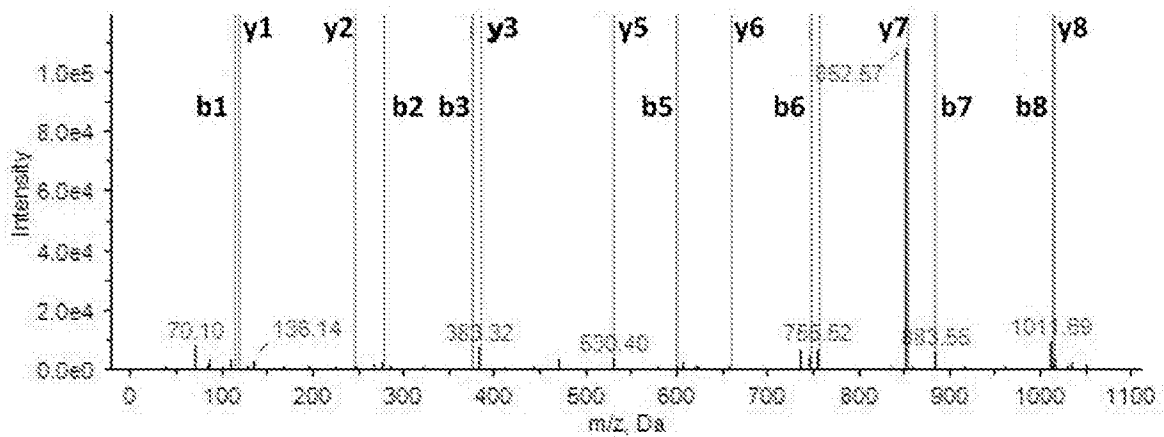


[図4]

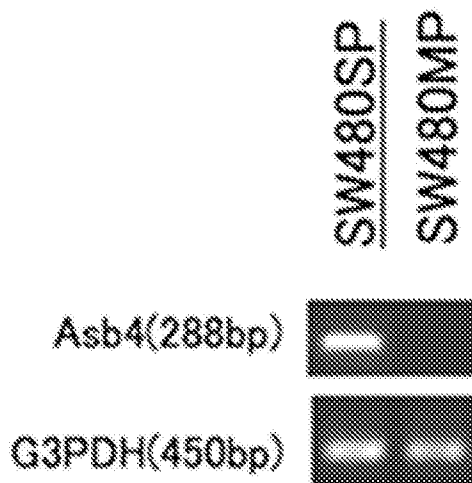
ASB4

MDGTTAPVTKSGAAKLVKRNFLKALKSNDGKLIKAILIQRQIDVDTVFEVEDENMVLASYKQGYWLPSTYK
 LKSSWATGLHLSVLFVGHVECLLVLLDHNATINCRPNQKTPLVACEMANVDCVKILCDRGAKLNCYSL5G
 HTALHFCTTPSSILCAKQLVWRGANVNMKTNNQDEETPLHTAAHFGLSELVAFVVEHGAIVDSVNAHMET
 PLAIAAYWALRFKEQEYSTEHHLVCRMLLDYKAEVNARDDDFKSPLHKAAWNCDHVLMMHMMLEAGAEANL
 MDINGCAAIQYVLKVTSVRPAAQPEICYQLLLNHGAAR*YPPQFHK*VIQACHSCPKAIEVVVNAYEHIRW
 NTKWRRRAIPDDLEKYWDFYHSLFTVCCNSPRTLMLHSRCAIRRTLHNRCHRAIPLLSPLSLKKYLLLE
 PEGHY

HLA-A24 naturally processed peptide, IV9

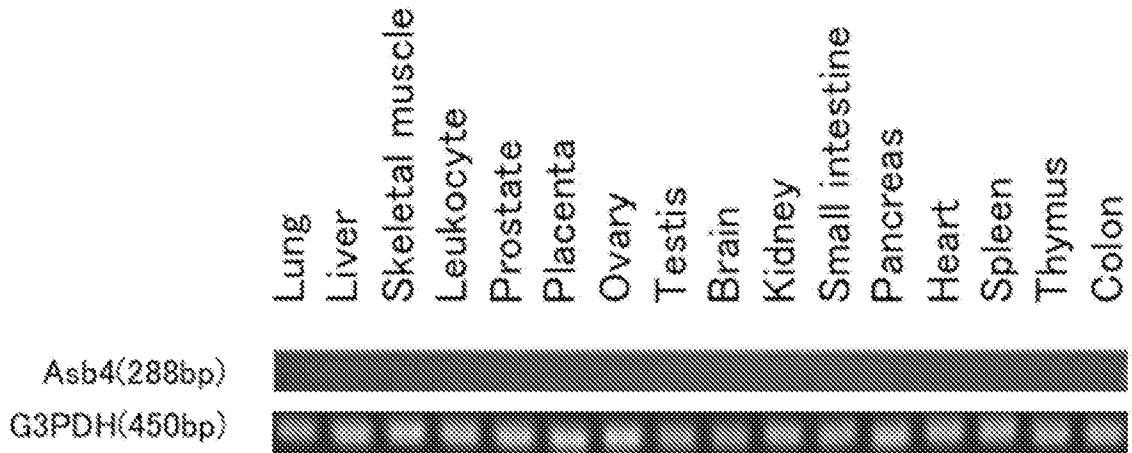


[図5]



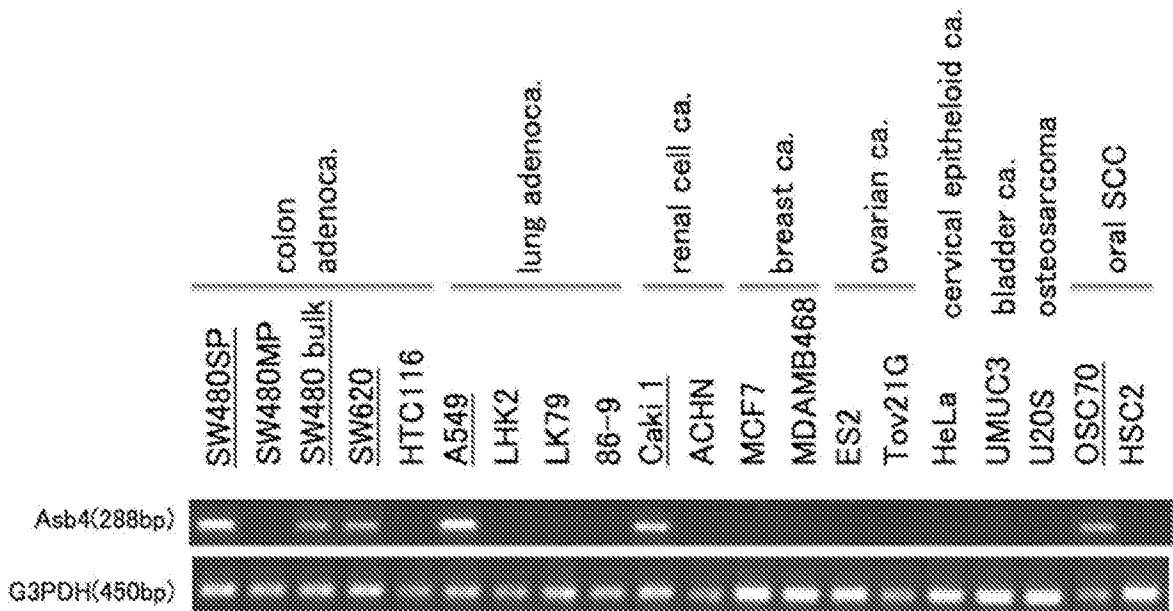
[図6]

ヒト成人正常組織における ASB4 遺伝子発現

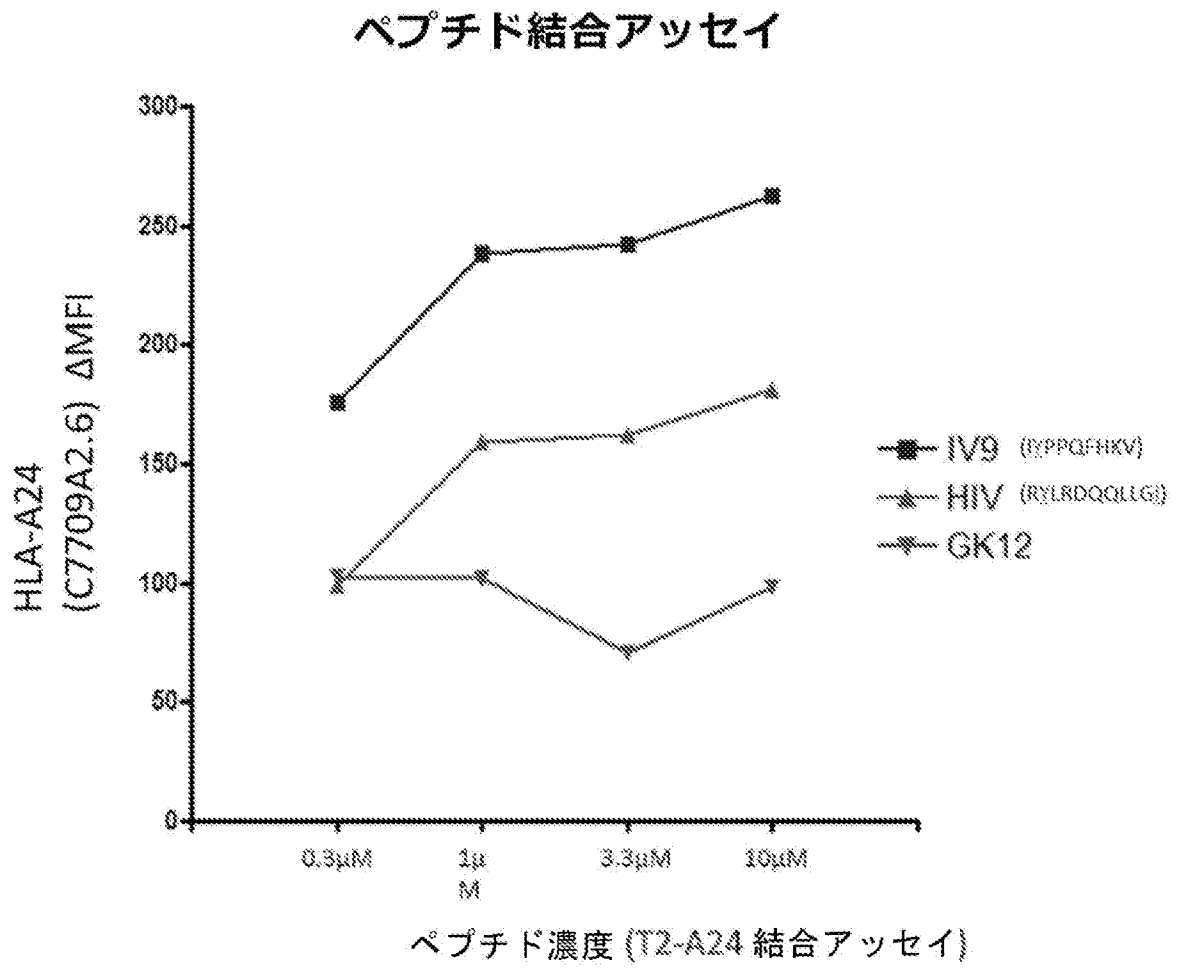


[図7]

