

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3926842号

(P3926842)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月9日(2007.3.9)

|                                |               |         |
|--------------------------------|---------------|---------|
| (51) Int. Cl.                  | F I           |         |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 5/00  | B       |
| <b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b> | C 1 2 P 21/02 | C       |
| <b>A 6 1 K 35/14 (2006.01)</b> | A 6 1 K 35/14 | Z       |
| <b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b> | A 6 1 P 37/04 |         |

請求項の数 56 (全 96 頁)

|               |                       |           |                                        |
|---------------|-----------------------|-----------|----------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平8-527076           | (73) 特許権者 | ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテュート                 |
| (86) (22) 出願日 | 平成8年3月8日(1996.3.8)    |           | アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ジョラ、ノース・トレイ・パイ |
| (65) 公表番号     | 特表平11-501516          |           | ンズ・ロード・10550、メール・ドロ                    |
| (43) 公表日      | 平成11年2月9日(1999.2.9)   |           | ップ・テイー・ピー・シー-8                         |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1996/003249     | (74) 代理人  | 弁理士 川口 義雄                              |
| (87) 国際公開番号   | W01996/027392         | (74) 代理人  | 弁理士 船山 武                               |
| (87) 国際公開日    | 平成8年9月12日(1996.9.12)  | (74) 代理人  | 弁理士 伏見 直哉                              |
| 審査請求日         | 平成15年2月17日(2003.2.17) |           |                                        |
| (31) 優先権主張番号  | 08/400,338            |           |                                        |
| (32) 優先日      | 平成7年3月8日(1995.3.8)    |           |                                        |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                |           |                                        |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原提示系およびT-細胞の活性化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

T-細胞リンパ球と共に用いる合成抗原提示細胞系であって、

a) 第1のプロモーターに作動可能に連結されており、かつクラス I MHC 重鎖を発現できるクラス I MHC 重鎖遺伝子；

b) 第2のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ該MHC 重鎖と共にMHC 分子を形成するβ-2ミクログロブリンを発現できるβ-2ミクログロブリン遺伝子；および

c) 第3のプロモーターに作動可能に連結されており、かつT-細胞リンパ球上の分子と相互作用する補助分子(assisting molecule)を発現できる補助分子遺伝子；

よりなり、

MHC 遺伝子、β-ミクログロブリン遺伝子および補助分子遺伝子のうちの少なくとも1つは該細胞系の由来となった細胞に存在せず、該MHC 分子がペプチドに結合し、該MHC 分子および補助分子が、該ペプチドと該MHC 分子が結合した場合に該ペプチドに対するT-細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数で細胞表面に存在する細胞系。

【請求項2】

該補助分子がコストимулятор分子である請求項1記載の細胞系。

【請求項3】

該コストимулятор分子がB7.1またはB7.2である請求項2記載の細胞系。

【請求項4】

10

20

該細胞系が第 1 の種に由来し、該 M H C 重鎖遺伝子が第 2 の種に由来する請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 5】

該第 1 の種が変温動物であり、第 2 の種が恒温動物である請求項 4 記載の細胞系。

【請求項 6】

該補助分子が接着分子である請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 7】

該接着分子が I C A M－1、I C A M－2、I C A M－3 または L F A－3 である請求項 6 記載の細胞系。

【請求項 8】

第 1 の補助分子の遺伝子および第 2 の補助分子の遺伝子を有する請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 9】

第 1 の補助分子がコスティミュラトリ分子であって、第 2 の補助分子が接着分子である請求項 8 記載の細胞系。

【請求項 10】

少なくとも 1 つのプロモーターが誘導性である請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 11】

第 1 のプロモーターが誘導性である請求項 10 記載の細胞系。

【請求項 12】

該ペプチドが細胞内で M H C 分子に結合する請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 13】

該 M H C 分子が細胞の表面に空で (empty) 提示される請求項 1 記載の細胞系。

【請求項 14】

ヒト T－細胞リンパ球を刺激するのに使用される安定な変温動物細胞系であって、

a) 第 1 の誘導性プロモーターに作動可能に連結されており、かつクラス I M H C 重鎖を発現できるクラス I M H C 遺伝子；

b) 第 2 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ M H C 重鎖と共に M H C 分子を形成する  $\beta$ －2 ミクロglobulin を発現できる  $\beta$ －2 ミクロglobulin 遺伝子；および

c) 第 3 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ T－細胞リンパ球上の分子と相互作用する補助分子を発現できる補助分子遺伝子；

よりなり、

M H C 遺伝子、 $\beta$ －2 ミクロglobulin 遺伝子及び補助分子遺伝子のうち少なくとも 1 つは該細胞系の由来となった細胞に存在せず、

該細胞はペプチドに結合できる空の M H C 分子を組み立て、M H C 分子および補助分子は、該ペプチドと M H C 分子が結合した場合に該ペプチドに対して T－細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数で細胞の表面に提示されるようになっている細胞系。

【請求項 15】

該補助分子がコスティミュラトリ分子である請求項 14 記載の細胞系。

【請求項 16】

該コスティミュラトリ分子が B 7. 1 または B 7. 2 である請求項 15 記載の細胞系。

【請求項 17】

該補助分子が接着分子である請求項 14 記載の細胞系。

【請求項 18】

該接着分子が I C A M－1 である請求項 17 記載の細胞系。

【請求項 19】

第 1 の補助分子の遺伝子および第 2 の補助分子の遺伝子を有する請求項 14 記載の細胞系。

【請求項 20】

第 1 の補助分子がコスティミュラトリ分子であって、第 2 の補助分子が接着分子である請求項 19 記載の細胞系。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 1】

ヒト T 細胞リンパ球を刺激するのに使用される安定な変温動物細胞系であって、

a) 第 1 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつクラス I MHC 重鎖を発現できるクラス I MHC 遺伝子；

b) 第 2 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ MHC 重鎖と共に MHC 分子を形成する  $\beta$ -2 ミクロglobulin を発現できる  $\beta$ -2 ミクロglobulin 遺伝子；

c) 第 3 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ T 細胞リンパ球上の分子と相互作用するコストимулятор分子を発現できるコストимулятор分子遺伝子；  
および

d) 第 4 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ T 細胞リンパ球上の共働的  
接着分子と相互作用する接着分子を発現できる接着分子遺伝子；

よりなり、

MHC 遺伝子、 $\beta$ -2 ミクロglobulin 遺伝子、コストимулятор分子遺伝子及び接着分子遺伝子のうち少なくとも 1 つは該細胞系の由来となった細胞に存在せず、

該細胞は MHC 重鎖および  $\beta$ -2 ミクロglobulin からペプチドに結合する MHC 分子を組み立てることができ、MHC 分子、コストимулятор分子および接着分子を、ペプチドと MHC 分子が結合した場合に該ペプチドに対して T 細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数で細胞の表面に輸送できるようになっている細胞系。

## 【請求項 2 2】

該コストимулятор分子が B7.1 または B7.2 である請求項 2 1 記載の細胞系。 20

## 【請求項 2 3】

該接着分子が ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3 または LFA-3 である請求項 2 1 記載の細胞系。

## 【請求項 2 4】

少なくとも 1 つのプロモーターが誘導性である請求項 2 1 記載の細胞系。

## 【請求項 2 5】

該ペプチドが細胞内で MHC 分子に結合する請求項 2 1 記載の細胞系。

## 【請求項 2 6】

該 MHC 分子が細胞の表面に空で提示される請求項 2 1 記載の細胞系。

## 【請求項 2 7】

T 細胞リンパ球と共に用いる合成抗原提示細胞系の断片であって、該細胞が、

a) 第 1 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつクラス I MHC 重鎖を発現できるクラス I MHC 重鎖遺伝子；

b) 第 2 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ該 MHC 重鎖と共に MHC 分子を形成する  $\beta$ -2 ミクロglobulin を発現できる  $\beta$ -2 ミクロglobulin 遺伝子；および

c) 第 3 のプロモーターに作動可能に連結されており、かつ T 細胞リンパ球上の分子と相互作用する補助分子を発現できる少なくとも 1 つの補助分子の遺伝子；

よりなり、

該補助分子蛋白質は、B7.1、B7.2、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3 40

及び LFA-3 の群から選択される膜結合コストимулятор分子又は接着分子であり、MHC 遺伝子、 $\beta$ -ミクロglobulin 遺伝子および補助分子遺伝子のうちの少なくとも 1 つは該細胞系の由来となった細胞に存在せず、該 MHC 分子がペプチドに結合し、該 MHC 分子および該少なくとも 1 つの補助分子が、該ペプチドと該 MHC 分子が結合した場合に該ペプチドに対する T 細胞リンパ球を活性化するのに十分な数で細胞表面に存在し、該 MHC 分子および該補助分子を同じ細胞断片上に有する、合成抗原提示細胞系の断片。

## 【請求項 2 8】

MHC 分子が空である請求項 2 7 記載の細胞断片。

## 【請求項 2 9】

ペプチドがMHC分子に結合している請求項27記載の細胞断片。

【請求項30】

MHC分子および少なくとも2つの異なった補助分子を有し、該補助分子が同じ細胞断片上の膜結合コスティミュラトリ分子又は接着分子である、T細胞リンパ球を活性化する請求項27記載の細胞断片。

【請求項31】

a) 細胞の培養物を樹立し；  
 b) 第1のプロモーターに作動可能に連結した発現可能なクラスI MHC重鎖遺伝子で該培養物をトランスフェクトし；  
 c) 第2のプロモーターに作動可能に連結した発現可能なβ-2ミクロglobulin遺伝子 10  
 で該培養物をトランスフェクトし；  
 d) 第3のプロモーターに作動可能に連結した発現可能な補助分子遺伝子で該培養物をトランスフェクトする；  
 ことからなる合成抗原提示細胞系の製法。

【請求項32】

該補助分子がコスティミュラトリ分子である請求項31記載の方法。

【請求項33】

該コスティミュラトリ分子がB7.1またはB7.2である請求項32記載の方法。

【請求項34】

該細胞系が第1の種に由来し、該MHC重鎖遺伝子が第2の種に由来する請求項31記載 20  
 の方法。

【請求項35】

該第1の種が変温動物であって、該第2の種が恒温動物である請求項34記載の方法。

【請求項36】

該補助分子が接着分子である請求項31記載の方法。

【請求項37】

該接着分子がICAM-1、ICAM-2、ICAM-3またはLFA-3である請求項 36記載の方法。

【請求項38】

第2の補助分子の遺伝子で培養物をトランスフェクトする工程を含む請求項31記載の方 30  
 法。

【請求項39】

該第1の補助分子がコスティミュラトリ分子であって、該第2の補助分子が接着分子である請求項38記載の方法。

【請求項40】

プロモーターの少なくとも1つが誘導性である請求項31記載の方法。

【請求項41】

a) クラスI MHC重鎖、β-2ミクロglobulinおよび補助分子のうちの少なくとも 1つに対する遺伝子を欠く細胞の培養物を樹立し；  
 b) 細胞の培養物中で欠如しているa)の遺伝子の各々の発現可能な遺伝子で培養物をト 40  
 ランスフェクトする（該遺伝子はプロモーターに作動可能に連結している）；  
 ことからなる合成抗原提示細胞系の製法。

【請求項42】

a) 細胞の培養物を樹立し；  
 b) プロモーターに作動可能に連結した発現可能なクラスI MHC重鎖遺伝子で培養物  
 をトランスフェクトし；  
 c) 第2のプロモーターに作動可能に連結した発現可能なβ-2ミクロglobulin遺伝子  
 で培養物をトランスフェクトし；  
 d) 第3のプロモーターに作動可能に連結した発現可能なコスティミュラトリ分子遺伝  
 子で培養物をトランスフェクトし；

e) 第3のプロモーターに作動可能に連結した発現可能な接着分子遺伝子で培養物をトランスフェクトする；

ことからなる合成抗原提示細胞系の製法。

【請求項43】

a) クラスI MHC重鎖、 $\beta$ -2ミクロglobulinおよびコストимулятор分子のうちの少なくとも1つに対する遺伝子を欠く細胞の培養物を樹立し；

b) 細胞の培養物中で欠如しているa)の遺伝子の各々の発現可能な遺伝子で培養物をトランスフェクトし（該遺伝子は第1の作動可能なプロモーターに連結している）；

c) 発現可能な接着分子遺伝子で培養物をトランスフェクトする（該遺伝子は第2の作動可能なプロモーターに連結している）；

ことからなる合成抗原提示細胞系の製法。

【請求項44】

a) 請求項1記載の細胞系を提供し；

b) 選択されたペプチドに結合したMHC分子が細胞系の表面に産生されるような条件下で細胞系を培養し；

c) 培養細胞を選択されたペプチドに対するCD8<sup>+</sup>T細胞と接触させる；

ことからなる選択されたペプチドに対するCD8<sup>+</sup>T細胞をイン・ビトロで活性化させる方法。

【請求項45】

該細胞系が変温動物のものである請求項44記載の方法。

【請求項46】

さらに、活性化されたCD8<sup>+</sup>T細胞を細胞系から分離する工程を含む請求項44記載の方法。

【請求項47】

さらに、活性化されたCD8<sup>+</sup>T細胞を許容される担体または賦形剤に添加して懸濁物を形成する工程を含む請求項46記載の方法。

【請求項48】

a) 細胞の第1の培養物を樹立し；

b) プロモーターに作動可能に連結した、クラスI MHC重鎖の少なくとも細胞外部分に対する発現可能な重鎖遺伝子で培養物をトランスフェクトし；

c) 第2のプロモーターに作動可能に連結した発現可能な $\beta$ -2ミクロglobulin遺伝子で培養物をトランスフェクトし；

d) 産生されたMHC分子部分を収穫し；

e) 細胞の第2の培養物を樹立し；

f) 第3のプロモーターに作動可能に連結した、補助分子の少なくとも細胞外部分に対する発現可能な補助分子遺伝子で第2の培養物をトランスフェクトし；

g) 補助分子部分を収穫し；

h) ペプチドがMHC分子の細胞外部分と結合した場合に該ペプチドに対してT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数で、MHC分子部分および補助分子部分を支持体と結合する；

ことからなる合成T細胞リンパ球抗原活性化用マトリックスの製法。

【請求項49】

第1の細胞培養物と第2の細胞培養物が同一である請求項48記載の方法。

【請求項50】

細胞の第3の培養物を樹立し、第4のプロモーターに作動可能に連結した少なくとも細胞外部分に対する第2の発現可能な補助分子遺伝子で第3の培養物をトランスフェクトし、第2の補助分子部分を収穫し、第2の補助分子部分を該支持体と結合することを含む請求項48記載の方法。

【請求項51】

該補助分子がコストимулятор分子である請求項48記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 2】

該コストミュラトリ分子が B 7 . 1 または B 7 . 2 である請求項 5 1 記載の方法。

## 【請求項 5 3】

該補助分子が接着分子である請求項 4 8 記載の方法。

## 【請求項 5 4】

該接着分子が I C A M - 1、I C A M - 2、I C A M - 3 または L F A - 3 である請求項 5 3 記載の方法。

## 【請求項 5 5】

該ペプチドを、細胞の第 1 の培養物中の M H C 分子部分に導入し、それと結合する請求項 4 8 記載の方法。

## 【請求項 5 6】

M H C 分子部分を支持体と結合した後に該ペプチドを該分子部分と結合する請求項 4 8 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、米国政府の援助の下でなされ、米国政府は本発明においてある種の権利を有する。

関連出願のクロスリファレンス

本出願は、1995 年 3 月 8 日に出願され、同一の発明の名称を有する米国特許出願第 0 8 / 4 0 0 , 3 3 8 号の一部継続出願である。

技術分野

本発明は、特定の抗原性ペプチドに特異性を有する、T-細胞を活性化する物質および方法、種々の疾病状態の治療のためのイン・ビボでの活性化 T-細胞の使用、およびこれらの使用に適した組成物に関する。