がん細胞株における ASB4 遺伝子発現



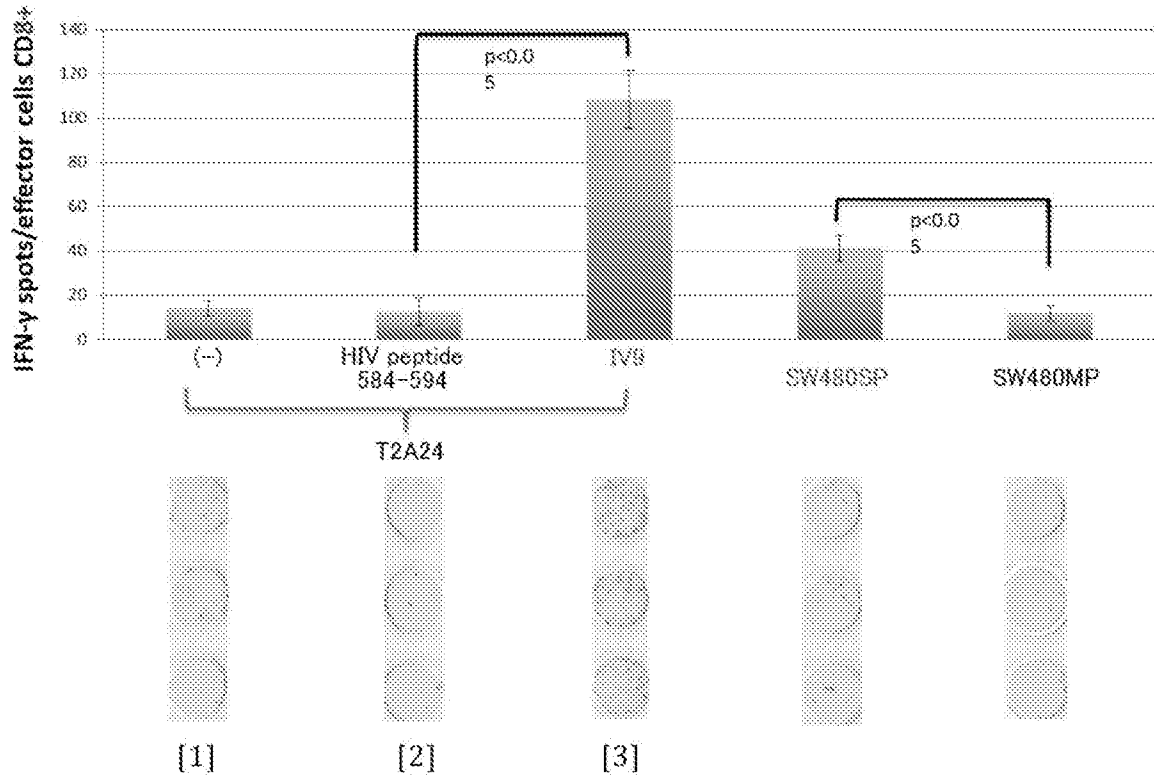
[図8]



[図9]

合成ペプチドによる CD8⁺細胞刺激

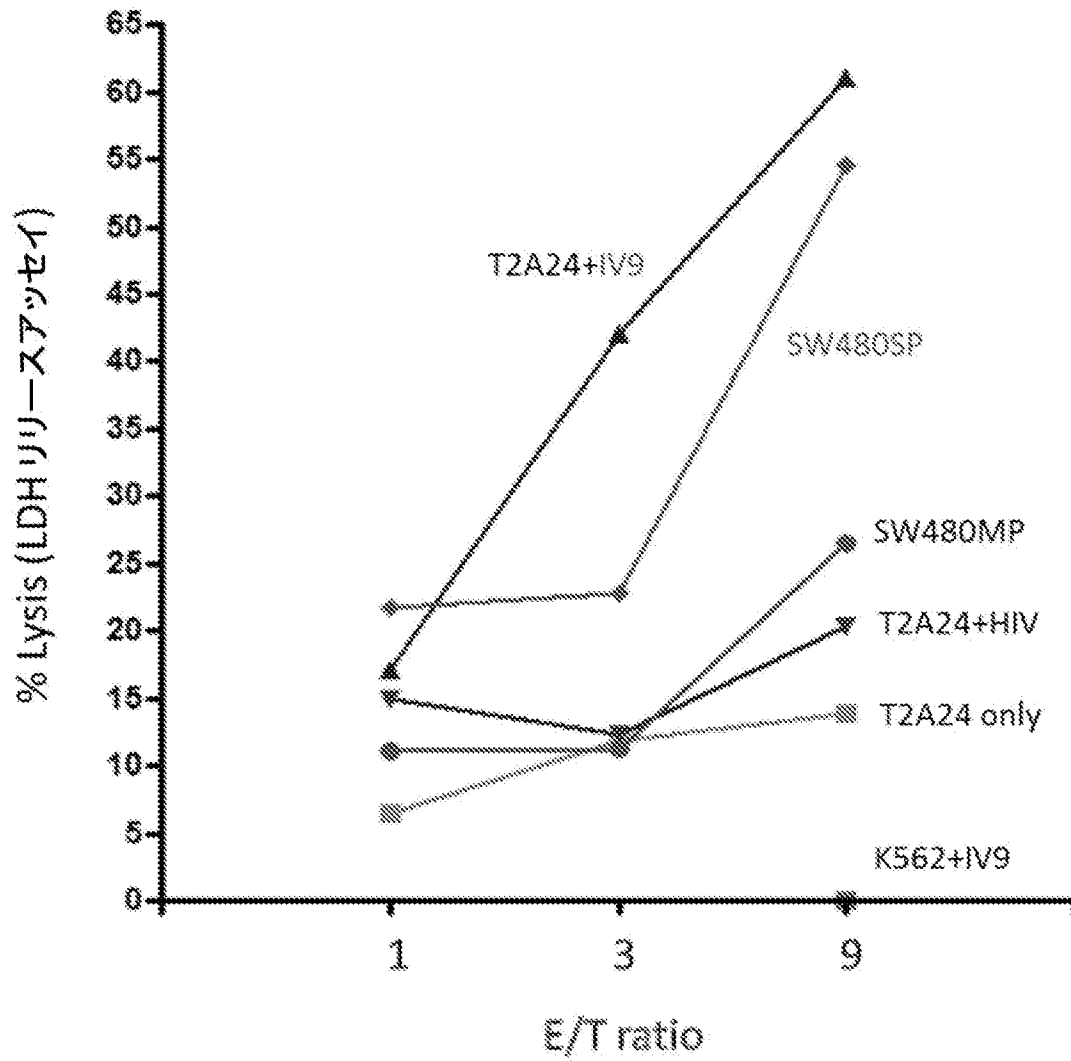
IV9で刺激した健常ドナーPBMC



IFN-γ ELISPOT アッセイ

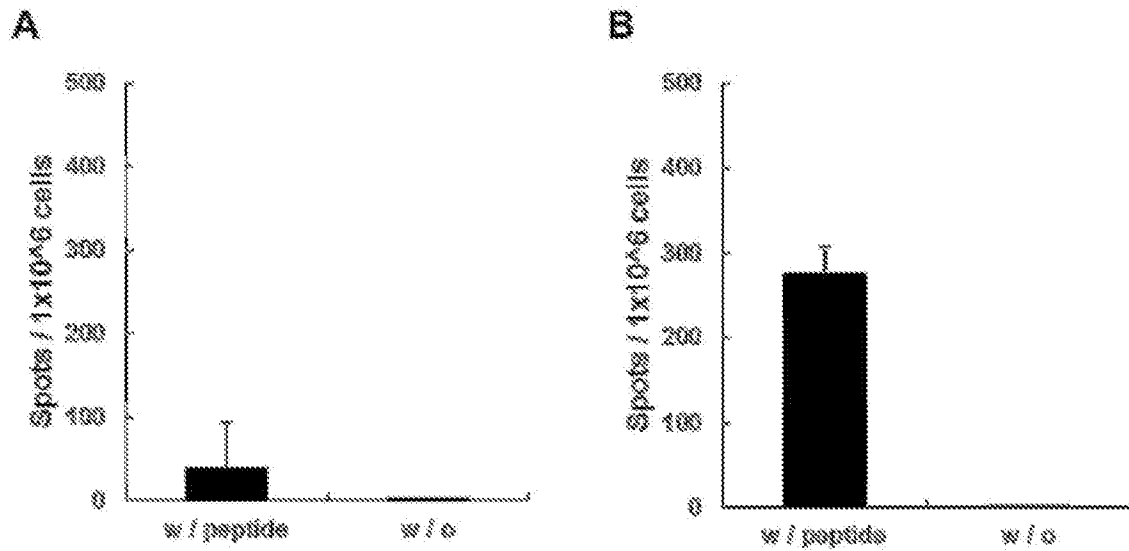
[図10]