発明の背景

免疫系を活性化して感染症以外のタイプの病気を克服することが可能であろうと考えられていたので、免疫系が個体を感染症から救済しまたは保護する効率は常に科学者の興味をそそるものであった。かかる病気は、免疫抑制された患者における癌、A I D S、肝炎および感染性疾病を含む。抗体の使用を含めた種々の手法がこれらのタイプの病気で使用されてきたが、もしあったとしても細胞傷害性 T-細胞を用いて成功した試みはほとんど記録されていない。理論的には、細胞傷害性 T-細胞は、前記したタイプの病気を治療する好ましい手段であろう。しかしながら、特異的に細胞傷害性 T-細胞を活性化する手法は利用しうるものがなかった。

現在知られている細胞傷害性 T-細胞、または C D 8<sup>+</sup>細胞（すなわち、分子 C D 8 を発現する細胞）はウイルス感染に対して主要な系列の防御を示す。C D 8 リンパ球はウイルスによって感染された細胞を特異的に認識し、それを殺す。かくして、ウイルス感染を排除せんとする失費は、感染細胞の随伴する喪失である。C D 8<sup>+</sup>細胞の表面上の T-細胞受容体は外来性抗原を直接認識することができない。抗体とは対照的に、抗原がまず受容体に対して提示されなければならない。

抗原の C D 8<sup>+</sup> T-細胞への提示には、クラス I タイプの主要組織適合性複合体（M H C）分子が関与する。主要組織適合性複合体（M H C）とは、免疫応答で重要な役割を演じる糖蛋白質の広範なファミリーをコードする大きな遺伝子座をいう。H L A（ヒト白血球抗原）複合体ともいう M H C 遺伝子はヒトでは第 6 番染色体に位置する。M H C 遺伝子によってコードされる分子は細胞表面に存在し、組織移植における「非自己」としての認識の大きな原因である。このように、膜結合 M H C 分子は、T-細胞による抗原の認識に密接に関与する。

M H C 産物は I、I I および I I I という 3 つの主要なクラスにグループ分けされる。主としてヘルパー細胞として働く T-細胞は C D 4 を発現し、主としてクラス I I 分子と相互作用し、他方、ほとんどは細胞傷害性エフェクター細胞を表す C D 8 - 発現細胞はクラス I 分子と相互作用する。

クラス I 分子は膜糖蛋白質であり、内因性蛋白質の細胞内分解から主として由来するペプ

10

20

30

40

50

チドに結合する能力を持つ。MHC分子と、ウイルス、細菌および他の外来性蛋白質に由来するペプチドとの複合体は、T細胞の抗原応答性をトリガーするリガンドを含む。対照的に、MHC分子と通常の細胞産物に由来するペプチドとの複合体は、胸腺において、自己ペプチドを寛容するようにT細胞を「教示する」役割を演じる。クラスI分子は全部の完全な抗原を提示せず、むしろ、それらは、それらの「ペプチド結合グロブ」に「ロードされた」そのペプチド断片を提示する。

長年の間、免疫学者は、ウイルス、レトロウイルスおよび癌細胞を標的化する特異的細胞傷害性細胞を生起させることを望んでいた。一般に、ウイルス病に対する標的化は生ワクチンまたは弱毒化ワクチンの接種によってイン・ビボで達成することができるが、レトロウイルスまたは癌細胞では同様の成功は達成されていない。さらに、ワクチン法は免疫抑制された患者では所望の効率を有していなかった。少なくとも1人の研究者が、IL-2、T細胞成長因子と共にイン・ビトロでインキュベートすることによって、存在するCD8<sup>+</sup>細胞を「ブーストする (boosting)」という非特異的アプローチを採用した。しかしながら、(LAK細胞療法として知られている) このプロトコルは、すでに活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞の増殖を可能とするに過ぎないであろう。ある1つの理由または別の理由で、免疫系は常に活性であるので、IL-2で刺激された細胞のほとんどは病気を克服する目的では重要でないであろう。事実、このタイプの療法が所望の特異性でもっていずれかの細胞を活性化するということはこれまで記載されていない。したがって、LAK細胞療法の利点はせいぜい議論を呼ぶもので、副作用が典型的にはかなりひどくて多くの研究は中断された。

ペプチドローディング法に関与すると思われるいくつかの新規な分子が最近同定されている。また、結合ペプチドをもたないクラスI分子(すなわち、「空の」分子)がある種の制限的状況下で産生され得ることも注目されている。しかしながら、これらの「空の」分子は、結合ペプチドをもたないクラスI分子が非常に熱不安定なので、しばしば細胞表面に到達できない。かくして、「空の」クラスI分子は細胞の内部から細胞表面へのその輸送の間に分解する。

ペプチドに結合したクラスI MHC分子の提示のみでは一般にCD8<sup>+</sup>細胞を活性化するのに効果的でない。天然では、CD8<sup>+</sup>細胞は、ペプチドが結合したクラスI MHC分子のみならず共刺激性分子(costimulatory molecule)を提示する抗原提示細胞によって活性化される。かかる共刺激性分子には、今日B7.1およびB7.2と命名された2つのサブグループであると認識されているB7が含まれる。また、インテグリンのごとき細胞接着分子がこのプロセスを助けることが見い出されている。

CD8<sup>+</sup>T細胞がクラスI MHCおよび共刺激性分子によって結合されたペプチドを有する抗原提示細胞と相互作用する場合、CD8<sup>+</sup>T細胞は活性化されて増殖し、アームの付いたエフェクターT細胞となる。一般に、参考として本明細書に含めるCurrent Biology Limited, London (1994)によって発行されたJanewayおよびTraversのImmunobiology参照のこと。

従って、必要とされているのは、T細胞が増殖し、細胞傷害性となるようにT細胞を活性化する方法である。もし活性化がイン・ビトロでなされ、活性化された細胞傷害性T細胞を患者に再導入できれば有用であろう。また、もし活性化が、選択されたペプチドを提示するのみならず活性化の有効性を増大させる他の共刺激性因子を提示する細胞のごとき物質からなる合成抗原提示マトリックスによってなされ得るならば望ましいであろう。

また、そのペプチドを提示する細胞に対して細胞傷害性である実質的にCD8<sup>+</sup>細胞のみが活性されるようにペプチドを選択するのが可能であれば有利であろう。

#### 発明の概要本

発明は、ペプチドと複合体化されたMHC分子、およびT細胞の活性化を助けるT細胞援助分子(assisting molecule)を提示する合成抗原提示系に関する。

1の実施態様において、該系は、支持体および該支持体に作動可能に結合した選択ペプチドに結合できるクラスI MHC分子の少なくとも細胞外部分を有する合成抗原提示マ

10

20

30

40

50

トリックスに関する。また、該マトリックスは該支持体に作動可能に結合した援助分子を含む。MHCおよび援助分子は、ペプチドがMHC分子の細胞外部分に結合した場合に該ペプチドに対するT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数存在させる。

援助分子と共にMHC分子またはMHC分子の一部と共に有する抗原提示マトリックスは、ペプチドに対してT細胞リンパ球を活性化する際に相乗的反応を提供することが判明した。援助分子の例はB7.1およびB7.2のごとき共刺激性分子、またはICAM-1およびLFA-3のごとき接着分子である。かかる共刺激性分子の細胞外部分も使用できる。もう1つのタイプの共刺激性分子は、抗CD28抗体またはその機能性部分、例えばFab部分のごときCD28分子と反応するものである。

特に効果的な相乗的反応は、ペプチドと結合したMHC分子、共刺激性分子、および接着分子を有する抗原提示マトリックスに起因する。特に、細胞傷害性T細胞活性の高度に効果的な相乗的作用はB7.1およびICAM-1の組合せに依拠する。

マトリックスに使用する支持体はいくつかの異なる形態を採り得る。支持体についての例は金属またはプラスチックのごとき個体支持体、樹脂または修飾されたセルロースカラムのごとき多孔性物質、マイクロビーズ、マイクロタイタープレート、赤血球細胞およびリポソームを含む。

別のタイプの支持体は、細胞膜断片のごとき細胞断片、または完全細胞である。この実施態様において、マトリックスは、実際には、MHC分子および援助分子を細胞表面に提示して抗原提示細胞(APC)を生成するようにトランスフェクトされた細胞である。これは、第1のプロモーターに作動可能に連結したMHC重鎖をコードする少なくとも1つの発現可能クラスI MHCヌクレオチド配列、好ましくはcDNA配列、および第2のプロモーターに作動可能に連結した発現可能 $\beta$ -2ミクログロブリンヌクレオチド配列、を含有する細胞系を産生することによってなされる。MHC重鎖および $\beta$ -2ミクログロブリンは一緒に会合してペプチドに結合するMHC分子を形成する。MHC蛋白質は抗原性ペプチドと結合し、それを細胞の表面に提示する。また、該細胞は第3のプロモーターに作動可能に連結した援助分子のヌクレオチド配列についての遺伝子を含む。また、援助分子も細胞表面に提示される。これらの分子は、ペプチドが複合体に結合した場合に、該ペプチドに対してT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数にて細胞の表面に提示される。細胞の表面または炭水化物部分のごとき細胞断片上の他の分子はT細胞に対していくらかの共刺激も付与する。

該細胞系は、少なくとも1つの前記遺伝子が、該細胞系が由来する細胞に天然では存在しない点で合成的である。MHC分子は熱不安定であるので変温性細胞系を用いるのが好ましい。ある範囲の種がこの目的で有用である。例えば、参考として本明細書に取り込む、この使用のための多数の種を議論するPetersenらに対する米国特許第5,314,813号参照のこと。真核生物細胞特に昆虫細胞を使用するのが好ましい。

1の実施態様において、少なくとも2つの援助分子(1つは共刺激性分子であり、他は接着分子である)を有するのが特に好ましい。この組合せは相乗効果を有し、組み合わせた個々の分子の各々よりも大きなT細胞活性化を与えることが判明した。また、誘導可能なプロモーターの制御下にある少なくとも1つのトランスフェクトされた遺伝子を有するのが有利であって好ましいことも判明した。

本発明を用い、MHC分子を産生しつつペプチドを細胞に導入し、MHC分子が依然細胞内にありつつそれに該ペプチドを結合させることが可能である。あるいは、MHC分子を細胞表面に空の分子として発現させ、該分子が細胞表面で発現された後にペプチドを細胞に導入することができる。この後者の手法において、変温性細胞の使用が特に有利である。何故ならば、空のMHC分子(まだ複合体化していないかペプチドと結合していないもの)は熱不安定だからである。

クラスI MHC分子は*Drosophila melanogaster*(果実ハエ)細胞のごとき昆虫細胞で発現された。*Drosophila*は哺乳動物免疫系の全ての成分を有しないので、ペプチドローディング機構に関与する種々の蛋白質をかかる細胞に存在させないべきである。ペプチドローディング機構の欠如はクラスI分子が細胞表面で空

10

20

30

40

50

の分子として発現されるのを可能とする。

*Drosophila*系のごとき昆虫細胞の使用のもう1つの利点は、*Drosophila*細胞が37℃よりもむしろ28℃を好むことである。この事実は、空のクラスI MHC分子が熱不安定であって37℃で崩壊する傾向にあるので非常に重要である。クラスI分子に結合できるペプチドと共にクラスI発現*Drosophila*細胞をインキュベートすることによって、実質的に各クラスI分子が1つの同一のペプチドを含有するようにすることが可能である。従って、クラスI分子が多く異なるタイプのペプチドを含有し、そのほとんどが自分自身の無害細胞蛋白質に由来する場合、細胞は哺乳動物細胞とは非常に異なる。

また、本発明は、イン・ビトロで活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞を生産する方法に関する。1つの方法は、イン・ビトロで、CD8<sup>+</sup>細胞を前記した抗原提示マトリックスの1つと、CD8<sup>+</sup>細胞を抗原特異的に活性化するのに十分な時間接触させることよりなる。該方法は、さらに、(1) 活性化CD8<sup>+</sup>細胞を抗原提示マトリックスから分離し；(2) 活性化CD8<sup>+</sup>細胞を許容される担体または賦形剤に懸濁させ；次いで、(3) 該懸濁液を治療を必要とする個体に投与することよりなることができる。該抗原は天然または未分解蛋白質もしくはポリペプチドよりなることができるか、あるいはそれらは、ヒト・クラスI MHC分子とのインキュベーションに先立ってペプチド断片に切断された抗原性ポリペプチドよりなることができる。

別の変形において、本発明は、患者において疾患を治療し、ヒト患者において標的細胞を特異的に殺す方法に関する。該方法は、(1) 患者から休止または天然CD8<sup>+</sup>細胞を含有する流体試料を得、(2) イン・ビトロで、CD8<sup>+</sup>細胞を抗原提示マトリックスと、CD8<sup>+</sup>細胞を抗原特異的に活性化するのに十分な時間接触させ；次いで、(3) 活性化CD8<sup>+</sup>細胞を患者に投与することよりなる。例えば、腫瘍特異的ペプチドの使用は、細胞傷害性活性化CD8<sup>+</sup>T細胞を生産することによって、腫瘍関連病の治療を可能とする。また、本発明は、適当な懸濁液中の抗原提示マトリックスを投与することによって医療疾患を治療する方法に関する。種々の実施態様において、該疾患は癌、腫瘍、新形成物(neoplasia)、ウイルスまたはレトロウイルス感染、自己免疫または自己免疫型疾患を含み得る。1の実施態様において、マトリックスを投与する方法は静脈内注射を包含する。

#### 【図面の簡単な説明】

図1ー図3は、発現プラスミドpRmHa-2およびpRmHa-3を示す図である。図1において、pRmHa-2構築を示す；図2において、pRmHa-3の構築を示す；および図3において、pRmHa-3ベクターを示し、制限、ポリリンカー、プロモーターおよびポリアダニル化、ならびにヌクレオチド配列を発現のために挿入できる部位を示す。

図4および5は、HIVペプチドによる*Drosophila*細胞の表面に発現されたHLA-B27およびHLA-A2.1のペプチド誘導熱安定化を示す。各細胞集団の平均蛍光をインキュベーション条件に対してプロットして示す。

図6は、昆虫細胞が抗原をプロセスし、それをクラスI分子にロード(load)できるか否か、および後者が内因的にまたは外因的に由来する抗原をT細胞に提示できるか否かを判断するために設計した実験からのデータを示す。K<sup>b</sup>/β2でトランスフェクトされたSchneider-2(SC2)または3T3細胞を等張(Iso)または低張(Hyp)媒体中、オボアルブミン蛋白質(OvPro)またはオボアルブミンペプチド、OVA24(OvPep)と共にインキュベートした。(マウス細胞系BALB/3T3は受託番号CCL163下でATCCから入手可能である)。処理の後、細胞をT細胞ハイブリドーマB3/CD8と共に培養した。B3/CD8は、B3(Carboneら, J. Exp. Med. 169:603-12(1989)、H-2K<sup>b</sup>クラスI分子によって提示されたオボアルブミンペプチド253-276に特異的な細胞傷害性T細胞と、CD8担持IL-2分泌細胞系との間のT細胞ハイブリドーマである。抗原刺激に際して、B3/CD8は、IL-2依存性細胞系CTLへ<sup>3</sup>Hチミジン取り込みによ

って測定されるIL-2を産生する(Gillisら, J. Immunol. 120:2027(1978))。かくして、産生されたIL-2の量を測定することによって、T細胞認識についてアッセイすることができる。共培養からの上清を、IL-2依存性細胞系CTL(ATCC番号TIB 214)による<sup>3</sup>Hチミジン取り込みによって分析した。取り込まれた<sup>3</sup>Hチミジンの量を初期細胞処理に対してプロットする。