ペプチドでパルスした細胞に対する CTL の細胞傷害活性



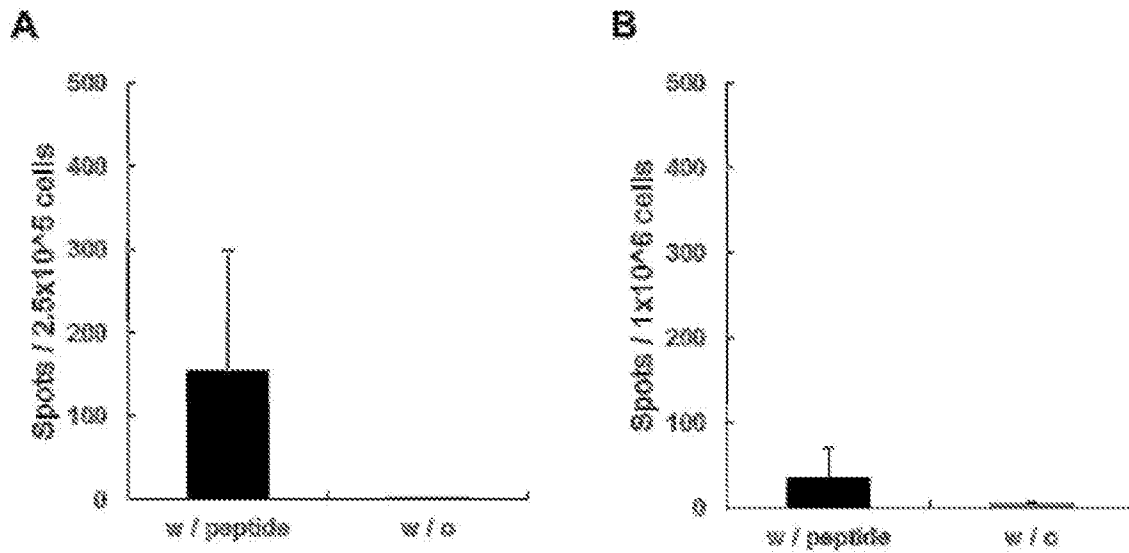
[図11]

ペプチド As80_9 (配列番号 4) の CTL 誘導能力



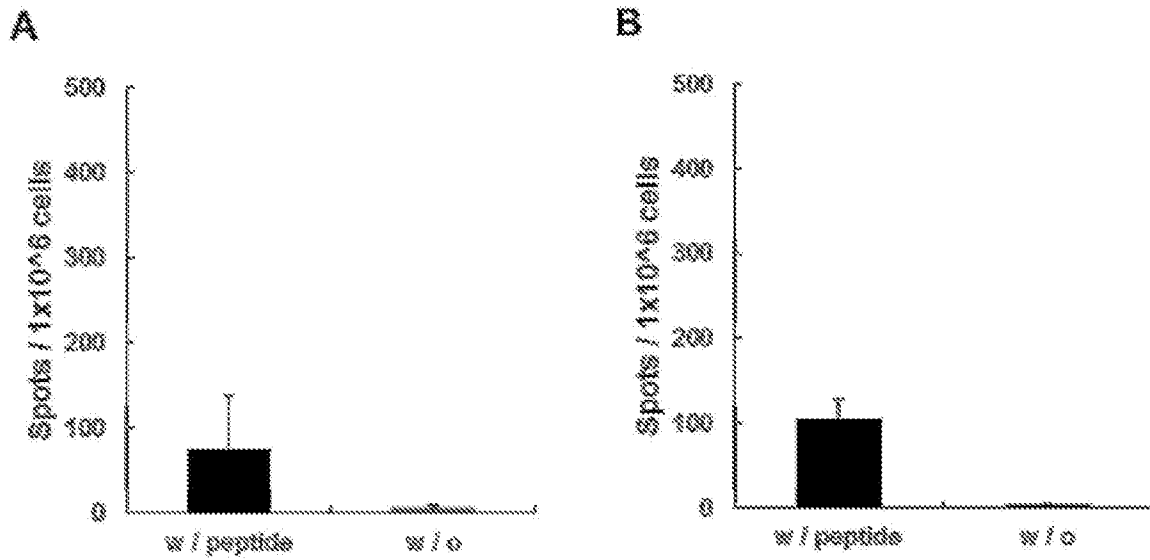
[図12]

ペプチド As82_10 (配列番号 5) の CTL 誘導能力



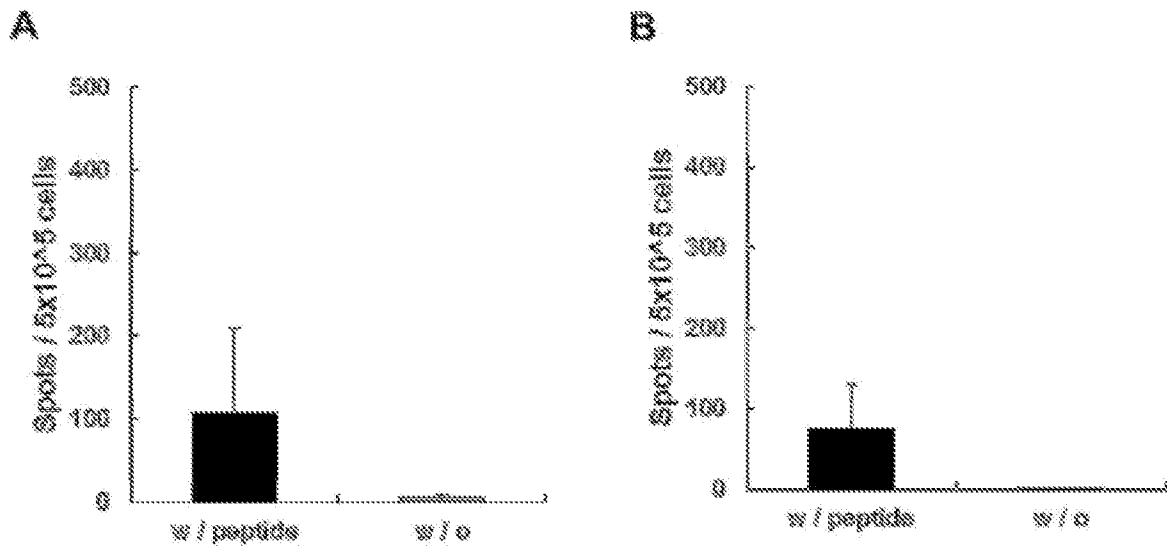
[図13]

ペプチド As124_10 (配列番号 6) の CTL 誘導能力



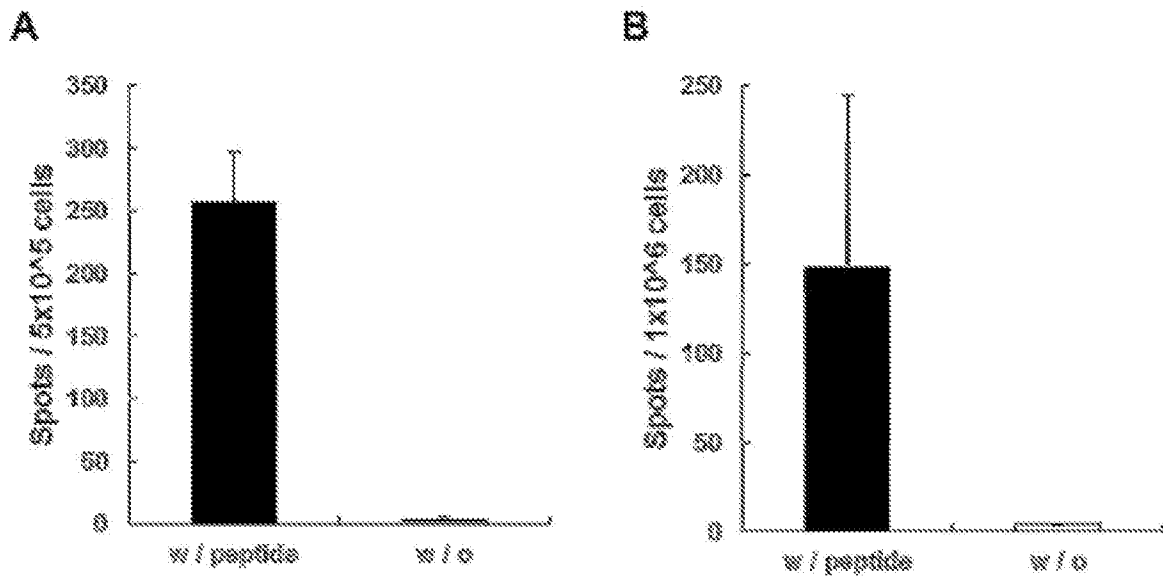
[図14]