図7は、本発明による、トランスフェクトされたDrosophila(ハエ)細胞の表面でのB7.1、ICAM-1およびMHCの発現を示す。

図8は、赤血球細胞に結合した組換えL<sup>d</sup>マウスMHCを用いる蛍光-活性化細胞選別(sorter)実験の結果を示すグラフである。

図9は、赤血球細胞に結合した組換えK<sup>b</sup>マウスMHCを用いる蛍光-活性化細胞選別実験の結果を示すグラフである。

図10は、標識抗体の使用による組換えK<sup>b</sup>のマикроタイタープレートへの結合を示すグラフである。

図11は、トランスフェクトされたDrosophila細胞で刺激されたCD8<sup>+</sup>2C細胞上でのCD69およびCD25の発現を示す蛍光-活性化細胞選別実験からの結果を示す一連のグラフである。

図12は、L<sup>d</sup>のみでトランスフェクトされたDrosophila細胞によって提示されたペプチドによって誘導されたCD8<sup>+</sup>2C細胞のIL-2依存性増殖応答を示す一対の棒グラフである。

図13は、トランスフェクトされたDrosophila細胞によって提示されたペプチドによって誘導されたCD8<sup>+</sup>2C細胞の第3日目の増殖応答に対するペプチド濃度の影響を示すグラフである。

図14は、トランスフェクトされたDrosophila細胞によって提示されたペプチドにより誘導されたCD8<sup>+</sup>2C細胞の第3日目の増殖応答およびIL-2産生に対する抗原-提示細胞用量の影響を示す一対のグラフである。

図15は、L<sup>d</sup>. B7、L<sup>d</sup>. ICAMおよびL<sup>d</sup>. B7. ICAMでトランスフェクトされたDrosophila細胞により誘導されたCD8<sup>+</sup>2C細胞の増殖応答に対するペプチド濃度の影響を示す一連のグラフである。

図16は、L<sup>d</sup>. L<sup>d</sup>. B7、L<sup>d</sup>. ICAMおよびL<sup>d</sup>. B7. ICAM+QL9ペプチドでトランスフェクトされたDrosophila細胞により誘導されたCD8<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>2C細胞の増殖応答の動力学を示す一連のグラフである。

図17は、外因性サイトカインの不在下、L<sup>d</sup>. B7、L<sup>d</sup>. B7. ICAMまたはL<sup>d</sup>. ICAM抗原-提示細胞+QL9ペプチド(10 μM)でトランスフェクトされたDrosophila細胞により刺激されたCD8<sup>+</sup>2C細胞のCTL活性を示す一連のグラフである。

図18は、外因性IL-2(20 u/ml)の不在下(左)または存在下(右)、L<sup>d</sup>. ICAM抗原-提示細胞+QL9ペプチド(10 μM)でトランスフェクトされたDrosophila細胞により刺激されたCD8<sup>+</sup>2C細胞のCTL活性を示す一対のグラフである。

図19は、トランスフェクトされたDrosophila細胞によって提示されたペプチドに対する正常(非トランスジェニック)CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖応答(左側パネル)および外因性サイトカインの添加なくして、3日間、ペプチドの不在下で5×10<sup>5</sup> B10. D2(L<sup>d</sup>)脾臓細胞(2000 cGy)と共に培養したN B6および2C B6 CD8<sup>+</sup>細胞の等級分けした用量によって誘導された応答(右側パネル)を示す一対のグラフである。

図20は、ペプチドQL9で固定化された分子で被覆したプレートにおいて培養した精製2C+T細胞(ウェル当たり50,000細胞)の刺激された分裂促進を示すグラフである(実線=L<sup>d</sup>および抗-CD28抗体、破線=L<sup>d</sup>のみ)。

図21は、L<sup>d</sup>および抗-CD28抗体で被覆した96-ウェルプレートにおいて培養した、種々の示したペプチドでの、培養5日目における精製2C+T細胞の刺激された分

10

20

30

40

50

裂促進を示す棒グラフである（ハッチングを施した棒＝I L－2無し、黒色棒＝I L－2添加）。

図22は、 $L^d$ および抗-CD28抗体で被覆したプレート中での12日間の培養後に回収し、ペプチドQL9に暴露し、2C T-細胞受容体特異的抗体1B2を用いて染色した細胞のフローサイトメトリー分析の結果のグラフ表示である（M2＝陽性染色細胞、M1＝陰性染色細胞）。

図23は、 $L^d$ および抗-CD28抗体で被覆したプレート中での12日間の培養後に回収し、ペプチドp2Caに暴露し、2C T-細胞受容体特異的抗体1B2を用いて染色した細胞のフローサイトメトリー分析の結果のグラフ表示である（M2＝陽性染色細胞、M1＝陰性染色細胞）。

10

図24は、 $L^d$ および抗-CD28抗体で被覆したプレート中での12日間の培養後に回収し、ペプチドSL9に暴露し、2C T-細胞受容体特異的抗体1B2を用いて染色した細胞のフローサイトメトリー分析の結果のグラフ表示である（M2＝陽性染色細胞、M1＝陰性染色細胞）。

図25は、活性化されたT-細胞による標的細胞の細胞溶解を示すグラフである（実線＝ペプチドQL9、破線＝対照ペプチドLCMV）。

図26は、インフルエンザマトリックスペプチドをロードした抗原-提示細胞でのヒトCD8<sup>+</sup>T-細胞の活性化に起因した細胞傷害性溶解のグラフ表示である。

図27は、HIV-RTPeプチドをロードした抗原-提示細胞でのヒトCD8<sup>+</sup>T-細胞の活性化に起因した細胞傷害性溶解のグラフ表示である。

20

図28は、チロシナーゼペプチドをロードした抗原-提示細胞でのヒトCD8<sup>+</sup>T-細胞の活性化に起因した細胞傷害性溶解のグラフ表示である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、T-細胞リンパ球を活性化するのに用いることができる合成抗原-提示系に関する。活性化されたCD8<sup>+</sup>T-細胞は増殖し、サイトカインを産生し、細胞傷害性となるか、あるいはこれらの結果の組合せとなる。1つの好ましい実施態様において、該系は細胞傷害性CD8<sup>+</sup>細胞を活性化し、これは次いで増殖し、次いで活性化されて標的細胞を探し、それを破壊する。本発明を用いて、イン・ビトロでT-細胞を活性化し、次いで活性化されたT-細胞を、元来それが由来する患者に戻すことができるか、あるいはT-細胞のイン・ビボ活性化に用いることができる。

30

本発明の合成抗原-提示系は2つの主要な成分を有する。最初の成分は、選択されたペプチドに結合できるクラスI MHC分子の少なくとも細胞外部分である。第2の主要成分はT-細胞の活性化を助ける援助分子である。各場合において、より大きい分子の細胞外部分を用いることができるが、ある具体例では、分子全体を用いる。

説明を容易にするため、一般にMHC分子について記載するが、MHC分子の細胞外部分を用いることもできることが理解される。本発明で必要なMHC分子の部分は選択されたペプチドに結合し、T-細胞にペプチドを提示する部分である。

ペプチドは、実施すべき処理に応じて、適当なT-細胞を活性化するように選択される。

例えば、特定の癌の治療において、活性化されたT-細胞と反応する癌細胞の表面に、ある抗原性ペプチドが提示される。かくして、次いで、癌細胞と結合し、それを破壊する適当なT-細胞を活性化するように選択されたペプチドを用いるのが適当である。

40

本発明は、MHC分子と既に複合体化されたペプチドでもって、MHC分子が細胞により産生され、あるいはMHC分子が、それらで複合体化されたペプチドをまだ有しない空のMHC分子を産生させることができる。この後者の具体例は特に有用である。というのは、それはペプチドが、MHC分子が調製された後に選択されるのを可能とするからである。

クラスI MHC分子は時々アルファ鎖と呼ばれる重鎖、およびβ-2ミクログロブリンを包含する。ここに議論するごとく、クラスI MHC分子の細胞外部分はβ-2ミクログロブリンと共にMHC重鎖の細胞外部分よりなる。

支持体に結合させるべきMHCの細胞外部分を調製することにおいて、可溶性分子を後記

50

するごとく調製する。これらの分子は一般にMHC分子中に膜貫通および細胞質ドメインを欠く。

援助分子は、それがペプチド/MHC分子複合体と共に提示された場合にT細胞の活性化を容易とする。本発明は援助分子の2つの主要なカテゴリーを含む。第一のカテゴリーは（従前B7として知られ、またCD80としても知られている）B7.1およびT細胞上のCD28に結合する（CD86としても知られている）B7.2のごとき共刺激性分子よりなる。他の共刺激性分子は抗-CD28抗体またはかかる抗体の機能的部分、例えばCD28に結合するFab部分である。

本発明の援助分子の他の主要なカテゴリーは接着分子である。これらは、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3およびLFA-3を含めた種々のICAM分子を含む。結合で用いるMHC分子に結合したペプチドと、これらの援助分子のうちの1つとの組合せは、従来見られなかった程度までT細胞を活性化する。

共刺激性分子および接着分子双方と組み合わせたペプチド-結合MHC分子を用いることによって、より大きな相乗的応答さえ達成された。これは細胞傷害性CD8<sup>+</sup>細胞を生産するにおいて特に効果的であることが判明した。

本発明によると、MHC分子および援助分子が、ペプチドがMHC分子の細胞外部分に結合した場合に該ペプチドに対してT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数にて存在するように、MHC分子および援助分子を支持体に作動可能に結合させる。該ペプチドはMHC分子が支持体に結合される前または後にMHC分子に結合させることができる。

支持体は多くの異なる形態を採り得る。それはプラスチックまたは金属材料のごとき固体支持体であり得、それは分離カラムで通常使用されるごとき多孔性材料であり得、それはリポソームまたは赤血球細胞であり得、あるいはそれは細胞または細胞断片でさえあり得る。後記にてより詳細に議論するごとく、細胞が支持体として働く場合、MHCおよび援助分子は細胞によって産生され得る。次いで、MHC分子は、少なくとも膜貫通ドメイン、もしなければMHCの可溶性形態で存在しないであろう細胞質ドメイン、によって細胞に結合される。

MHC分子および援助分子の細胞外部分は、支持体上に固定化された抗体に反応するエピトープを供することによって支持体に結合できる。加えて、MHCまたは援助分子は、支持体の部分を形成することにおいてニッケルと反応する(His)<sub>6</sub>と共にまたはそれに結合して産生され得る。MHC分子を支持体に固定化するまたは結合する他の手段は当該分野でよく知られている。

前記で議論したごとく、支持体は細胞膜または細胞全体であり得る。かかる場合、T細胞リンパ球で用いる合成抗原-提示細胞系となるように真核生物細胞系を修飾する。説明を容易にするため、抗原-提示細胞(APC)を刺激体細胞(stimulator cells)とも呼ぶ。空のMHC分子は熱不安定である故に、培養細胞は変温性であるのが好ましく、種々の細胞系を後記にて詳細に議論する。

細胞の培養をまず確立する。次いで、培養を、プロモーターに作動可能に連結した発現可能クラスI MHC重鎖遺伝子でトランスフェクトする。遺伝子は、それがクラスI MHC重鎖を発現できるように選択する。また、細胞系を、第2のプロモーターに作動可能に連結した発現可能β-2ミクログロブリン遺伝子でトランスフェクトする。遺伝子は、それがMHC重鎖と共にMHC分子を形成するβ-2ミクログロブリンを発現できるように選択する。後記にて詳細に議論するごとく固体支持体等と共に使用されるMHC分子の可溶性細胞外部分の場合、トランケート型MHC重鎖遺伝子を用いる。

また、培養を、第3のプロモーターに作動可能に連結された発現可能援助分子遺伝子でトランスフェクトする。援助分子遺伝子は、T細胞リンパ球上の分子と相互作用する援助分子として発現され得る。後記するごとく、各これらの遺伝子は種々の方法を用いてトランスフェクトできるが、好ましい方法は2以上のプラスミドを用いることである。

トランスフェクトされた細胞系は導入されるべき遺伝子のうちの少なくとも1つを欠くので、それを選択する。昆虫細胞は、それが変温性であるのみならずこれらの遺伝子、およ

10

20

30

40

50

びペプチドに結合したMHC分子を産生するメカニズム、を欠くので有利である。これは、ペプチド-結合MHC分子の産生、および空のMHC分子の産生におけるより大きな制御を可能とする。MHC重鎖は、好ましくは、異なる種、より好ましくは哺乳動物のような恒温動物、最適にはヒトからのものである。

好ましい細胞系は、MHC重鎖の発現を制御するように誘導可能な第1のプロモーターを有する安定な変温性細胞系である。細胞が空のMHC分子を組み立て、それらをペプチドが所望ならば選択されるように細胞表面上に提示するのが好ましい。

得られたMHC分子はペプチドに結合し、ペプチドがMHC分子に結合した場合に該ペプチドに対してT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数にて細胞表面上の援助分子と共に存在させる。

10

さらなる実施態様において、第2の援助分子遺伝子も培養細胞にトランスフェクトする。この場合、第1の援助分子遺伝子は共刺激性分子の代わりになり得、第2の援助分子遺伝子は接着分子の代わりになり得る。

少なくとも1つの遺伝子、特にMHC重鎖は誘導性プロモーターに連結されているのが好ましい。これは、MHC分子が、注目するペプチドが利用可能であって、産生されたMHC分子と反応するように培養中に提示された場合にのみ産生されるようにMHC分子の産生を制御することを可能とする。これは望まないMHC分子/ペプチド複合体を最小化する。

細胞系が既に1以上の所望の分子を産生する場合、細胞で欠失する遺伝子の代わりに発現可能遺伝子で培養をトランスフェクトすることが必要なだけである。例えば、もし細胞がそれらの表面上にMHC分子を既に提示していれば、援助分子に代えて発現可能遺伝子で培養をトランスフェクトすることのみ必要である。

20

ペプチドは、細胞がMHC分子を産生しつつある時点で培養細胞に導入することができる。浸透圧ショックのごとき方法を通じて、ペプチドを細胞に導入し、産生されたMHC分子に結合させることができる。別法として、特に変温性細胞系の場合、MHC分子を細胞表面上に空で提示することもできる。次いで、ペプチドを培養に添加し、所望のMHC分子に結合することができる。

細胞はその表面にMHCおよび援助分子を有するものとして産生された後、それらを凍結乾燥し、細胞の断片を用いてT細胞リンパ球の集団を活性化することができる。

トランスフェクトされた培養細胞を用いて、MHC分子および援助分子の細胞外部分を産生することができる。固体支持体のごとき支持体と結合させた細胞外部分の使用は、産生のある利点を有する。生細胞を用いて合成抗原-提示細胞を提供する場合、少なくとも3種の遺伝子、すなわちMHC分子を産生するための2つの遺伝子および援助分子のための1つの遺伝子が細胞に導入されなければならない。しばしば、抗生物質耐性のためのごとき付加的遺伝子もトランスフェクトされる。

30

固体支持体系を使用すべき場合、1の細胞系は、もう1つの細胞系が援助分子の細胞外部分を産生しつつMHC分子の細胞外部分を産生できる。次いで、MHC分子部分および援助分子部分をそれらの各培養から収穫することができる。次いで、該分子を、ペプチドがMHC分子の細胞外部分に結合した場合に該ペプチドに対してT細胞リンパ球の集団を活性化するのに十分な数で適当な支持体に結合させる。産生の観点より、2つの異なる培養を用いることができるが、同一培養を用いることも可能である。しかしながら、該培養は援助分子の細胞外部分のためのさらなる遺伝子でトランスフェクトされる必要がある。この実施態様のさらなる変形は、発現可能な第2の援助分子遺伝子でトランスフェクトされた第3の培養細胞を提供することである。この例においては、第2の培養細胞は共刺激性分子の細胞外部分を産生し、一方、第3の培養細胞は接着分子の細胞外部分を産生する。接着分子部分を収穫し、支持体に結合させる。

40

また、本発明は、選択されたペプチドに対してCD8<sup>+</sup>T細胞を活性化する方法に関する。該方法はそれらの細胞表面上にペプチドを結合するMHC分子および援助分子を提示する細胞系を提供することに関する。天然CD8<sup>+</sup>T細胞は、治療すべき患者から取り出すことによって得ることができる。次いで、培養細胞をCD8<sup>+</sup>T細胞リンパ球を活

50

性化するのに十分な時間、 $CD8^+$ T細胞と接触させ、その結果、T細胞が増殖し、形質転換してアーム付きのエフェクター細胞となる。

次いで、活性化された $CD8^+$ T細胞を細胞系から分離し、許容される担体中に懸濁し、患者に投与することができる。別法は $CD8^+$ 細胞を活性化するための合成抗原－提示マトリックスの使用を含む。

ヒト遺伝子を用い、従って、ヒト分子アナログが産生されるのが好ましい。先行米国特許第5,314,813号に示されているごとく、マウス系はT細胞活性化の作動をテストする特に有用なモデルを提供し、ヒト系のためのプロセスの適用可能性を示す。また、Sykullevら、Immunity 1:15-22 (1994) 参照のこと。

#### 1. ヒト・クラスI MHC分子

クラスI MHC分子は重鎖および $\beta$ -ミクログロブリン蛋白質よりなる。本発明のヒト・クラスI MHC重鎖はHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-FおよびHLA-Gよりなる群から、より好ましくはHLA-A、HLA-BおよびHLA-Cよりなる群から選択される。重鎖は可溶性または不溶性いずれの形態にても有用である。可溶性（「sol」）形態において、停止コドン、膜貫通ドメインに先行させて選択されたHLA分子をコードする核酸配列に入れる。

適当な変異体を有する公知の確立された細胞系、例えば、形質転換細胞系JY、BM92、WIN、MOCおよびMGからヒト・クラスI MHC重鎖をコードするヌクレオチド配列を単離することが可能であるが、適当なプライマーを用い、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を介して遺伝子の部分からヌクレオチド配列を合成するのがより現実的である。この方法は、全長HLA cDNAをクローンするのに首尾よく用いられており；例えば、HLA-A25、HLA-A2、HLA-B7、HLA-B57、HLA-B51、およびHLA-B37についての配列は各々受託番号M32321、M32322、M32317、M32318、M32319およびM32320の下でGenBankデータベースに寄託されている。コンセンサス配列を含めた公知の部分的かつ推定的HLAアミノ酸および核酸配列は公表されており（例えば、ZemmourおよびParham、Immunogenetics 33:310-320 (1991) 参照）、HLA変異体を発現する細胞系は公知であって、同様に一般に入手可能であり、多くはAmerican Type Culture Collection（「ATCC」）から入手可能である。従って、PCRを用い、ヒト・クラスI MHCをコードするヌクレオチド配列を合成し、次いで、これをベクターに作動可能に連結させ、これを用いて適当な細胞を形質転換し、それで発現させることができる。

本発明のクラスI MHC重鎖、 $\beta$ -2ミクログロブリン蛋白質および助力分子（assisting molecules）を産生する特に好ましい方法は、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）でプライマーとして予め選択されたオリゴヌクレオチドを使用してここに記載するごとくPCR反応産物を形成させることに依拠する。遺伝子調製は、典型的には、プライマー伸長、好ましくはポリメラーゼ鎖反応（PCR）フォーマットにおけるプライマー伸長によって達成される。

もし遺伝子を（PCR）増幅によって産生させるべきならば、2種のプライマー、すなわちPCRプライマー対を増幅すべき核酸の各暗号鎖用に用いなければならない。（簡単のために、例示的HLA重鎖変異体配列の合成を議論するが、記載するPCR増幅方法は $\beta$ -2ミクログロブリン、共刺激性分子、接着分子、およびその完全な配列が現在知られていないものを含めた全てのHLA変異体の合成に同等に適用されることをはっきりと理解すべきである。）

第1のプライマーはアンチセンス（マイナスまたは相補的）鎖の部分となり、HLA（プラスまたは暗号）鎖の間で保存されたヌクレオチド配列にハイブリダイズする。暗号DNA相同体を産生するには、従って、第1のプライマーを選択してMHC遺伝子内の保存された領域、好ましくはコンセンサス配列または各HLA群内の同様の保存された領域、すなわち、HLA-A、HLA-B、HLA-C、および低ポリマー群HLA-E、-Fおよび-G内のコンセンサス配列にハイブリダイズさせる（すなわち、それらに相補的であ

10

20

30

40

50

る)。

第2のプライマーは暗号(プラス)鎖の一部となり、マイナス鎖内の保存されたヌクレオチド配列にハイブリダイズする。HLA-暗号DNA相同体を産生するには、従って、第2のプライマーを選択して、リーダーまたは最初のフレームワーク領域につきコードするその領域におけるごとくHLAをコードする遺伝子の5'末端の保存されたヌクレオチド配列とハイブリダイズさせる。コーディングDNA相同体の増幅において、第2のプライマーの保存された5'ヌクレオチド配列は、Lohら, *Science* 243:217-220 (1989)によって記載されているターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて外因的に付加された配列と相補的とし得る。第1および第2プライマーの一方または双方は、エンドヌクレアーゼ認識部位を規定するヌクレオチド配列を含

10

有できる。該部位は増幅すべき免疫グロブリン遺伝子に対して異種とでき、典型的には、プライマーの5'末端にまたはその近くにあるようである。RNAポリメラーゼの高代謝回転速度は、Chamberlinら, *The Enzymes*, P. Boyer編, 87-108頁, Academic Press, New York (1982)によって記載されているごとく出発ポリヌクレオチドを増幅させる。T7 RNAポリメラーゼのもう1つの利点は、Joyceら, *Nuc. Acid Res.*, 17:711-722 (1989)によって従前に記載されているごとく、cDNAの一部を1以上の突然変異誘発性オリゴデオキシヌクレオチド(ポリヌクレオチド)で置き換え、部分的にミスマッチの鋳型を直接転写させることによって、突然変異をポリヌクレオチド合成に導入することができる。転写に基づく増幅系はGingerasら, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, 245-252頁, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990)によって記載されている。

20

PCR増幅方法は米国特許第4,683,192号、第4,683,202号、第4,800,159号および第4,965,188号ならびに「PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification」, H. Erhlich編, Stockton Press, New York (1989); および「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」, Innisら編, Academic Press, San Diego, California (1990)を含めた少なくとも数種のテキストに詳細に記載されている。ここに使用される種々の好ましい方法およびプライマーを以後記載し、また例えばNilssonら, *Cell* 58:707 (1989), Ennisら, *PNAS USA* 87:2833-7 (1990)、およびZemmourら, *Immunogenetics* 33:310-20 (1991)に記載されている。特に、保存された配列を選択し、HLA対立遺伝子(例えば、-A、-B、-C、-E、-Fまたは-G対立遺伝子)の5'および3'非翻訳領域の比較からプライマーを設計するのが好ましい。また、制限部位を5'および3'プライマーに取り込んで、増幅産物が配列決定または発現ベクターにサブクローンされるのを可能とすることもできる。また、4-塩基スペーサー配列を制限部位の基部側に位置させて、酵素での増幅産物の切断の効率を改良するのが有用であろう。

30

40

以下のプライマーが、好ましくは別々の反応において、HLA-A、-B、-C、-E、-F、および-G cDNAの増幅で好ましい。次いで、得られたcDNAをクローンし、ここに記載するごとく配列決定することができる。これらのプライマーは、全ての公知のおよび現在知られていないタイプのHLAを増幅するのに用いるのに適する。

H L A    A

5' プライマー : 5'    C C    A C C    A T G    G C C    G

T C    A T G    G C G    C C C    3' (配列番号 1)

3' プライマー : 5'    G G    T C A    C A C    T T T    A

C A A G C T C T G A G 3' (配列番号2)

H L A B

5' プライマー : 5' C C A C C A T G C T G G

T C A T G G C G C C C 3' (配列番号3)

3' プライマー : 5' G G A C T C G A T G T G

10

A G A G A C A C A T C 3' (配列番号4)

H L A C

5' プライマー : 5' C C A C C A T G C G G G

T C A T G G C G C C C 3' (配列番号5)

20

3' プライマー : 5' G G T C A G G C T T T A

C A A G C G A T G A G 3' (配列番号6)

H L A E

5' プライマー : 5' C C A C C A T G C G G G

30

T A G A T G C C C T C C 3' (配列番号7)

3' プライマー : 5' G G T T A C A A G C T G

T G A G A C T C A G A 3' (配列番号8)

H L A F

5' プライマー : 5' C C A C C A T G G C G C

40

C C C G A A G C C T C 3' (配列番号9)

3' プライマー : 5' G G T C A C A C T T T A  
 T T A G C T G T G A G A 3' (配列番号 10)  
 H L A G

5' プライマー : 5' C C A C C A T G G C G C  
 C C C G A A C C C T C 3' (配列番号 11)

3' プライマー : 5' G G T C A C A A T T T A  
 C A A G C C G A G A G 3' (配列番号 12)

好ましい具体例において、第1および第2プライマーのただ一对を増幅反応当りに用いる。各々複数の異なるプライマー対を用いる、複数の異なる増幅から得られた増幅反応産物を次いで合わせる。しかしながら、また、本発明は、共一増幅（2対のプライマー使用）、および多重増幅（約8、9または10プライマー対を使用）を介するDNA相同体生産に関する。

好ましい具体例において、PCRプロセスは、種々のヒト・クラスIをコードするDNA分子を生産するのみならず、高度に多形のHLA遺伝子座で観察されるものに匹敵し得る突然変異を誘導し、あるいは単一の親クローンから多様性を創製し、それによりより大きな異種性を有するクラスI MHC分子をコードするDNA「ライブラリー」を供するため用いる。前記した変形を含めた突然変異に加えて、米国特許第4,683,195号に引用されており、米国特許第5,314,813号に議論されている。

## 2. DNA発現ベクター

本発明のベクターは、細胞中で自律複製可能な核酸（好ましくは、DNA）分子であり、それに、DNAセグメント、例えば遺伝子またはポリヌクレオチドを作動可能に連結させて、付着セグメントの複製を実行させることができる。ベクター配列に作動可能に連結させるべきヌクレオチドセグメントの1つは、哺乳動物クラスI MHC重鎖の少なくとも一部をコードする。好ましくは、MHC重鎖の全ペプチド暗号配列をベクターに挿入し、発現させる；しかしながら、いくつかの非暗号MHC配列も同様に含むベクターを構築することも可能である。好ましくは、MHCの非暗号配列は排除される。別法として、クラスI MHC重鎖の可溶性（「sol」）形態についてのヌクレオチド配列を利用することができ；「sol」形態は、それがアルファ3ドメインの末端または膜貫通ドメインの前に挿入された「停止」コドンを含む点で非-sol形態とは異なる。もう1つの好ましいベクターは、発現用のベクターに作動可能に連結した哺乳動物β-2ミクログロブリン分子の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含む。さらにもう1つの好ましいベクターは、発現用のベクターに作動可能に連結した哺乳動物助力分子の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含む。また、クラスI MHC重鎖およびβ-2ミクログロブリンおよび助力分子、またはこれらのいくつかの組合せをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを構築することも可能である。

好ましいベクターは、方向性連結に適合したヌクレオチドの配列を介して発現するために作動可能に連絡した1以上の翻訳可能なDNA配列を含むカセットよりなる。該カセットは、好ましくは、翻訳可能DNA配列が、方向性連結に適したヌクレオチドの配列を介してカセットに方向性よく挿入された場合に産生されるポリペプチドまたは蛋白質を発現するためのDNA発現制御配列を含む。また、カセットは、好ましくは、翻訳可能DNA配列の上流のプロモーター配列、および哺乳動物MHC重鎖配列から下流のポリアデニル化

10

20

30

40

50

配列を含む。また、該カセットは選択マーカを含むこともできるが、かかるマーカはもう1つの発現ベクター配列に作動可能に連結したヌクレオチド配列にコードされるのが好ましい。

本発明のカセットが作動可能に連結されるベクターの選択は、当業者によく知られているごとく、所望の機能的特性、例えば、ベクター複製および蛋白質発現、および形質転換すべき宿主細胞に直接依存し、これらは組換えDNA分子を構築する分野に固有の限定である。

種々の具体例において、MHC変異体および抗原性ペプチドを含めた、本発明で有用なポリペプチドの生産用にベクターを利用する。例示的ベクターは、BioRad Laboratories (Richmond, CA) から入手可能なプラスミドpUC8、pUC9、pUC18、pBR322およびpBR329、Pharmacia (Piscataway, NJ) から入手可能なpPLおよびpKK223、およびpBSおよびM13mp19 (Stratagene, La Jolla, CA) を含む。他の例示的ベクターはpCMUを含む (Nilssonら、Cell 58:707 (1989))。他の適当なベクターは公知の方法に従って合成することもできる；例えば、ここに種々の適用で使用するベクターpCMU/K<sup>h</sup>およびpCMUIIはpCMUIV (Nilssonら、前掲) の修飾である。

加えて、好ましくは、プロモーター配列をコードする翻訳可能ヌクレオチド配列の上流に配列がある。好ましくは、プロモーターは条件的である (例えば、誘導性)。ここに使用される好ましい条件的プロモーターはメタロチオネインプロモーターまたは熱ショックプロモーターである。

ベクターはよく知られたベクター構築技術のいずれかを利用して構築することができる。しかしながら、これらの技術は、宿主細胞のゲノムに挿入されるべき翻訳可能ヌクレオチド配列が適当なプロモーターによって本発明の変形と配列の「上流で」隣接する程度に修飾され、ある本発明の変形例では翻訳可能ヌクレオチド配列はポリアデニル化部位により「下流で」隣接される。これは、「宿主」細胞が昆虫細胞であって、ヌクレオチド配列がトランスフェクションを介して伝達される場合に特に好ましい。トランスフェクションは、リン酸カルシウム方法、DEAE-デキストラン法、安定な導入方法、エレクトロポレーションを含めた多数の方法を介して、あるいはリボソーム媒介法を介して達成できる。公知のトランスフェクション方法およびヌクレオチドを細胞に導入する他の手法を記載する多数のテキストが利用できる；例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1991) 参照。

ベクターそれ自体は、ウイルスベクター (RNAまたはDNA)、裸の直鎖または環状DNA、または核酸物質および細胞に挿入されるべきいずれかのポリペプチドを含有する小胞またはエンベロープのごときいずれの適当なタイプのものであってもよい。小胞に関しては、リボソームのごとき脂質小胞の構築のための技術がよく知られている。かかるリボソームは、リボソームの外部上の抗体または他の特異的結合性分子を提供するとき他の常法技術を用いて特定の細胞に対して標的化することができる。例えば、A, Huangら、J. Biol. Chem. 255:8015-8018 (1980) 参照。例えば、Kaufman, Meth. Enzymol. 185:487-511 (1990) 参照。

好ましい具体例において、ベクターは選択マーカも含有する。発現の後、翻訳可能ヌクレオチド配列の産物を、次いで、その配列に対する抗体を用いて精製することができる。選択マーカの1つの例はネオマイシン耐性である。pshhneo、pshneo、またはpcopneoのごときネオマイシン耐性をコードするプラスミドを、選択遺伝子 (類) を発現する細胞の集団が選択培地でトランスフェクタントを増殖させることによって確認できるように各トランスフェクションに含ませることができる。