ペプチド As125_9 (配列番号 7) の CTL 誘導能力



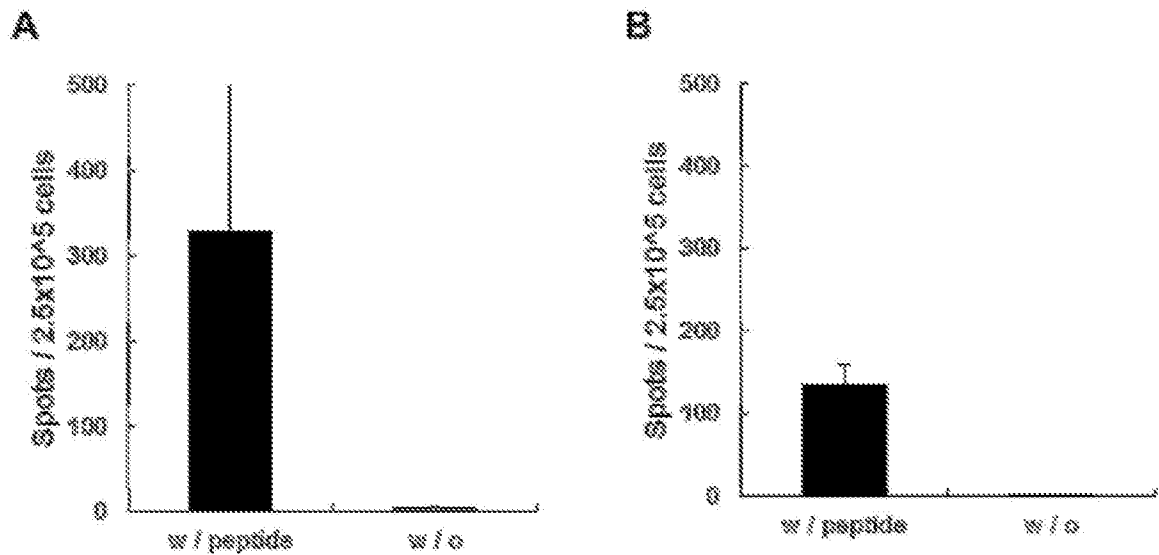
[図15]

ペプチド As184_12 (配列番号 8) の CTL 誘導能力



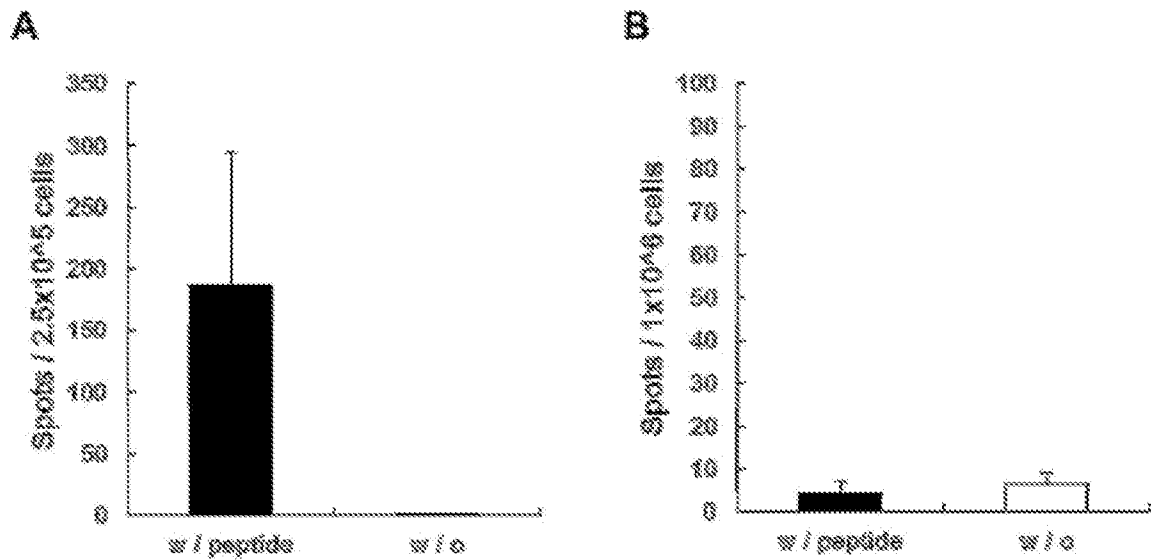
[図16]

ペプチド As135_10 (配列番号 9) の CTL 誘導能力



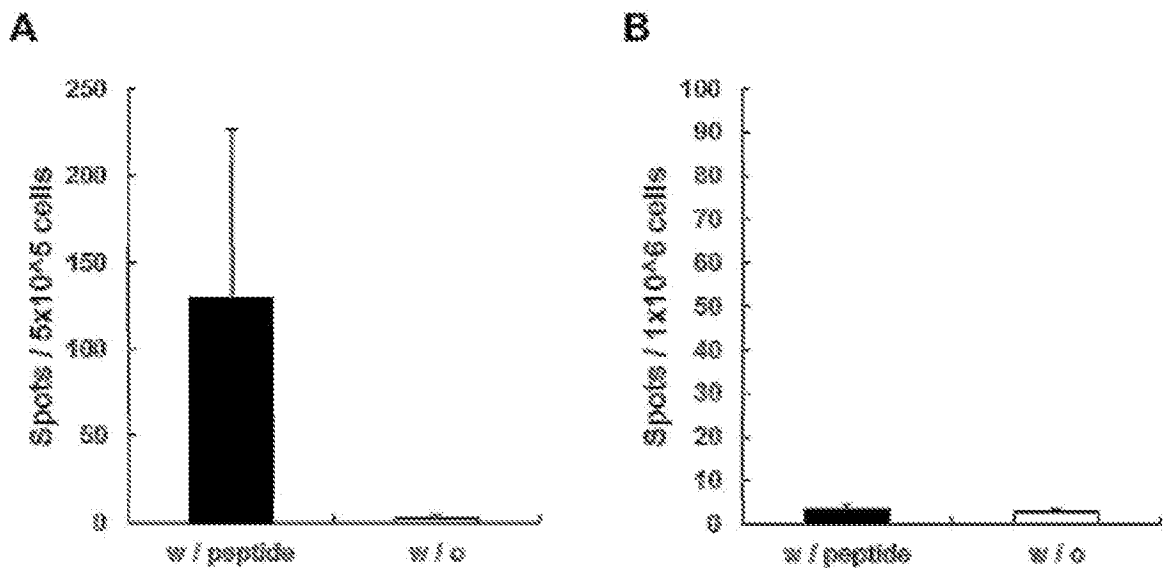
[図17]

ペプチド As83_10 (配列番号 10) の CTL 誘導能力



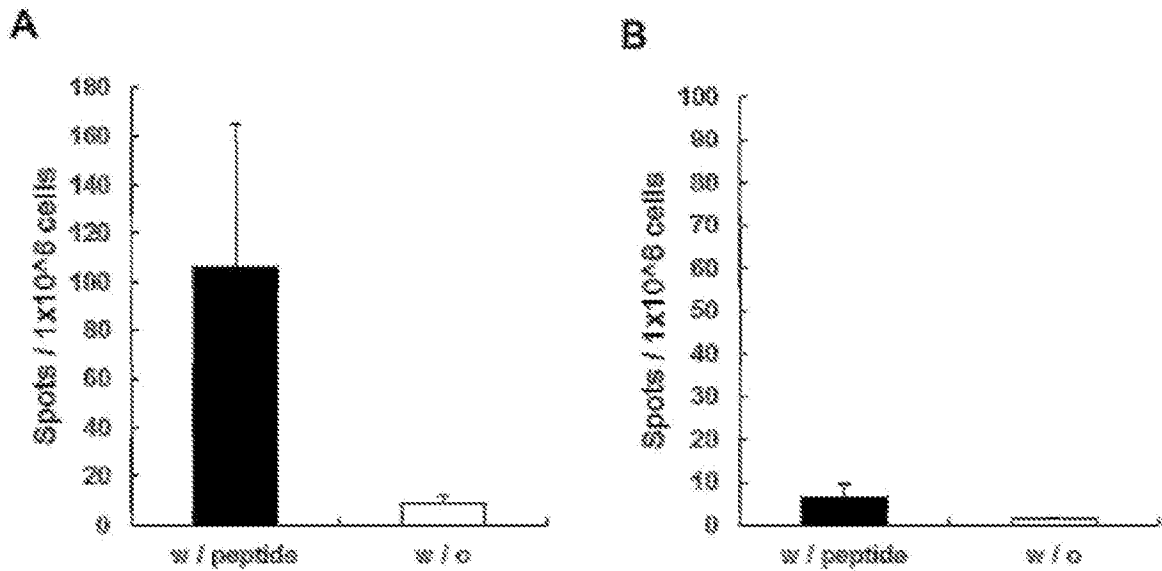
[図18]

ペプチド As87_9 (配列番号 11) の CTL 誘導能力



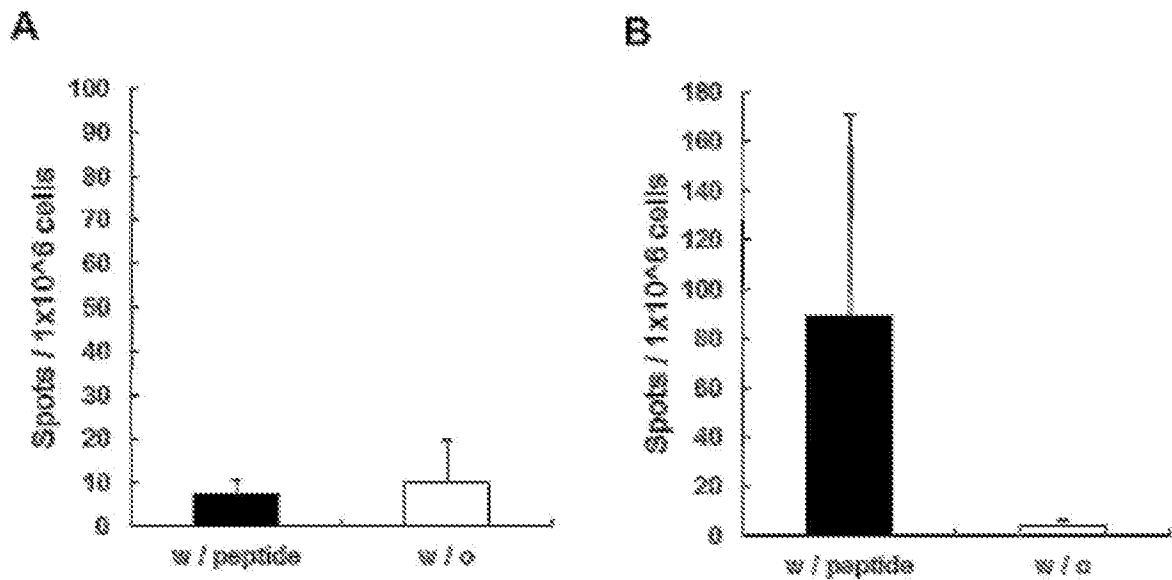
[図19]