本発明で用いる好ましいベクターはプラスミドである；より好ましくは、それは高コピー数プラスミドである。また、誘導性プロモーターは、(しばしば非天然またはキメラヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列を担持するように構築された)ベクターが導入された細胞に対する選択圧を限定する傾向にあるので、該ベクターは誘導性プロモーター配列を含有するのも望ましい。また、選択ベクターは選択宿主での発現に最良に適合するのが好ましい。もし宿主細胞集団が Drosophila 細胞培養物であれば、適合するベクターは p25-lacZ (Bell o および Couble, Nature 346; 480 (1990) 参照) または pRmHa-1、-2、または -3 (Bunch ら, Nucl. Acids Res. 16:1043-1061 (1988) 参照) のときものと機能的に同等のベクターを含む。好ましい具体例において、該ベクターは pRmHa-3 であり、これは図3に示す。このベクターはメタロチオネインプロモーターを含み、これは好ましくは、MHC 配列が挿入される部位の上流にあり、ポリアデニル化部位は好ましくは該MHC配列の下流にある。昆虫細胞、特に Drosophila 細胞が本発明で好ましい宿主である。Schn e i d e r 2 (S2) のとき Drosophila 細胞はプロモーターの活性化に必要なトランス-作用因子を有し、かくして、なおさらに好ましい。

発現ベクター pRmHa-3 は細菌プラスミド pRmHa-1 (図2) に基づき、その後者はプラスミド pUC18 をベースとし、受託番号 37253 を有し、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) に寄託されている。pRmHa-3 ベクターはプロモーター、R1 および Stu 部位が除去されたメタロチオネイン遺伝子の 5' 非翻訳リーダー配列 (配列 1-421、配列番号 13) を含有する。また、それはポリアデニル化部位を含めた Drosophila ADH 遺伝子 (配列 #6435-7270、配列番号 14) の 3' 部分も含有する。従って、クローン化 DNA はメタロチオネインプロモーターによって転写的に調節され、ポリアデニル化されている。pRmHa-1 プラスミドの構築は Bunch ら, Nucl. Acids Res. 16:1043-1061 (1988) に記載されている。pRmHa-3 および pRmHa-2 プラスミド (その後者は EcoRI 断片として除去し得るメタロチオネインプロモーター配列を有する) の構築は図1、2 および 3 に示す。本発明で使用するのに好ましいプラスミド pRmHa-3 に関しては、PstI、SphI および HindIII がプロモーター断片中にあり、従って、ユニークではない。Xba は ADH 断片中にあり (その 3' 末端から 4 塩基)、またユニークでない。しかしながら、以下の制限部位は pRmHa-3 でユニークである: EcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamHI、SalI、Ninc2、および AccI。

本発明の DNA 発現ベクターにおけるカセットは、翻訳可能 DNA 配列の挿入に際して、適当な宿主において、本発明の融合蛋白質を発現できるヌクレオチドの配列を形成するベクターの領域である。ヌクレオチドの発現-コンピテント配列をシストロンという。かくして、カセットは、好ましくは、1 以上の翻訳可能 DNA 配列に作動可能に連結した DNA 発現制御エレメントよりなる。翻訳可能 DNA 配列がその目的に適合したヌクレオチドの配列を介して、制御エレメントの間に方向性よく挿入された (方向性よく連結された) 場合にシストロンが形成される。得られた翻訳可能 DNA 配列、すなわち挿入配列は、好ましくは、適当なリーディングフレームに作動可能に連結される。

DNA 発現制御配列は、構造遺伝子産物用の DNA 発現シグナルの一組よりなり、よく知られているように、シストロンが構造遺伝子産物を発現できるように、該シストロンに作動可能に連結された 5' および 3' エレメント双方を含む。5' 制御配列は転写を開始するためのプロモーターおよび上流の翻訳可能 DNA 配列の 5' 末端に作動可能に連結されたりボソーム結合部位を規定する。

かくして、本発明の DNA 発現ベクターは、カセット部分に翻訳可能 DNA 配列をクローンして、本発明の融合蛋白質を発現できるシストロンを得るための系を提供する。

### 3. 細胞系

本発明の好ましい細胞系は培養中で連続的に増殖でき、その細胞の表面に哺乳動物クラス I MHC 分子および助力分子を発現できる。細菌、酵母、昆虫および哺乳動物細胞系を含めた種々の形質転換および非形質転換細胞または細胞系のいずれもこの目的に適する。

(例えば、種々の細胞系、他えば、E. coli および S. cerevisiae を培養

10

20

30

40

50

しそれを使用する要約および手法については、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1991) 参照)。

好ましくは、細胞系は真核細胞系である。より好ましくは、細胞系は変温性である(すなわち、哺乳動物細胞系よりも温度攻撃に対して感受性が低い)。より好ましくは、それは昆虫細胞系である。ガ(ATCC CCL80)、アワヨトウ(ATCC CRL 1711)、カ幼虫(ATCC系CCL 125、CCL 126、CRL 1660、CRL 1591、CRL 6585、CRL 6586)およびカイコ(ATCC CRL 8851)を含めた種々の昆虫細胞系が本発明の使用に入手できる。好ましい具体例において、細胞系はSchneider 2 (S2) 細胞系(S2/M3)のごときDrosophila細胞系であり(Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27:353-365 (1972) 参照。); 好ましくは、細胞系はM3培地での増殖に適したSchneider 2 (S2) 細胞系(S2/M3)である(Lindquistら, Drosophila Information Service 58:163 (1982) 参照)。

Schneider細胞は実質的には以下のごとくに調製できる。Drosophila melanogaster (Oregon-R) 卵を約4時間間隔にわたって収集し、2.5%水性次亜塩素酸ナトリウム中で脱塩素化し、70%エタノール中に20分間浸漬することによって表面滅菌し、続いて70%エタノール中の0.05%HgCl<sub>2</sub>中でさらに20分間浸漬することによって表面滅菌する。滅菌蒸留水中で徹底的にすすいだ後、予め共に培地で湿らせたMilliporeプレフィルターで裏打ちした滅菌Metricel黒色フィルターを含有するペトリ皿に卵を移す。卵を一晩22℃のインキュベーターに入れ、20-24時間経ってから培養のために取り出す。胚を各半分または1/3に切断し、次いでRinaldini塩溶液(Rinaldini, Nature (London) 173:1134-1135 (1954))中の0.2%トリプシン(1:250、Difco)に室温で20-45分間入れる。100-300の胚を用いて各培養を開始する。

胎児ウシ血清(FBS)の添加の後、断片を100×gにて2-3分間遠心し、1.25ml培養培地に再懸濁し、ガラスT-9フラスコに接種する。雰囲気空気的气体相にて、培養を約22-27℃±0.5℃に維持する。さらに100ml培地当たり500mgの細菌学的ペプトンを含有し、15%不活化FBSを補足したSchneiderの培養基(Schneider, J. Exp. Zool. 156:91-104 (1964); Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 15:271-279 (1966))が好ましく使用される。pH(好ましくは、6.7-6.8)を0.01%フェノールレッドでモニターする。細胞系は、好ましくは、3-7日ごとに継代培養することによって維持する。細胞はガラスに容易に付着するが、トリプシン処理が必要なほどはしっかりと付着しない;典型的には、単純なビベティングがほとんどの細胞をフラスコの底から流すのに適する。細胞の形態学的外観はSchneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27:353-365 (1972)に記載されている。それらは、外観が実質的に上皮細胞様であり、直径が5-11μm、長さが11-35μmの範囲である。丸い細胞を含有する小さなポケットを他の細胞全体にランダムに分配させることができる。

好ましくは、Schneider 2 (S2) 細胞はSchneiderのDrosophila培地+ペニシリン(100ユニット/ml)およびストレプトマイシン(100mg/ml)含有する10%FBS中に維持する。細胞を $0.5 \times 10^5$ /mlを超える密度で維持し、それを24-30℃の温度範囲で増殖させるのが好ましい。細胞は24時間未満で倍化し、増殖して高細胞密度、すなわち約 $2 \times 10^7$ /mlまたはそれ以上となる傾向がある。また、細胞を後の使用または分析のために90%FBSおよび10%DMSO中で凍結することもできる。細胞を-70℃に置き、次いで、液体窒素中で保存することができる。

10

20

30

40

50

Schneider 2 (S2) と確認される本発明による好ましい細胞系は、ブダペスト条約に基づき、1992年2月18日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託し、受託番号CRL10974が付与された。本発明の細胞は、各々発現ベクターに挿入された（すなわち、作動可能に連結された）、（ヒト）MHC重鎖、 $\beta$ -2ミクログロブリンおよび1以上の助力分子をコードするcDNAでトランスフェクトする。より好ましい具体例において、ベクターは、ヒト・クラスI MHC重鎖、ヒト $\beta$ -2ミクログロブリンまたはヒト助力分子をコードする発現可能ヌクレオチド配列がここに開示する技術を用いて挿入されたDrosophila発現プラスミドpRmHa-3よりなる。好ましくは、MHC重鎖をコードするcDNA、 $\beta$ -2ミクログロブリンをコードするcDNA、および助力分子をコードするcDNAは別の発現プラスミドに作動可能に連結し、培養細胞に共トランスフェクトする。別法として、MHC重鎖、 $\beta$ -2ミクログロブリンおよび助力分子をコードするcDNAは同一発現プラスミドに作動可能に連結させ、その同一プラスミドを介して共トランスフェクトすることもできる。もう1つの変形において、MHC重鎖、 $\beta$ -2ミクログロブリン、助力分子、およびIL-2のごときサイトカインをコードするcDNAを発現プラスミドに作動可能に連結し、本発明の細胞系に共トランスフェクトする。HLA遺伝子の選択、適当なベクターの構築およびプライマー選択は前記により詳しく記載されている。

うまく形質転換された細胞、すなわち本発明の発現可能ヒトヌクレオチド配列を含有する細胞はよく知られた技術を介して同定できる。例えば、本発明のcDNAまたはrDNAの導入から得られる細胞をクローン化して、モノクローナルコロニーを得ることができる。それらのコロニーから細胞を収穫し、溶解し、それらのDNA含有量をSouthern, J. Mol. Biol. 98:503 (1975) によって記載されているもののごとき方法を用いて、rDNAの存在につき調べる。rDNAの存在についての直接的アッセイに加えて、形質転換またはトランスフェクションの成功は、rDNAが対象キメラポリペプチドを直接発現できる場合はよく知られた免疫学的方法によって確認することができる。例えば、発現ベクターで首尾よく形質転換された細胞は、適当な抗体を用いて容易に測定される特定の抗原特性を呈する蛋白質を産生することができる。加えて、成功した形質転換／トランスフェクションは前記したごときネオマイシン耐性のごときマーカー配列を担持するさらなるベクターの使用を介して確認することができる。

また、培養物は安定で低温で保持された増殖が可能であるのが好ましい。例えば、培養物をほぼ室温で、例えば24-27°Cで維持するのが好ましい。他の具体例において、特にCD8<sup>+</sup>細胞を活性化するプロセスの間、培養物を高温に維持するのが好ましい。かくして、本発明による培養物は約30°Cないし約37°Cの温度攻撃に耐えることができるのが好ましい。 $\beta$ -2ミクログロブリンの培養物への添加はクラスI MHCを少なくとも30°Cの攻撃まで安定化させ； $\beta$ -2ミクログロブリンおよびペプチドの添加の結果、より高い温度、すなわち37°Cでより大きな熱安定性となる。

空の、より好ましくはペプチド-結合したMHC分子の発現のための培養物を調製するには、培養物は、例えば、CuSO<sub>4</sub>誘導を介して、所定の時間の刺激をまず要するであろう。適当な誘導時間、例えば、約12-48時間の後、ペプチドを所定の濃度（例えば、約100  $\mu$ g/ml）で添加することができる。後記するごとくペプチドを調製することができる。さらなるインキュベーション時間、例えば27°Cにおける約12時間の後に、培養物はCD8<sup>+</sup>細胞の活性化で使用される。このさらなるインキュベーション時間は短縮化あるいは恐らくは省略することができるが、もし休止または天然CD8<sup>+</sup>細胞の添加に先立った時間の間、インキュベートさせれば、培養物は温度攻撃に対して益々安定となる傾向がある。例えば、ペプチドが添加された本発明による培養物は、37°Cで延長された時間インキュベートした場合でさえ、かなりの量のペプチド-負荷クラスI MHC分子を発現できる。

形質転換宿主細胞を培養するにおいて有用な栄養培地は当該分野でよく知られているか、あるいは多数の商業的入手源から得ることができる。宿主細胞が哺乳動物である具体例においては、「無血清」培地が好ましくは使用される。

10

20

30

40

50

#### 4. ヒト $\beta$ -2 ミクログロブリンおよび助力分子

治療上有用な量の表面発現されたヒト・クラス I MHC 分子を産生できる細胞系を確立するためには、 $\beta$ -2 ミクログロブリンをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結したベクターで本発明による細胞系を共トランスフェクトして、該細胞系においてヒト MHC 分子の適当なレベルの発現を行うのが好ましい。マウス  $\beta$ -2 ミクログロブリンのごとき哺乳動物  $\beta$ -2 ミクログロブリンをコードするヌクレオチド配列は本発明の細胞系において発現されるヒト・クラス I MHC 分子の安定性を増大させるが、ヒト  $\beta$ -2 ミクログロブリンをコードする発現可能ヌクレオチド配列に作動可能に連結したベクターで細胞系を共トランスフェクトするのが好ましい。

前記したごとく、本発明による好ましいベクターは、発現用のベクターに作動可能に連結した哺乳動物  $\beta$ -2 ミクログロブリン分子の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含む。助力分子のための遺伝子を同一またはもう 1 つのベクターに連結させることができる。また、クラス I MHC 重鎖および  $\beta$ -2 ミクログロブリンを共にコードするヌクレオチド配列を含むベクターを構築することもできる。

助力分子で使用する配列決定およびプライマーは後記にてより詳しく記載する。しかしながら、プロトコルは同様である。

ヒト  $\beta$ -2 ミクログロブリン cDNA 配列は公表されており (Suggs ら, PNAS 78:6613-17, 1981 参照)、以下のプライマーを用い、該配列をポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 用の鋳型として用いた。

##### 5' プライマー

5' G C T T G G A T C C A G A T C T A C C A T G T C T C

G C T C C G T G G C C T T A G C T G T G C T C G C G C T

A C T C T C 3'

(配列番号 15)

##### 3' プライマー

5' G G A T C C G G A T G G T T A C A T G T C G C G A T

C C C A C T T A A C 3'

(配列番号 16)

プライマーは標準的な PCR 反応で使用する (前記およびそれで引用された文献参照)。反応産物をフェノールで抽出し、GeneClean キット (Bio 101, San Diego, CA) を用いて精製し、BamHI で消化し、pBS (Stratagene, La Jolla, CA) の BamHI 部位にクローン化する。配列の確認の後、この BamHI 断片を適当な発現ベクターの BamHI 部位にクローン化する。好ましい具体例において、ヒト  $\beta$ -2 ミクログロブリン cDNA を合成し、発現ベクター pRmHa-3 に作動可能に連結させる。

#### 5. ペプチド

ウイルス抗原に加えて実質的に全ての細胞蛋白質を用いて、可能なクラス I MHC リガンドとして働く関連ペプチド断片を生成することができる。従って、ほとんどの哺乳動物

10

20

30

40

50

細胞において、いずれの特定のMHCペプチド複合体も、細胞表面に見い出される全MHCコード分子の小さな割合しか表さないであろう。従って、CD8<sup>+</sup>細胞を特異的に活性化させる増大した能力を有する表面発現されたヒト・クラスI MHC分子を生成させるためには、適当なサイズでクラスI分子への抗原性特性を持つペプチド断片を単離し負荷するのが好ましい。

本発明のペプチドはクラスI MHC分子に結合する。結合はイン・ビトロと同様にイン・ビボで作成できる生物学的条件下で起こる。ペプチドの結合の正確な性質は本発明の実施では知られている必要はない。

好ましい具体例において、クラスI MHC分子に負荷されるべきペプチドは抗原性である。また、ペプチドは均一サイズ、好ましくは8-量体または9-量体、最も好ましくは8-量体であるのが好ましい。また、MHC分子へ負荷するために調製したペプチドは単一の種であるのが、すなわち、MHCに負荷される全てのペプチドはサイズおよび配列が同一であるのが好ましい。このようにして、モノ抗原性ペプチドを負荷したMHC分子を産生することができる。