ペプチド As307_10 (配列番号 12) の CTL 誘導能力



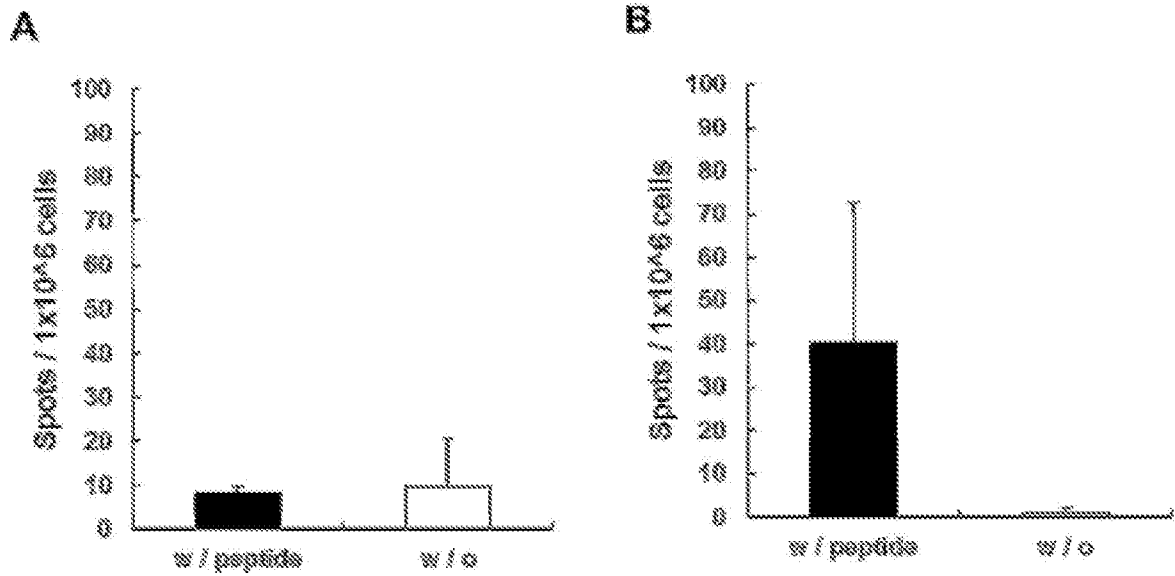
[図20]

ペプチド As301_11 (配列番号 13) の CTL 誘導能力



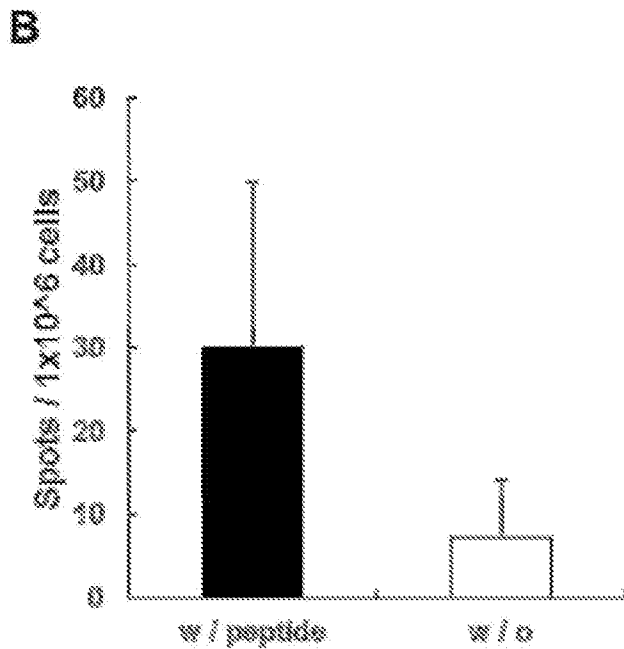
[図21]

ペプチド As405_9 (配列番号 14) の CTL 誘導能力

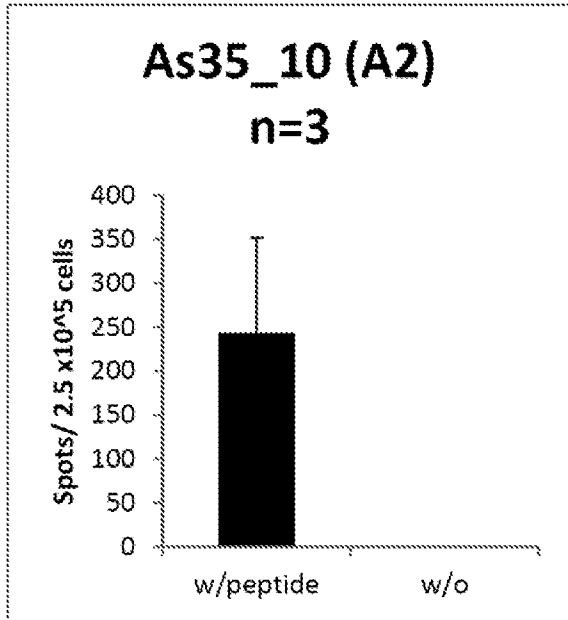


[図22]

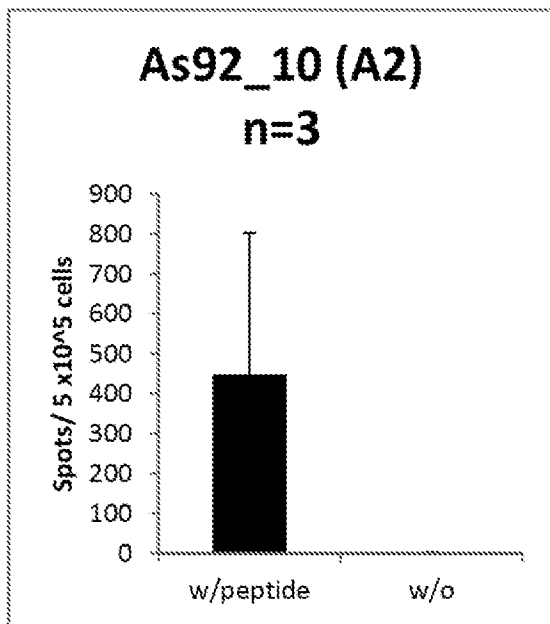
ペプチド IV9 (配列番号 3) の CTL 誘導能力



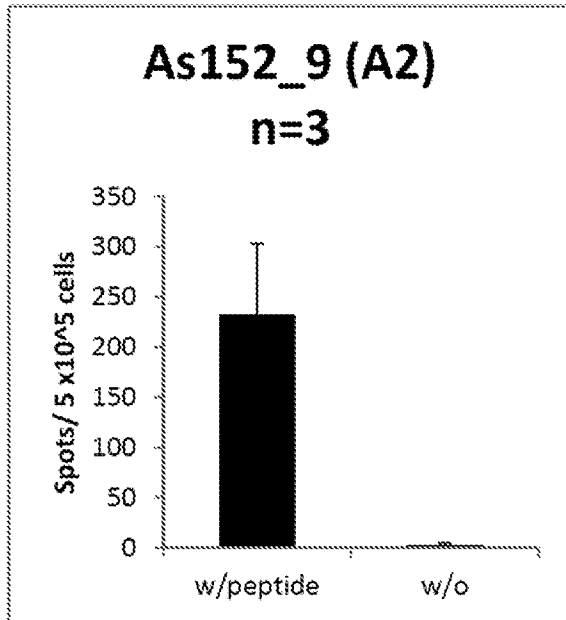
[23]



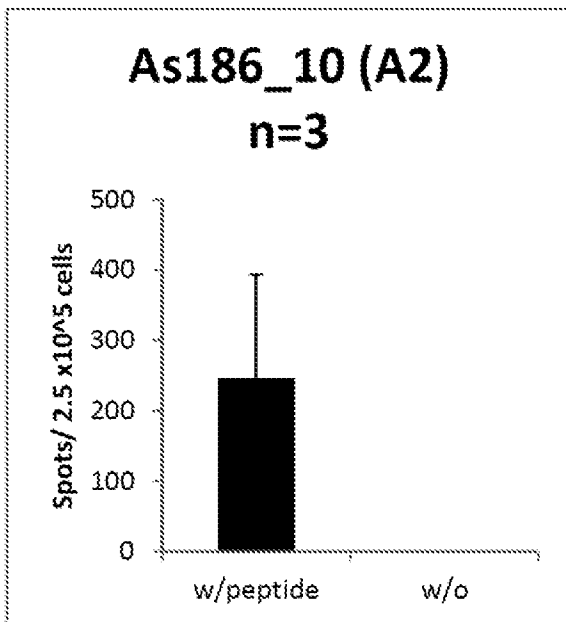
[24]



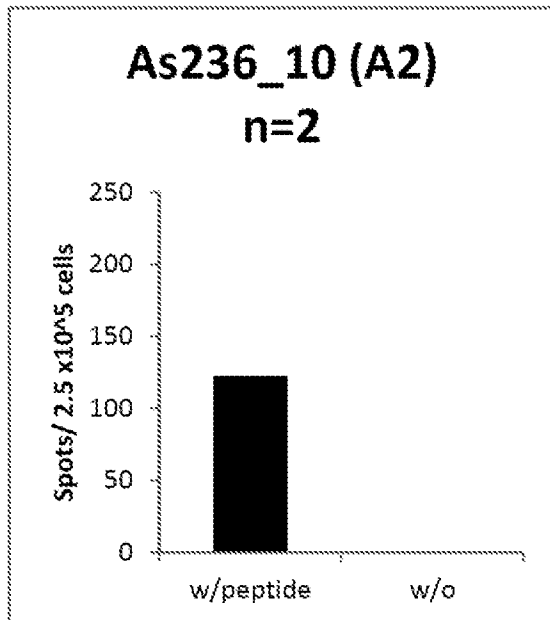
[25]