10

ペプチドは種々の手段を介して細胞に提示することができる。好ましくは、ペプチドはそれをペプチドの細胞内プールに侵入させるように提示する。例えば、ペプチドを浸透圧負荷を介して提示することができる。典型的には、ペプチドを培養基に添加する。ペプチドは完全なポリペプチドまたは蛋白質の形態で培地に添加することができ、これを引き続いて細胞プロセスを介して、例えば酵素的分解を介して分解させる。別法として、完全なポリペプチドまたは蛋白質は、細胞培養物へのその添加に先立って、化学分解（例えば、臭化シアノゲン）またはプロテアーゼ（例えば、キモトリプシン）のごときいくつかの他の手段を介して分解することもできる。他の具体例において、ペプチドは、エピトープアミノ酸配列よりなるものでも、あるいはなるものでないものでもより小さいセグメントにて提示される。

20

好ましい具体例において、十分量の蛋白質（類）またはペプチド（類）を細胞培養物に添加して、クラスI MHC分子を結合させ、引き続いて、本発明のヒト・クラスI MHC-発現細胞の表面に、好ましくは各MHCに付着した同一種のペプチドと共に、高密度のペプチドを提示する。また、MHC分子にペプチドを細胞内で提示する前に、ヒト・クラスI MHC重鎖およびヒトβ-2ミクログロブリンを結合させる、すなわちヘテロダイマーを形成させるのが好ましい。

30

本発明のもう1つの具体例において、ペプチドを本発明のトランスフェクトされた細胞に添加して、細胞によって発現されるMHC分子の熱安定性を増強させる。前記したごとく、ペプチドは、好ましくは、培養基に添加する。クラスI分子に結合する抗原性ペプチドはMHC分子を熱安定化させ、また細胞表面発現を増加させるように働く。MHC分子に結合するペプチドが添加された培養物は、かくして、ペプチド無添加の培養物よりも温度攻撃に対してかなり感受性が低い。

本発明の1の具体例において、抗原性ペプチドを種々の形態で形質転換／トランスフェクト細胞系に提示する。例えば、全蛋白質または他の抗原性ポリペプチドを化学的にまたは酵素的に分解させることができ、例えば、この形態で細胞系に添加することができる。例えば、当該蛋白質をキモトリプシンで分解し、得られたペプチド「断片」の混合物を形質転換またはトランスフェクトされた細胞培養物に添加する；次いで、これらの細胞により（しばしば、より小さいペプチド、好ましくは8-量体または9-量体である）適当なペプチドを「選択」せしめて、クラスI MHC分子に負荷する。別法として、全蛋白質またはポリペプチド配列を適当なベクターにクローン化し、真核細胞に挿入し、それにより細胞は有意量の抗原性ポリペプチドを生成し、このポリペプチドを次いで収穫し、精製し、ペプチドへと消化し、次いで、ペプチドを形質転換／トランスフェクト真核細胞培養物に添加する。細胞により再度、発現されたMHCに負荷すべきペプチドを「選択」させる。

40

## 6. 休止または前駆体CD8<sup>+</sup>細胞の単離

休止（または天然もしくは前駆体）CD8<sup>+</sup>細胞、すなわち特定の抗原を標的化するよう

50

に活性化されていないT-細胞を、好ましくは、本発明の形質転換培養物と共にCD8<sup>+</sup>細胞インキュベートする前に患者から抽出する。また、前駆体CD8<sup>+</sup>細胞は、特異的に活性化されるCD8<sup>+</sup>細胞の能力に干渉し得る他の治療または療法の開始に先立って患者から採取するのが好ましい。例えば、もし新生物または腫瘍を持つ個体を治療しようと思図するならば、化学療法または照射処置の開始に先立って細胞および培養物を得るのが好ましい。

リンパ球を抽出し、培養する方法はよく知られている。例えば、Rosenbergに対する米国特許第4,690,915号は、リンホサイトフォレシスを介する多数のリンパ球を得る方法を記載している。使用する適当な培養条件は哺乳動物細胞についてのものであり、これは典型的には37℃で行う。

また、種々の方法が前駆体CD8<sup>+</sup>細胞の培養を分離しおよび／または富化させるのに適する。細胞分離のための一般的方法のいくつかの例は、特異的被覆表面への細胞の間接的結合を含む。もう1つの例において、CD8<sup>+</sup>細胞を含むヒト末梢血液リンパ球(PBL)を、Ficoll-Hypaque勾配遠心(Pharmacia, Piscataway, NJ)によって単離する。しかる後直ちにPBLリンパ芽球を用いることができるか、あるいは10%DMSOを含有するPBS(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中で凍結した後、液体窒素中で貯蔵することができ、これは細胞の生存性およびリンパ球の機能を保存する。

前駆体細胞の培養物を分離しおよび／または富化させる別の方法は、陽性および陰性選択手法を共に含む。陽性選択では、リンパ球-富化PBL集団を全血から調製した後、CD8<sup>+</sup>リンパ球の亜集団をCD8受容体抗原の存在に向けられるアフィニティーベースの分離技術によってそれから単離する。これらのアフィニティーベースの技術はフロレスサンス-活性化細胞ソーティング(FACS)等のフローマイクロフルオロメトリー、細胞接着および同様の方法を含む。(例えば、ScherおよびMage, Fundamental Immunology, W. E. Paul編, 767-780頁, River Press, NY(1984)参照)。アフィニティー方法はアフィニティー試薬ソースとして抗-CD8受容体抗体を利用することができる。別法として、CD8受容体の天然リガンド、またはリガンド類似体をアフィニティー試薬として用いることもできる。これらの方法で用いる種々の抗-T細胞および抗-CD8モノクローナル抗体は、American Type Culture Collection(Rockville, MD)およびPharmingen(San Diego, CA)を含めた種々の商業的入手源から一般に入手できる。

陰性選択手法は、CD8<sup>+</sup>集団から非-CD8の除去を行うのに利用される。この技術の結果、ロイコフォレシス処理した患者のT-およびB-細胞集団からCD8<sup>+</sup>細胞が富化される。抗原提示に応じて、異なる抗体が適当であろう。(命名法の議論およびレビュー、抗原命名、およびT-細胞を含めたヒト初血球についての割り当てられた抗体については、Knappら, Immunology Today 10:253-258(1989)およびJanewayら, Immunobiology, 前掲参照)。例えば、モノクローナル抗体OKT4(抗-CD4、ATCC番号CRL 8002)、OKT5(ATCC番号CRL 8013および8016)、OKT8(抗-CD8、ATCC番号CRL 8014)、およびOKT9(ATCC番号CRL 8021)は細胞系およびハイブリドーマのATCCカタログ(ATCC, Rockville, MD)中、各々、ヒトTリンパ球、ヒトT細胞サブセット、および活性化T細胞と反応性であることで同定される。種々の他の抗体がT細胞種を同定し単離するのに入手できる。

さらなる具体例において、CD8<sup>+</sup>細胞は陽性および陰性両選択手法を組み合わせることによって単離できる。(例えば、CaiおよびSprent, J. Exp. Med. 179:2005-2015(1994)参照)

好ましくは、次いで、PBLを精製する。例えば、Ficoll勾配をこの目的で利用できる。精製されたPBLを、次いで、適当な抗原性ペプチドと共にプレインキュベートした同系Drosophila細胞と混合する。

10

20

30

40

50

## 7. CD8<sup>+</sup>細胞のイン・ビトロ活性化

特異的細胞毒性T細胞の生成のためのイン・ビトロ条件を最適化するために、抗原提示細胞の培養物を適当な培地中に維持する。好ましい具体例において、抗原提示細胞は Drosophila 細胞であり、これは好ましくは無血清培地（例えば、Exel 1400）中に維持する。

活性化すべき細胞、例えば前駆体CD8<sup>+</sup>細胞と共に抗原提示細胞をインキュベートするに先立って、一定量の抗原ペプチドを、抗原提示細胞の表面で発現させるべきヒト・クラスI分子に負荷させるのに十分な量抗原提示細胞培養物に添加する。本発明によると、十分量のペプチドは、約200ないし約500,000、好ましくは約200ないし1,000またはそれ以上の、ペプチドが負荷させたヒト・クラスI MHC分子が各抗原提示細胞の表面で発現されることを可能とする量である。好ましくは、抗原提示細胞を>20 μg/ml ペプチドと共にインキュベートする。

次いで、休止または前駆体CD8<sup>+</sup>細胞を、CD8<sup>+</sup>細胞の集団を活性化し、それにつきさらに富化させるのに十分な時間、適当な抗原提示細胞と共に培養物中でインキュベートする。好ましくは、かくして、CD8<sup>+</sup>細胞は抗原特異的に活性化されるはずである。抗原提示細胞に対する休止または前駆体CD8<sup>+</sup>（エフェクター）細胞の比は個体間で変化し得、培養条件に対する個体のリンパ球の受容可能性ならびに記載内の処置様式が用いられる病気状態または他の条件の種類および重症度のごとき変数にさらに依存し得る。しかしながら、好ましくは、リンパ球：抗原提示細胞（例えば、Drosophila 細胞）比は好ましくは約30：1ないし300：1の範囲である。例えば、1の具体例において、 $3 \times 10^7$  ヒトPBLおよび $1 \times 10^6$  生Drosophila細胞を混合し、20 mlのRPMI 1640培養基中で維持した。

エフェクター／抗原提示培養を、治療上使用するまたは有効な数のCD8<sup>+</sup>細胞の集団につき、活性化し富化させるのに必要なだけの長さの時間維持する。一般に、最適時間は約1日および5日の間であり、「プラトー」、すなわち「最大」特異的CD8<sup>+</sup>活性化レベルは一般に培養の5日後に観察される。本発明の1の具体例において、CD8<sup>+</sup>細胞のイン・ビトロ活性化は細胞系のトランスフェクション後短時間内に検出される。1の具体例において、CD8<sup>+</sup>細胞を活性化できるトランスフェクト細胞における一過性発現はトランスフェクションから48時間内に検出可能である。これは、ヒト・クラスI MHCを発現する形質転換細胞の安定なまたは一過性培養物はCD8<sup>+</sup>細胞を活性化するにおいて効果的であることを明らかに示す。

好ましくは、CD8<sup>+</sup>細胞の富化および合致した活性化は抗原提示細胞への暴露の1週間内に最適である。しかる後、好ましい具体例において、富化され活性化させたCD8<sup>+</sup>細胞を、部位制限、抗体赤血球細胞調製物の再セッティング、カラムクロマトグラフィー等によってさらに精製する。精製に続き、得られたCD8<sup>+</sup>細胞調製物を $10^9$ 活性化CD8<sup>+</sup>細胞の集団を得るのに十分な時間、培養中に維持することによってさらに増殖させる。この時間は細胞の複製時間に依存して変化し得るが、一般に14日である。CD8<sup>+</sup>細胞の活性化および増殖はRiddellら、Cur. Opin. Immunol., 5:484-491 (1993)によって記載されている。

## 8. CD8<sup>+</sup>細胞のDrosophila細胞からの分離

活性化CD8<sup>+</sup>細胞は種々の公知の方法のうちの1つを用いて刺激体（例えば、Drosophila）細胞から効果的に分離することができる。例えば、刺激体細胞に、刺激体細胞上に負荷させたペプチドに、またはCD8<sup>+</sup>細胞（またはそのセグメント）に特異的なモノクローナル抗体を利用して、それらの適当な相補的リガンドに結合させることができる。次いで、適当な手段を介して、例えばよく知られた免疫沈降またはイムノアッセイ法を介して、抗体標識細胞を刺激体エフェクター細胞混合物から抽出することができる。

## 9. 活性化CD8<sup>+</sup>細胞の投与

有効・細胞毒性の量の活性化CD8<sup>+</sup>細胞は、イン・ビトロおよびイン・ビボ使用の間で変化し得、同様に、これらのキラー細胞の最終標的である細胞の量およびタイプで変化し

10

20

30

40

50

得る。また、該量は患者の状態に応じて変化し、実行者による全ての適当なファクターの考慮を介して決定されるべきである。しかしながら、マウスで使用される約  $5 \times 10^6$  –  $5 \times 10^7$  細胞と比較して、好ましくは、約  $1 \times 10^6$  ないし約  $1 \times 10^{12}$ 、より好ましくは約  $1 \times 10^8$  ないし約  $1 \times 10^{11}$ 、さらにより好ましくは約  $1 \times 10^9$  ないし約  $1 \times 10^{10}$  の活性化された CD8<sup>+</sup> 細胞を成人ヒトで利用する。

好ましくは、前記したごとく、活性化 CD8<sup>+</sup> 細胞は処置されるべき個体への CD8<sup>+</sup> 細胞の投与に先立って Drosophila 細胞培養から収穫される。しかしながら、他の現存の提案されている処置方法とは異なり、本方法は腫瘍形成性でない細胞培養系（すなわち、Drosophila 細胞）を用いることに注意するのは重要である。従って、哺乳動物腫瘍－促進性細胞の投与は極端に有害であるが、もし Drosophila 細胞およびかつ成果 CD8<sup>+</sup> 細胞の完全な分離が達成されなくても、少数の Drosophila 細胞の投与に伴うことが知られている固有の危険はない。

細胞成分を再導入する方法は当該分野で知られており、Honsikらに対する米国特許第 4, 844, 893 号および Rosenberg に対する米国特許第 4, 690, 915 号に例示されているもののごとき手法を含む。例えば、静脈内注入を介する活性化 CD8<sup>+</sup> 細胞の投与が適当である。

#### 10. H L A タイプ分け

前記したごとく、H L A ハプロタイプ／アロタイプは個体間で変化し、他方、本発明の実施には個体の H L A タイプを決定するのは必須ではないが、それはしばしば助けとなる。H L A タイプは標準的なタイプ分け手法および F i c o l l 勾配によって精製された P B L を介して決定できる。次いで、精製した P B L を、適当な抗原性ペプチド、例えばウイルス感染、癌、または悪性疾患に関連する治療適用における、ウイルス－または癌－特異的蛋白質に由来するペプチドと共にプレインキュベートした同系 Drosophila 細胞と混合する。

特定のウイルス－または癌－特異的抗原のペプチドが特徴付けられている場合において、例えばウイルスまたは悪性を継続して使用して、これらのエピトープをコードする合成ペプチドが好ましく使用される。好ましい抗原性ペプチドが正確に決定されていない場合において、ウイルス－または癌－特異的蛋白質のプロテアーゼ消化物を使用できる。かかる抗原のためのソースとして、ウイルス－または癌－特異的蛋白質をコードする c D N A を細菌発現プラスミドにクローン化し、それを用いて、例えばここに開示する方法を介して細菌を形質転換する。

H L A のタイプ分けの後、もし好ましい H L A を発現する Drosophila 細胞が得られない場合、ポリメラーゼ鎖反応の使用を介して、好ましい H L A をコードする c D N A をクローン化できる。前記 B. 1 節に記載したプライマー（配列番号 1 ないし配列番号 12）を用いて、別々の反応にて適当な H L A – A、– B、– C、– E、– F、または – G c D N A を増幅し、次いで、後記 A 2. 1 に開示した方法にて記載するごとく、これをクローン化し、配列決定する。次いで、クローン化 H L A を発現する安定な細胞系を Drosophila 細胞で確立することができる。別法として、P C R 反応からクローン化組換え分子の大集団を一過的に発現する昆虫細胞の集団をイン・ビトロ CD8<sup>+</sup> 活性化で用いることができる。

#### 実施例

以下の実施例は本発明を説明するもので、それを限定するものではない。

#### 実施例 1

##### ヒト・クラス I M H C 分子の発現

##### A. p R m H a – 3 発現ベクターの調製

本発明で記載された Drosophila S c h n e i d e r 2 (S 2) 細胞で M H C 蛋白質を発現させるのに用いられる p R m H a – 3 発現ベクターは、S p h I 線状化 p R m H a – 1 D N A 発現ベクターと、後記する p R m H a – 2 発現ベクターの S p h I 制限消化物から得られた D N A 断片を連結することによって構築された。p R m H a – 1 と p R m H a – 2 断片とのこのような連結を行って、p R m H a – 1 に存在する 2 つの E c