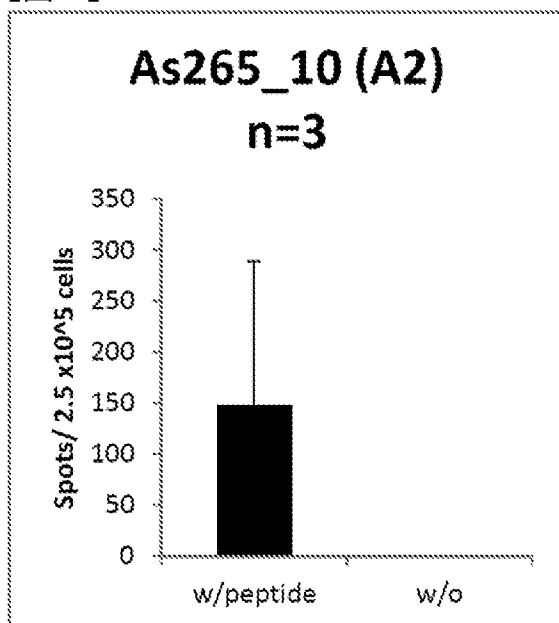
[26]



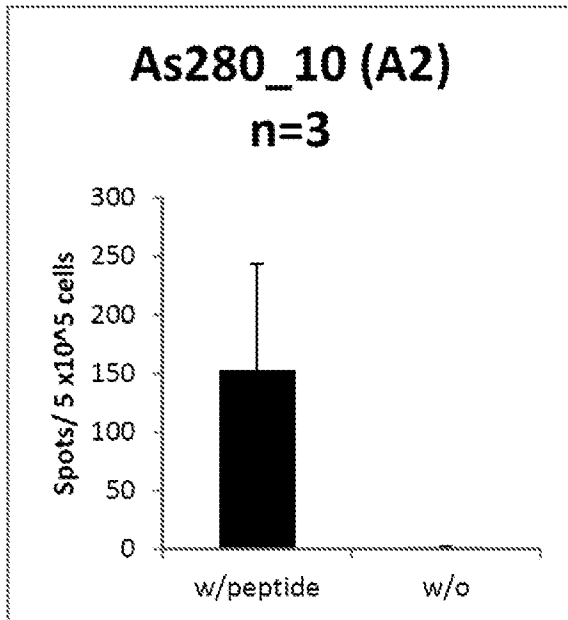
[27]



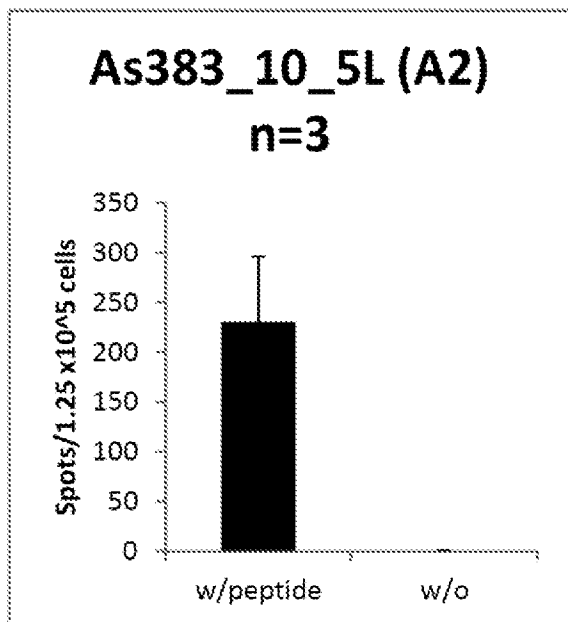
[28]



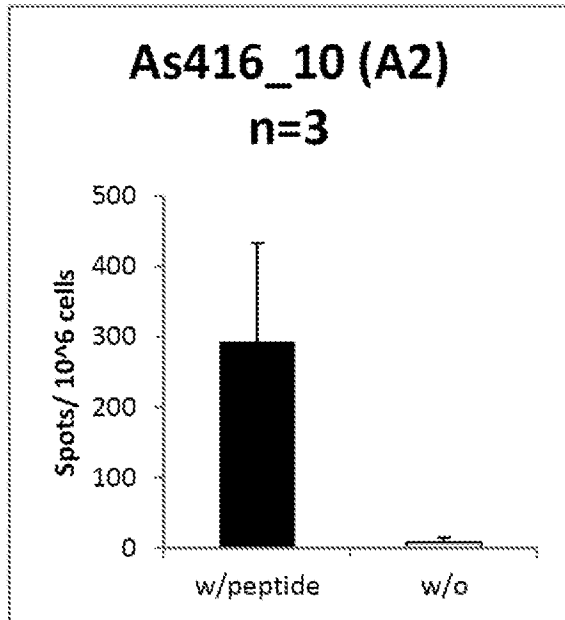
[29]



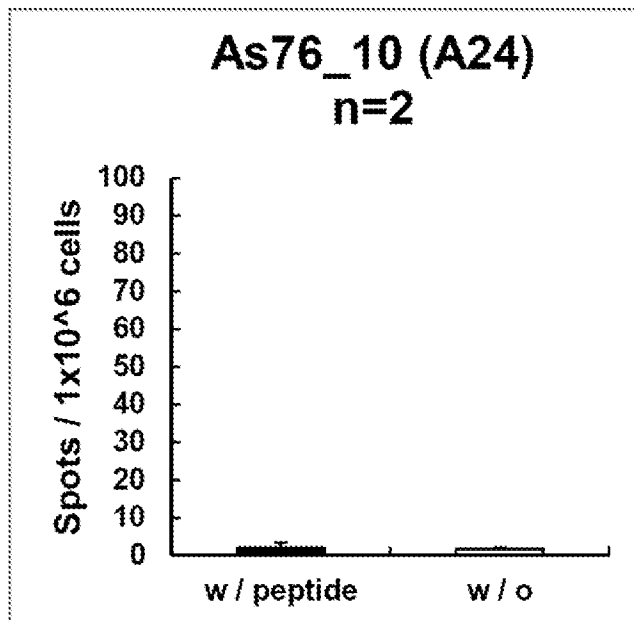
[30]



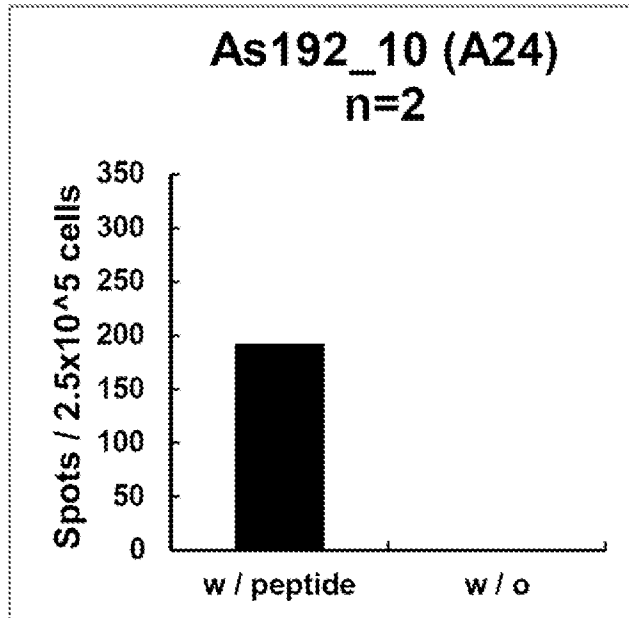
[31]



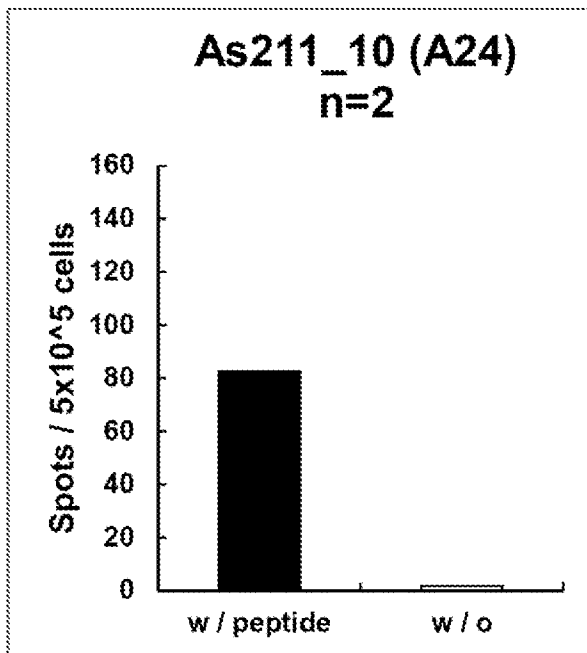
[32]



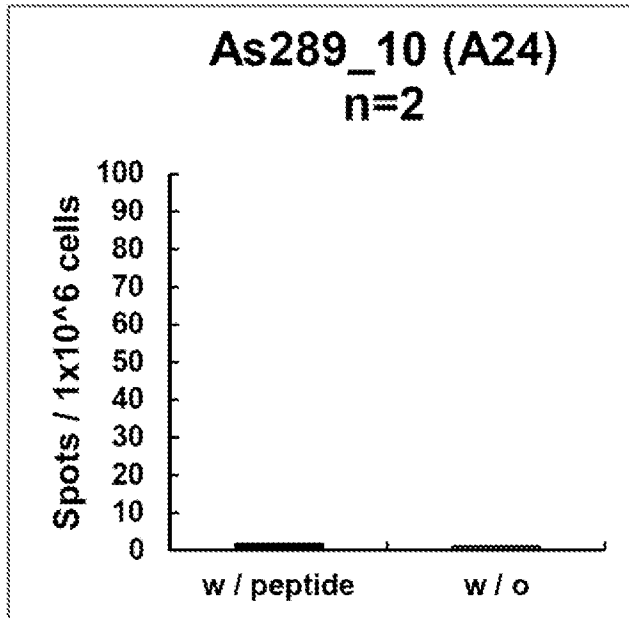
[33]