10

20

30

40

50

o R I 制限エンドヌクレアーゼクロニング部位のうちの1つを除去した。かくして、得られた p R m H a - 3 発現ベクターは、種々の M H C - コーディング D N A 断片が実施例に記載されるごとくに挿入された多重クロニング部位（ポリリンカー）中に1つの E c o R I 制限部位のみを含有した。

#### 1. p R m H a - 1 発現ベクターの調製

メタロチオネインプロモーター、金属応答コンセンサス配列（MTと命名）および D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r から単離されたポリアデニル化シグナルを含有するアルコールデヒドロゲナーゼ（A D H）遺伝子を含む p R m H a - 1 発現ベクターは B u n c h ら, N u c l . A c i d s R e s . 1 6 : 1 0 4 3 - 6 1 ( 1 9 8 8 ) によって記載されているごとくに構築した。最終 p R m H a - 1 構築体の概略を図 2 に示す。A T C C 受託番号 3 7 2 5 3 を有するプラスミド発現ベクター p U C 1 8 を、それから続いてのここに記載するベクターが得られる源ベクターとして用いた。p U C 1 8 プラスミドは多重クロニング部位に 5 ' から 3 ' にかけて以下の制限部位を含有し、その全ては図 1 の p U C 1 8 - 由来ベクターの模式的表示に示していない：E c o R I ; S a c I ; K p n I ; 同一位置に存在する S m a I および S m a I ; B a m H I ; X b a I ; S a l I ; 同一位置に存在する A c c I および H i n c I I ; P s t I ; S p h I および H i n d I I I 。まず、p U C 1 8 ベクターを H i n d I I I で消化して線状化 p U C 1 8 を形成させた。次いで、M a n i a t i s ら編, M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , N e w Y o r k ( 1 9 8 2 ) によって記載されているごとく、H i n d I I I 末端を D N A ポリメラーゼ I 大断片で満たすことによって平滑末端を生成させた。

得られた線状化平滑末端 p U C 1 8 ベクターを、ポリアデニル化シグナルを含有する D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r A D H 遺伝子からの 7 4 0 塩基対（b p）H i n f I 断片と連結した。H i n f I での消化、続いてのクレノウでの末端平滑化によって、連結した A D H 対立遺伝子をまず G o l d b e r g ら, P N A S U S A 7 7 : 5 7 9 4 - 5 7 9 8 ( 1 9 8 0 ) によって記載されているプラスミド p S A C I から単離し、配列番号 1 4 にリストされたヌクレオチド配列が得られた。ランダムな高分子量（1 5 k b を超える）を含有するバクテリオファージラムダライブラリーから選択された D r o s o p h i l a D N A の 4 . 7 キロベース（k b）E c o R I 断片を p B R 3 2 2 （A T C C 受託番号 3 1 3 4 4）にサブクローンすることによって、A D H 対立遺伝子を含有する p S A C I ベクターを構築した。5 ' H i n f I 制限部位が、K r e i t m a n , N a t u r e 3 0 4 : 4 1 2 - 4 1 7 ( 1 9 8 3 ) によって記載されているごとく、1 7 7 0 位に A D H 遺伝子で天然に生じた。3 ' H i n f I 部位は、A D H 遺伝子がクローン化された p U C 1 8 ベクターから得られた。この位置は A D H 遺伝子の 2 5 0 0 位の X b a I 部位から 4 塩基 3 ' 側であった。A D H セグメントは、A D H m R N A の 3 ' 非翻訳部分におけるポリアデニル化／切断配列の 3 5 b p 上流からポリアデニル化シグナルの 7 0 0 b p 下流まで伸びた。A D H 遺伝子断片を含有する得られた p U C 1 8 - 由来ベクターを図 1 に示すごとく p H A - 1 と命名した。

4 2 1 b p E c o R I / S t u I M T 遺伝子断片は、D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r のゲノム D N A ライブラリー中のほぼ 1 5 . 3 k b の D N A を含有するクローンから得られた。成熟 D N A の M b o I 部分消化で調製された該ライブラリーをラムダ誘導体 E M B L 4 にクローン化した。該断片は D r o s o p h i l a M T 遺伝子の M T プロモーターおよび金属応答コンセンサスエレメントを含有した（M a r o n i ら, G e n e t i c s 1 1 2 : 4 9 3 - 5 0 4 ( 1 9 8 6 )）。プロモーターおよびヌクレオチド + 1 の転写開始部位を含有するこの領域は、M T 遺伝子の位置 - 3 7 0 ないしヌクレオチド位置 + 5 4 に対応していた（配列番号 1 3）。次いで、得られた断片を、予め E c o R I および S m a I で線状化してある前記調製の p H A - 1 発現ベクターに結んだ。S t u I 消化によって生成した M T の 3 ' 末端は S m a I 消化によって生成した p H A - 1 における平滑末端に適合した。5 ' D r o s o p h i l a M T 遺伝子断片および

10

20

30

40

50

3' ADH遺伝子断片を含有する得られたpUC18-由来ベクターをpRmHa-1と命名した。図2に示されたpRmHa-1発現ベクターは、pHa-1ベクターについての図1に示されるごとく、pUC18からの複製起点(ori)およびアンピシリンに対する耐性(Amp<sup>r</sup>)を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含有した。また、pRmHa-1のダイアグラムはMT遺伝子断片の5'ないし3'隣接部分、多重クローニング部位およびADH遺伝子断片を示す。pRmHa-1ベクターをc.で後記するごとくpRmHa-3発現ベクターの構築で用いた。

## 2. pRmHa-2発現ベクターの調製

pRmHa-2の構築は図1に示す。pRmHa-2発現ベクターを構築するために、少し修飾した前記pRmHa-1の構築で記載したごとく、前記調製のMT断片をpUC18-由来ベクターpHa-1に挿入した。EcoRIリンカーを前記調製のEcoRI/StuI-単離したMT遺伝子断片のStuI部位に負荷して、EcoRI制限部位を両末端に有するメタロチオネイン断片を形成させた。次いで、得られた断片を、予めEcoRIで線状化してあるADH断片含有pUC18発現ベクターに連結した。5'Drosophila MT遺伝子および多重クローニング部位の5'側にEcoRI制限部位を有する3'ADH遺伝子断片を含有する得られたpUC18-由来ベクターをpRmHa-2と命名した。図1に示すpRmHa-2発現ベクターは複製起点(ori)およびpUC18からのアンピシリンに対する耐性(Amp<sup>r</sup>)を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含有した。pRmHa-2のダイアグラムはMT遺伝子断片の5'ないし3'隣接位置、多重クローニング部位およびADH遺伝子断片も示す。pRmHa-2ベクターは後記c.に記載するごとくpRmHa-2発現ベクターの構築でpRmHa-1と共に使用した。

## 3. pRmHa-3発現ベクターの調製

ただ1つのEcoRI制限部位を有するpRmHa-3発現ベクターを調製するために、pRmHa-2からの断片をpRmHa-1に連結した。この構築のために、前記b.で調製したpRmHa-2をまずSphIで消化した。MT遺伝子の中央で始まり、多重クローニング部位のSphI部位で終わる得られたSphI断片をまずpRmHa-2ベクターから単離し、次いで、前記A.1で調製したpRmHa-1に連結した。pRmHa-1ベクターは予め修飾して、MT遺伝子の5'側のEcoRI制限部位を除去し、次いでSphIで線状化してあったものである。このプロセスを図2に模式的に示す。pRmHa-1中のEcoRI部位を除去するために、該ベクターをEcoRIで消化して線状化ベクターを形成させ、次いでマングビーンヌクレアーゼで平滑末端化し、再度連結した。

EcoRI部位を欠くpRmHa-1ベクターを次いでSphIで消化して、pRmHa-2からのSphI断片インサートに対応する領域を除去し、線状化pRmHa-1ベクターを形成させた。次いで、pRmHa-2からのSphI断片をSphI線状化pRmHa-1に連結してpRmHa-3発現ベクターを形成させた。pRmHa-3ベクターの概略を図3に示す。pRmHa-3がそれから誘導されたpUC18ベクターからの種々の制限部位の相対的位置を図に示す。加えて、注目するMHC遺伝子がクローン化される多重クローニング部位(ポリリンカー)によって隔てられたMTおよびADH遺伝子断片の相対的位置および長さを図に示す。pUC18に由来するpRmHa-3ベクターは複製起点およびアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含有する。かくして、本発明におけるごとく調製され、pRmHa-3の多重クローニング部位にクローン化されたMHCをコードするDNA断片を、MTプロモーターによって転写調節され、ADH遺伝子を経てポリアデニル化された。

## B. cDNA合成

種々のHLAグループのクラスI MHC分子の詳細な記載は、ここに出典明示して本明細書の一部とみなすPetersonらに対する米国特許第5,314,813号中に見出すことができる。

いずれかの好ましいHLAをコードするcDNAを、ポリメラーゼ鎖反応の使用を介して

クローン化することができる。前記B. 1節に開示したプライマー（配列番号1ないし配列番号12）を用いて、別々の反応にて適当なHLA-A、-B、-C、-E、-Fまたは-G cDNAを増幅することができ、次いで、前記HLA A2. 1につき開示した方法に記載されたごとくに、これをクローン化し、配列決定することができる。ヒト細胞からのcDNAの調製はEnnisら、PNAS USA 87:2833-2837 (1990)に記載されているごとくに行われる。略言すると、個体から血液試料を得、遠心後に細胞を収集し、これを用いて全RNAを調製する。オリゴ(dT)および鳥類骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素を使用することによって、第1鎖cDNAを合成する。得られたcDNAを、前記B. 1節に記載した適当なプライマー、およびGene Ampキットおよびサーマルサイクラー(Perkin-Elmer/Cetus)を利用するPCR増幅反応で用いる。反応条件は、好ましくは、以下の通りである。100ngのcDNA鋳型および50ピコモルの各オリゴヌクレオチドプライマーを用いる。30サイクルを以下のごとくに行う：(a) 94℃における1分間；(b) 60℃における1分間；および(c) 72℃における1分、30秒間。次いで、PCR反応物を10分間100℃まで加熱してTaqポリメラーゼを破壊し、T4ポリメラーゼ(Stratagene, San Diego, CA)によってDNAの末端を平滑とする。

HLA A2. 2を合成するために、完全なA2. 2をコードするcDNA（公表された配列として、Holmesら、J. Immunol., 139:936-41 (1987)参照）をM13mp19プラスミド（商業的に入手可能なバクテリオファージベクター(Stratagene, La Jolla, CA)にクローン化する。cDNAはA2の公表された配列に由来するプライマーを用いるPCRによって合成される。該cDNAはNot I（クレノウで満たされた突出）/EcoRI断片としてM13mp19クローンから放出される。（クレノウ断片は、E. coli DNA pol Iをスプチリシンで処理することによって生成された、E. coli DNAポリメラーゼI分子の一部である。それを用いて、制限ヌクレアーゼによって生じたDNA分子の末端の5'または3'突出を「満たす」）。Not I/EcoRI断片を、BglII（クレノウで満たされた末端）およびEcoRIで消化したpSP64Tに挿入する。pSP64Tは、効率的に翻訳される（β-グロビン）mRNAからの5'および3'フランキング領域を、それ自体の開始コドンを含むいずれかのcDNAに供するように設計されたSP6クロニングベクターである。この翻訳SP6ベクターは、pSP64-XβmをBamHIおよびBstEIIで消化し、互い違いになった末端をT4 DNAポリメラーゼで満たし、連結によってBglIIリンカーを付加することによって構築した。BamHIはATG（開始コドン）の2塩基上流でβ-グロビンcDNAを切断し、BstEIIはTAA（停止コドン）の8塩基上流で切断する。PstIないしEcoRIにかけて、ポリリンカー断片において切断する制限酵素を更に用いて転写のためにプラスミドを線状化することができるように、pSP64Tにはただ1つのBglII部位がある。（やはりプラスミドpSP64-Xβmの構築を記載するKreigおよびMellon, Nucleic Acid Res. 12:7057-7070, (1984)参照）。得られたプラスミドをEcoRI（クレノウで満たした末端）およびHindIIIで切断し、これをHindIII（5'）およびStuI（3'）の間のpCMUIIポリリンカーにクローン化する。（Paaboら、EMBO J. 5:1921-1927 (1986)参照）。全cDNAをHindIII（クレノウで満たした末端）およびBamHI断片として取り出し、これをSmaIおよびBamHIで切断したpRmHa-3にクローン化する。

HLA A2. 2可溶性形態は、膜貫通ドメインに直ぐ先行する前記A2. 2 cDNAに停止コドンを作成することによって調製した。修飾は、真核生物発現ベクターpCMUIIにクローン化したA2. 2 cDNAを、MboIIおよびBamHIで、HindIII 5'およびStuI 3'（前記参照）の間で切断することによって達成し、以下のオリゴヌクレオチドを挿入した。

10

20

30

40

5' プライマー : 5' G G A G C C G T G A C T G A C T G

A G 3'

(配列番号 17)

3' プライマー : 5' C C C T C G G C A C T G A C T G A

C T C C T A G 3' (配列番号 18)

得られた組換えプラスミドをHindIIIで切断し、突出末端をクレノウで満たし、次いで、BamHIで切断して制限断片が放出され、これをA2.2全長におけるごとくにpRmHa-3にクローン化する。

#### 1. ネズミICAM-1発現ベクターの構築

脾臓細胞をBalb/cマウスから単離した。脾臓細胞をconAで刺激し；製造業者の指示に従って、FastTrackキット(Invitrogen; San Diego, CA)を用いてmRNAを単離した。製造業者の指示に従い、AMV逆転写酵素キット(Promega, Madison, WI)を用い、cDNAをmRNAから合成した。公表されたcDNAヌクレオチド配列(Siu, G. ら, J. Immunol. 143, 3813-3820 (1989))に基づき、以下のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして合成した。

5' : T T T A G A A T T C A C C A T G G C T T C A A

C C C G T G C C A A G

3' : T T T A G T C G A C T C A G G G A G G T G G G

G C T T G T C C

合成したcDNAを、これらのプライマーを用いるPCRに付した。産物を制限酵素EcoRIおよびSalIで切断し、制限酵素EcoRIおよびSalIで消化してあるpRmHa-3に連結した。

#### 2. ネズミB7.1発現ベクターの構築

Balb/cマウスから脾臓細胞を単離し、conAで刺激した。製造業者の指示に従い、メッセンジャーRNAをFastTrackキット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて単離した。製造業者の指示に従い、AMV逆転写酵素キット(Promega, Madison, WI)を用いてcDNAをmRNAから合成した。公表されたcDNAヌクレオチド配列(Freemanら, J. Exp. Med. 174 : 625-631 (1991))に基づき、以下のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして合成した。

5' T T T A G A A T T C A C C A T G G C T T G C A A

T T G T C A G T T G

3' T T T A G T C G A C C T A A A G G A A G A C G G

T C T G T T C

10

20

30

40

50

これらのプライマーを用い、合成したcDNAをPCRに付した。産物を制限酵素EcoRIおよびSalIで切断し、制限酵素EcoRIおよびSalIで切断してあるpRmHa-3に連結した。

### 3. ネズミB7.2発現ベクターの構築

(ATCCから入手した)IC-21細胞を、10%胎児ウシ血清を含有するRPMI 1640培地中で増殖させた。製造業者の指示に従い、FastTrackキット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて、mRNAをこれらの細胞から単離した。製造業者の指示に従い、AMV逆転写酵素キット(Promega, Madison, WI)を用いてcDNAをmRNAから合成した。公表されているcDNAヌクレオチド配列(Freemanら, J. Exp. Med. 178: 2185-2192 (1993))に基づき、以下のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして合成した。