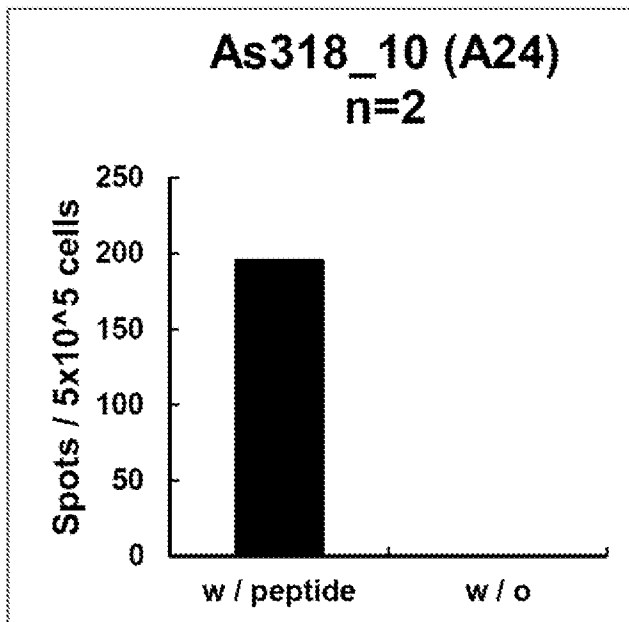
[34]



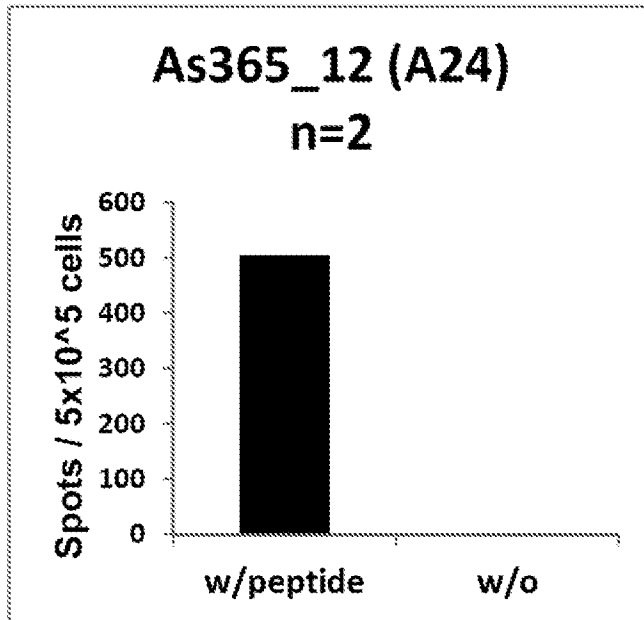
[35]



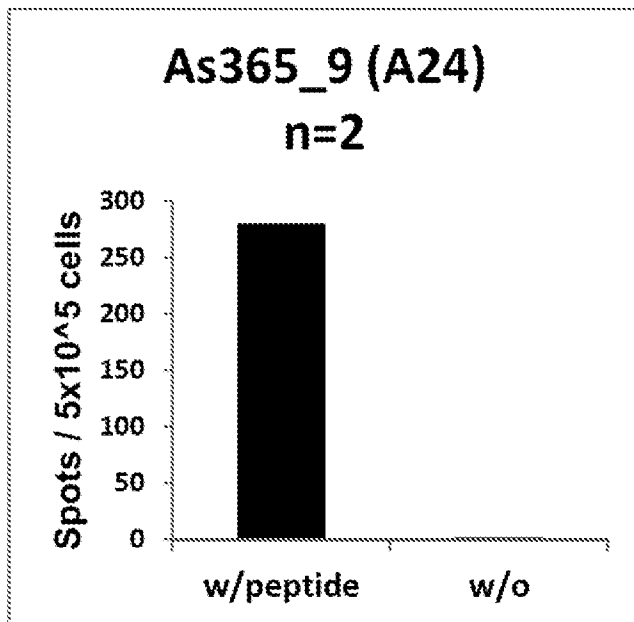
[36]

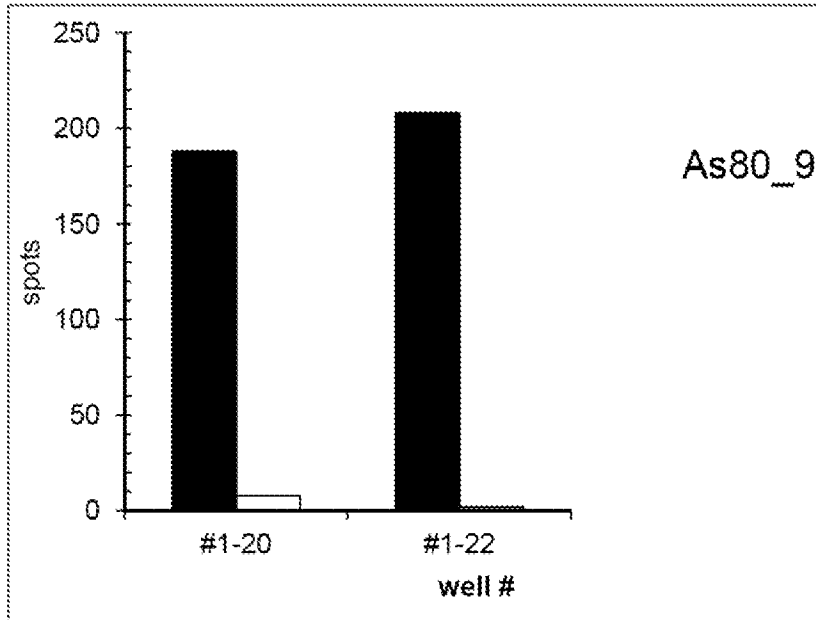
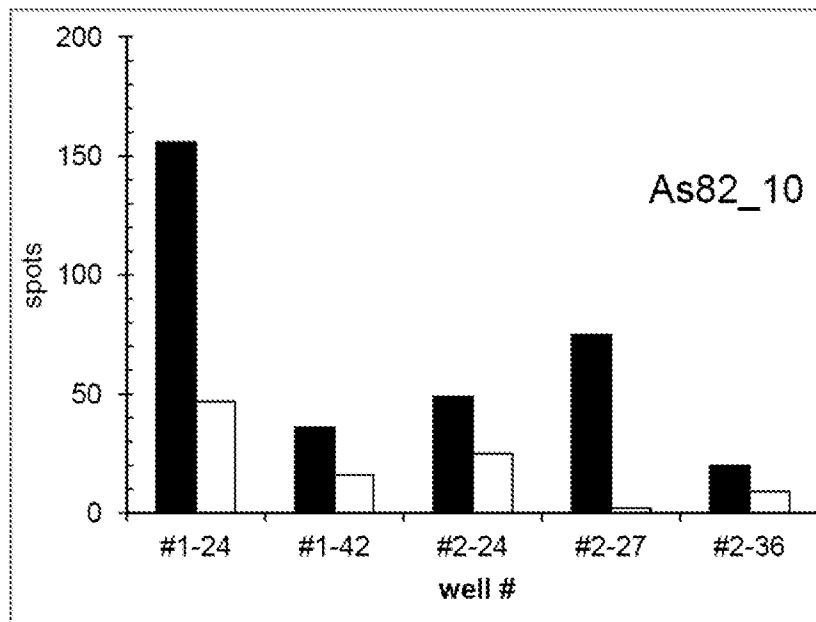


[37]

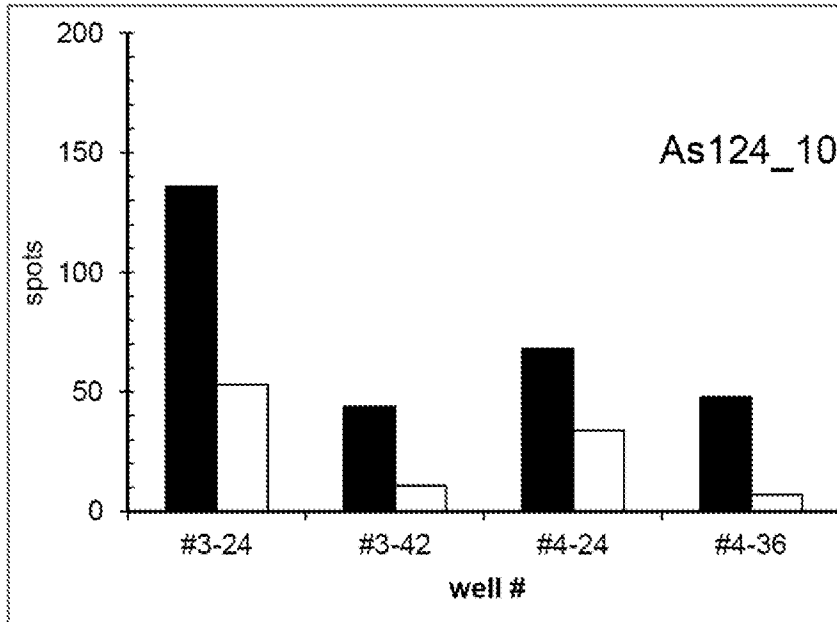


[38]

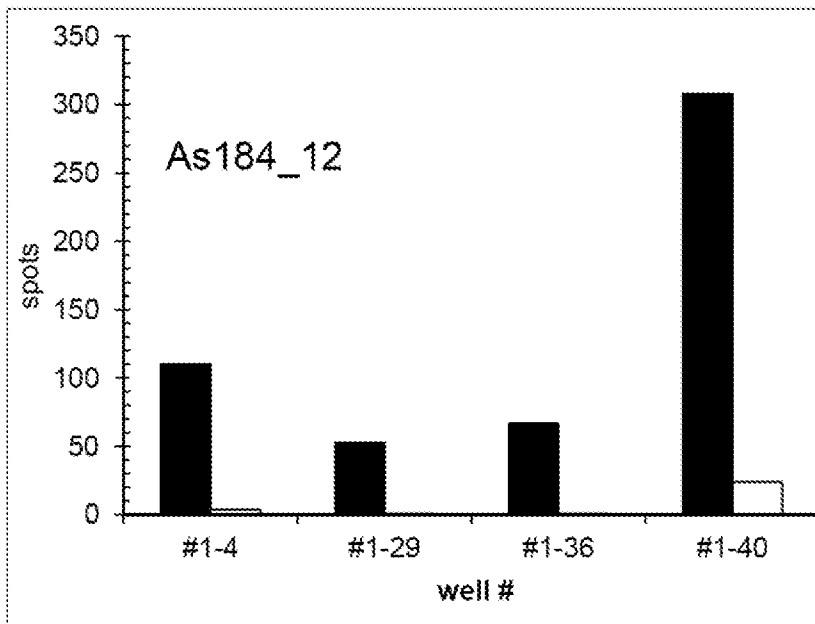


[39][40]

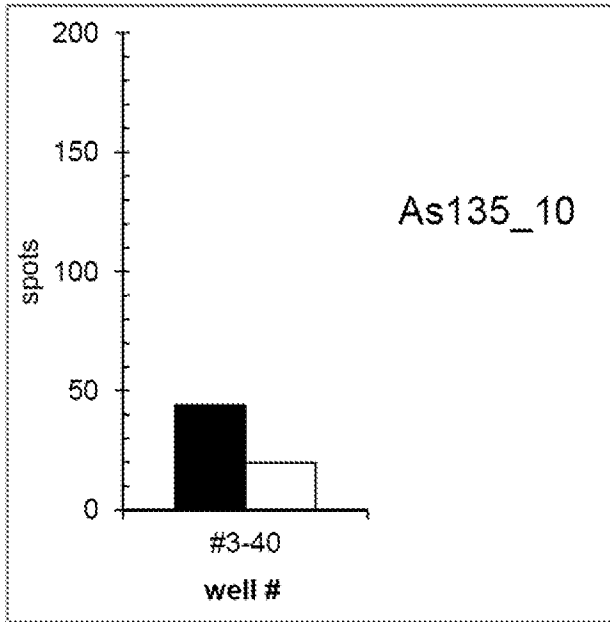
[41]



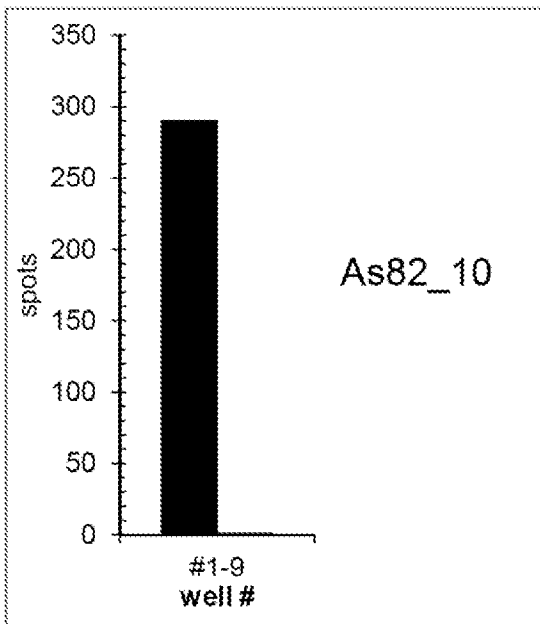
[42]



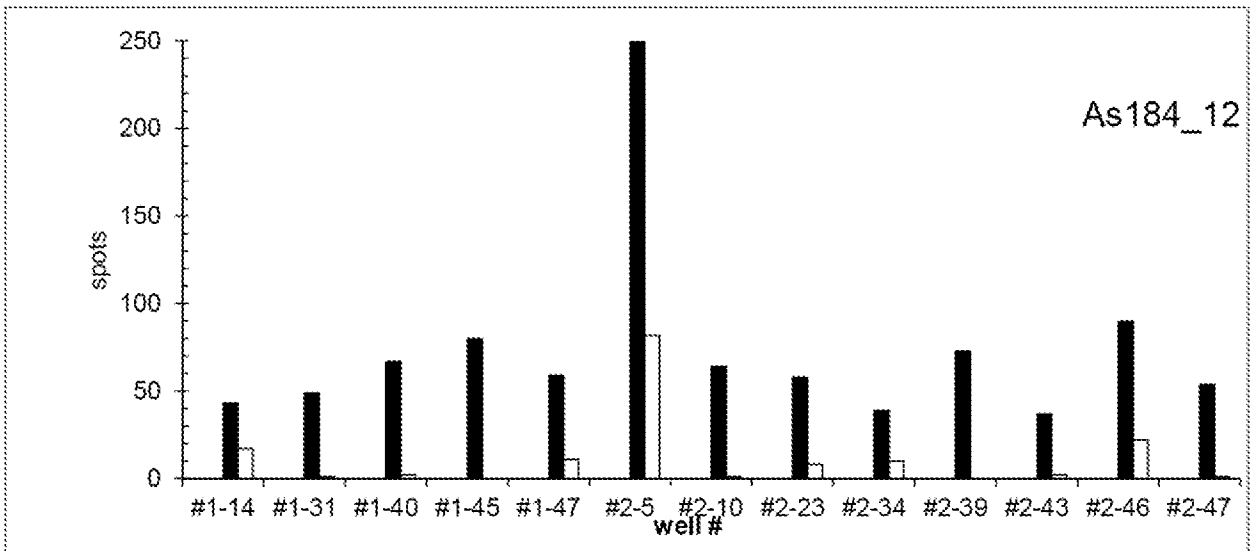
[圖43]



[圖44]



[圖45]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/084428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(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) C12N15/09, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K7/06, C07K16/30, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574		
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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/REGISTRY/BIOSIS(STN), Uniprot/GeneSeq, DWPI(Thomson Innovation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/050190 A2 (Sapporo Medical University), 06 May 2010 (06.05.2010), claims; examples & WO 2010/050268 A1 & WO 2010/107116 A1 & US 2011/0262358 A1 & US 2014/0044686 A1 & EP 2361988 A1 & CN 102203290 A & KR 10-2011-013448 A	1-42
Y	Rena MORITA et al., "Daichogan ni Okeru Gan Kansaibo to Shinki Gan Kogen no Bunshi Byoriteki Kaiseki", Nippon Byori Gakkai Kaishi, 2010, vol.99, no.1, page 246	1-42
Y	Rena MORITA et al., "Daichogan Gan Kansaibo to Shinki Gan Kogen OR7C1 no Bunshi Byorigakuteki Kaiseki", Nippon Byori Gakkai Kaishi, 2012, vol.101, no.1, page 349	1-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 19 February 2016 (19.02.16)		Date of mailing of the international search report 01 March 2016 (01.03.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/084428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoshihiko HIROHASHI et al., "Gan Kansaibo o Hyoteki to shita Men'eki Ryoho no Kisoteki Kento", Nippon Byori Gakkai Kaishi, 2010, vol.99, no.1, page 187	1-42
Y	KILE T. Benjamin et al., "Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4", Gene, 2000, Vol.258, p.31-41, particularly, paragraph of Results	1-42

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K39/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K7/06, C07K16/30, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574</p>											
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年</p>											
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/REGISTRY/BIOSIS (STN), Uniprot/GeneSeq DWPI (Thomson Innovation)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2010/050190 A2 (北海道公立大学法人札幌医科大学) 2010.05.06, 請求の範囲及び実施例, & WO 2010/050268 A1 & WO 2010/107116 A1 & US 2011/0262358 A1 & US 2014/0044686 A1 & EP 2361988 A1 & CN 102203290 A & KR 10-2011-013448 A</td> <td>1-42</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>守田玲菜 et al., “大腸癌における癌幹細胞と新規癌抗原の分子病理学的解析”, 日本病理学会会誌, 2010, Vol.99, No.1, p.246</td> <td>1-42</td> </tr> </tbody> </table>			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	WO 2010/050190 A2 (北海道公立大学法人札幌医科大学) 2010.05.06, 請求の範囲及び実施例, & WO 2010/050268 A1 & WO 2010/107116 A1 & US 2011/0262358 A1 & US 2014/0044686 A1 & EP 2361988 A1 & CN 102203290 A & KR 10-2011-013448 A	1-42	Y	守田玲菜 et al., “大腸癌における癌幹細胞と新規癌抗原の分子病理学的解析”, 日本病理学会会誌, 2010, Vol.99, No.1, p.246	1-42
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	WO 2010/050190 A2 (北海道公立大学法人札幌医科大学) 2010.05.06, 請求の範囲及び実施例, & WO 2010/050268 A1 & WO 2010/107116 A1 & US 2011/0262358 A1 & US 2014/0044686 A1 & EP 2361988 A1 & CN 102203290 A & KR 10-2011-013448 A	1-42									
Y	守田玲菜 et al., “大腸癌における癌幹細胞と新規癌抗原の分子病理学的解析”, 日本病理学会会誌, 2010, Vol.99, No.1, p.246	1-42									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>19.02.2016</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>01.03.2016</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>坂崎 恵美子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 9 4 5 1</p>									

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	守田玲菜 et al., “大腸癌癌幹細胞と新規癌抗原OR7C1の分子病理学的解析”, 日本病理学会会誌, 2012, Vol.101, No.1, p.349	1-42
Y	廣橋良彦 et al., “がん幹細胞を標的とした免疫療法の基礎的検討”, 日本病理学会会誌, 2010, Vol.99, No.1, p.187	1-42
Y	KILE T. Benjamin et al., “Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4”, Gene, 2000, Vol.258, p.31-41, 特に、3.Results の項	1-42