5' : T T T A G A A T T C A C C A T G G A C C C C A

G A T G C A C C A T G G G

3' : T T T A G T C G A C T C A C T C T G C A T T T

G G T T T T G C T G A

合成したcDNAをこれらのプライマーを用いるPCRに付した。産物を制限酵素EcoRIおよびSalIで切断し、制限酵素EcoRIおよびSalIで切断してあるpRmHa-3に連結した。

表1にリストしたリン酸カルシウム方法を用い、前記発現構築体をDrosophila S2細胞にトランスフェクトした。500 μg/ml Geneticinを細胞培養基に含ませることによって、安定な細胞系が選択された。

表1

| トランスフェクトされた細胞 | MHC1 (L <sup>1</sup> ) | β2  | B7.1 (CD80) | B7.2 | ICAM-1 (CD54) | phsneo μg |
|---------------|------------------------|-----|-------------|------|---------------|-----------|
|               | μg                     | μg  | μg          | μg   | μg            |           |
| 1             | A                      | 12  | 12          |      |               | 1         |
| 2             | B                      | 8   | 8           | 8    |               | 1         |
| 3             | C                      | 8   | 8           |      | 8             | 1         |
| 4             | D                      | 8   | 8           |      | 8             | 1         |
| 5             | E                      | 6   | 6           | 6    | 6             | 1         |
| 6             | F                      | 6   | 6           |      | 6             | 1         |
| 7             | G                      | 6   | 6           | 6    |               | 1         |
| 8             | H                      | 4.8 | 4.8         | 4.8  | 4.8           | 1         |

ヒト・アクセサリおよび共刺激性分子を、特定の蛋白質に特異的なモノクローナル抗体でのFACS分析によってこれらの蛋白質を発現することが示されているヒト細胞系からクローン化した。インテグリンファミリーに属する接着分子ICAM-1 (CD54) およびLFA-3 (CD58) を、各々、ヒト細胞系K562およびHL60からクローン化した。ヒト慢性骨髄性白血病に由来するK562細胞をATCC (CCL-243) か

ら入手し、推奨される条件（すなわち、5% CO<sub>2</sub>、37℃にて10%胎児ウシ血清を含有するRPMI）下で培養した。ヒト前骨髄細胞白血病に由来するHL60細胞をATCC（CCL-240）から入手し、ATCCの推奨に従って培養した。共刺激性分子B7.1およびB7.2も、各々、K562およびHL60細胞からクローン化した。

#### 4. cDNA

修飾されたチオシアン酸グアニジニウム法（Chomczynskiら, Anal. Biochem. 162:156-159, 1987）、続いて、オリゴ(dT)-セルロースカラム（Sambrook, J. ら, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第2版, 6.22-6.34, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY）上のポリA+ RNA選択

10

によって単離されたRNAからの各細胞系から、メッセンジャーRNA試料を調製した。（通常いくらかの細胞表面分子を発現させる必要がある）ビタミンD3でのHL60細胞の誘導はB7.2およびLFA-3分子を得るのに必要ではなく、蛋白質を誘導不存在下で発現させた。cDNAは製造業者の指示（Promega, Madison, WI）に従ってAMV逆転写酵素を用いて調製した。

#### 5. PCRプライマー

PCRプライマーを設計し、GENEWORKSデータベース（Intelligenetix）から既知の配列のコピーを得、適当なベクターにクローン化するために必要である末端を考慮した後に、合成した。それらは以下の通りであり、各蛋白質の頂部配列は5'プライマーおよび底部は3'プライマーであった。

20

B 7 . 1

5' - A C C C T T G A A T C C A T G G G C C A C A  
C A C G G A G G C A G - 3'

5' - A T T A C C G G A T C C T T A T A C A G G G  
C G T A C A C T T T C C C T T C T - 3'

10

B 7 . 2

5' - A C C C T T G A G C T C A T G G A T C C C C  
A G T G C A C T A T G - 3'

5' - A T T A C C C C C G G G T T A A A A C A T  
G T A T C A C T T T T G T C G C A T G A - 3'

20

L F A - 3

5' - A C C C T T G A G C T C A T G G T T G C T G  
G G A G C G A C G C G G G G - 3'

30

3' - A T T A C C G G A T C C T T A A A G A A C A  
T T C A T A T A C A G C A C A A T A C A - 3'

I C A M - 1

5' - A C C C T T G A A T T C A T G G C T C C C A  
G C A G C C C C C G G C C C - 3'

40

3' - A T T A C C G G A T C C T C A G G G A G G C  
G T G G C T T G T G T G T T C G G - 3'

#### 6. DNA断片の発現

各細胞系からのcDNA調製物を用いて、所望の蛋白質をクローンした。ポリメラーゼ鎖反応を用い、適当なPCRプライマー（前記参照）を利用してcDNA断片を生成させた

50

。適当なDNA断片を*Drosophila* ハエ・ベクター pRMHA-3 にクローン化した。プラスミド調製物は全調製物から調製し、今やハエ細胞へのトランスフェクションの準備ができています。

公表された部分的 cDNA 配列 (Suggs ら, PNAS 78: 6613-17, 1981) を用いてヒト  $\beta$ -2 ミクログロブリンを調製し、これを以下のプライマーにてのポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 用の鋳型として用いる。

5' プライマー

5' G C T T G G A T C C A G A T C T A C C A T G T C T

10

C G C T C C G T G G C C T T A G C T G T G C T C G C G C

T A C T C T C 3'

(配列番号 15)

3' プライマー

20

5' G G A T C C G G A T G G T T A C A T G T C G C G A T

C C C A C T T A A C 3'

(配列番号 16)

プライマーを標準的な PCR 反応 (Nilsson ら, Cell 58: 707 (1989)) で使用する。反応生成物をフェノールで抽出し、GeneClean キット (Bio 101, San Diego, CA) を用いて精製し、BamHI で消化し、pBS (Stratagene, La Jolla, CA) の BamHI 部位にクローン化した。配列の確認後、この BamHI 断片を pRMHA-3 の BamHI 部位にクローン化する。

30

実施例に示すごとく、ネズミ・クラス I cDNA を種々の例で用いた。ネズミ・クラス I cDNA は以下のごとくに調製した。

H-2K<sup>b</sup>: 完全な K<sup>b</sup> 分子をコードする cDNA は以下のごとくに構築した発現プラスミド pCMU/K<sup>b</sup> から得られる。リーダー配列およびほとんどのアルファ I ドメインを欠く部分的 H-2K<sup>b</sup> cDNA は、Reyes ら, PNAS 79: 3270-74 (1982) の方法に従って調製し、pH202 を得る。この cDNA を用いて、全長分子を得る。H-2K<sup>b</sup> (Caligan ら, Nature 291: 35-39, 1981) をコードするゲノムクローンを鋳型として用いて、NotI 部位が隣接する 5' プライマー、続いてリーダー配列の最後の 7 つのアミノ酸をコードする 21 スクレオチドおよびアルファ I ドメインの始まりに相補的に 18 スクレオチドおよび StyI 部位を含む領域に相補的な 3' プライマーを用いる PCR 反応にて、失われた配列を供する。得られた断片を StyI 部位にて pH202 で連結する。シグナル配列の残りをコードする 5' 配列は、BamHI/NotI 断片としての D<sup>b</sup> cDNA (後記参照) から得られる。全暗号配列を BamHI 断片として発現プラスミドから切断し、BamHI で切断した pRMHA-3 にクローン化する。

40

H-2L<sup>d</sup>: 完全な L<sup>d</sup> 分子をコードする cDNA は発現プラスミド pCMUIV/L<sup>d</sup> (Joly および Oldstone, Gene 97: 213, 1991) から得られる。完全な cDNA は BamHI 断片として真核生物発現ベクター pCMUIV/L<sup>d</sup> から切

50

断し、 $K^b$ としてpRmHa-3にクローン化する。

前記したごとく、pCMUベクター (pCMUIV) はNilssonら、前掲に記載されているごとくに真核生物ベクターpC81Gから誘導される。今度は、ベクターpC81Gは、Paaboら、EMBO J. 5:1921-7 (1986)に開示されている方法に従って、pA81G (Paaboら, Cell 33:445-453 (1983)) から誘導される。

H-2D<sup>b</sup>: 完全なD<sup>b</sup>分子をコードするcDNAは真核生物プラスミドpCMUIV/D<sup>b</sup> (JollyおよびOldstone, Science 253:1283-85, 1991) から得られる。完全なcDNAをBamHI断片として真核生物発現ベクターpCMUIV/D<sup>b</sup>から切断し、 $K^b$ としてpRmHa-3にクローン化する。

ネズミ $\beta$ -2ミクログロブリン: 全長ネズミ $\beta$ -2ミクログロブリンcDNAはHindIII (5') (クレノウで満たされる) / BglIII (3') 断片としてpSV2neo (ATCC番号37149) マウス $\beta$ -2ミクログロブリンcDNAから得られ、SmaIおよびBamHIで切断したpRmHa-3にクローン化する。

ベクターphshsneoはネオマイシン (G418) 耐性を与え、さらなる熱ショックプロモーター (hs) を持つphsneoの誘導體 (pUChsneo) であり、これはStellerら、EMBO J. 4:167 (1985)に記載されているごとくに商業的に入手可能なpUC8から合成できる。これらのベクターに含有された熱ショックプロモーターはhsp70プロモーターである。ネオマイシン耐性 (G418耐性) を与える他の有用なベクターはコスミドベクターsmart2 (ATCC 37588) (これはDrosophila hsp70プロモーターの制御下にある) およびプラスミドベクターpcopneo (ATCC 37409) を含む。

#### C. 遺伝子の発現ベクターへの挿入

制限産物を1%アガロースゲル上の電気泳動に付す (Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982))。制限産物をコードするcDNAをゲルから切り出し、製造業者の指示 (Bio 101, San Diego, CA) に従い、「GeneClean」を用いてアガロースから精製する。製造業者の指示 (Pharmacia, Piscataway, NJ) に従い、発現プラスミドpRmHa-3 (図3) を、One Phor All緩衝液中の適当な制限酵素で切断し、製造業者の文献 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) に記載されているごとくにアルカリ性ホスファターゼで処理する。100ngの切断されリン酸化されたpRmHa-3ベクターを300ngのアガロース精製クラスI MHC重鎖cDNAまたは $\beta$ -2ミクログロブリンcDNAと混合し、製造業者の文献に従い、T4 DNAリガーゼおよびOne Phor All緩衝液を用いて連結する。16°Cにおける5時間のインキュベーションの後、連結混合物を用いて、コンピテントE. coli JM83 (Maniatisら, 前掲 (1982)) を形質転換する。

Maniatisら, 前掲に開示されている方法を用いて、必要なcDNAを調製する。MHC重鎖cDNAの存在およびベクター中での向きを制限マッピングによって決定する。メタロチオネインプロモーターに対して正しい向きにあるcDNAと共にベクターを含有する細菌を、アルカリ溶解方法および塩化セシウム勾配精製を用いる大規模なDNAの調製で用いる。得られたDNAの量は分校光度法によって測定する。

#### D. S2細胞のトランスフェクションおよび標識

10%胎児ウシ血清 (55°Cで1時間熱処理)、100ユニット/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシン、および1mMグルタミンを補足したSchneider培地 (Gibco/BRL, Grand Island, NY) 中でS2細胞を増殖させる。(便宜のため、この補足培地を以後Schneider培地という)。細胞を27°Cで増殖させ、典型的には、新鮮な培地中に1:17希釈することによって7日毎に継代する。50%Schneider/5%Excell 401での最初の希釈によって、無血清培地 (100ユニット/mlペニシリン、100mg/mlのストレプトマ

10

20

30

40

50

イシン、1mMグルタミン、および500 $\mu$ g/ml G418 (JRH Biosciences, Lenexa, KS)を補足したExcell 400または401)中で、細胞を増殖に転じさせる。1週間後、細胞を10%Schneider培地/90%Excell 401に継代でき、1週間後100%Excell 401に継代できる。細胞をこの培地中に維持し、新鮮な培地中に2:17希釈することによって7日毎に継代する。

ml当たり10<sup>6</sup>細胞の濃度の15 $\times$ 10<sup>6</sup> S2細胞を85mmペトリ皿中で平板培養する。12時間後、後記するごとくに調製したリン酸カルシウム/DNA沈殿(1ml)を細胞に滴下する。48時間後、上清を注意深く除去し、細胞を、500 $\mu$ g/ml Geneticin (G418) (Gibco/BRL, Grand Island, NY) 10  
を含有するSchneider培地50mlの全容量にての175cm<sup>2</sup>フラスコに移す。21日後、500 $\mu$ g/ml G418を含有するSchneider培地30mlを含有する新鮮なフラスコに、20mlの培養を取り出す。10日後、弱くフラスコに接し、ほぼ24時間の倍加時間で増殖した細胞の安定な集団が得られ、これらの細胞を引き続いて培養し、前記したごとくに選択培地中で継代する。これらの細胞の凍結したアリコットを、遠心により5-20 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞を収集し、それを1mlの細胞凍結培地(93%胎児ウシ血清/7%ジメチルスルホキシド)中に再懸濁することによって調製する。次いで、アリコットを-70 $^{\circ}$ Cに1週間置き、引き続いて液体窒素貯蔵に移す。

25 $\mu$ gのDNAをトランスフェクション当りに使用する以外は、Paaboら(EMBO J., 5:1921-27 (1986))によってリン酸カルシウム沈殿を記載されているごとくに調製する。DNAの以下の組合せを用いて、示されたトランスフェクタントを調製する。 20

(a) MHCクラスI重鎖単独: 23 $\mu$ g重鎖発現ベクターDNA+2 $\mu$ gのphshsneo DNA

(b) MHCクラスI重鎖+ $\beta$ -2ミクログロブリン: 11.5 $\mu$ g重鎖発現ベクターDNA+11.5 $\mu$ gの $\beta$ -2ミクログロブリン(ヒトまたはマウス)発現ベクターDNA+2 $\mu$ gのphshsneo DNA

マウス遺伝子の他の組合せは表1に示す。

代謝標識に24時間先立って、1mM CuSO<sub>4</sub>を含有するSchneider培地中、3-5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/ml(10ml/85mmペトリ皿)の細胞密度で細胞を平板培養する。標識に30分先立って、培地を皿から吸引し、細胞を2 $\times$ 10mlのPBSで洗浄し、次いで、メチオニンおよびシステインを除いたGraceの昆虫培地(Gibco/BRL, Grand Island, NYから特別注文)中で20分間、次いで、0.1mCi <sup>35</sup>S Trans標識(New England Nuclear; duPont, Boston, MA)を含有するこの培地1ml中でインキュベートする。標識時間の後、標識溶液を吸引し、氷冷PBS/1%トリトンX100(1ml)で細胞を氷上で直ちに溶解させるか、あるいはSchneiderまたはExcell 400培地(5ml)(JRH Biosciences)を含有するメチオニンの存在下での追跡時間の後に溶解する。もし可溶性クラスI MHC分子を分析すべきならば、追跡培地を収集する。 30

溶解物を冷たく保ちつつ(8 $^{\circ}$ C未満)以下の操作を全て行う。溶解物をエッペンドルフ試験管に収集し、13,000 $\times$ gにて15分間マイクロ遠心管中で遠心し、プロテインAセファロースの10%スラリー100 $\mu$ lを含有する新鮮な試験管に移し、エンド・オーバー・エンドローター上に2時間置いた。マイクロ遠心管中での15分間のさらなる遠心に続き、細胞溶解物は分析の準備ができています。 40

ネズミMHCを利用する実験において、CaPO<sub>4</sub>沈殿法を用い、S2細胞を前記ネズミMHC組換体でトランスフェクトし;各重鎖を単独で、あるいは $\beta$ -2ミクログロブリンをコードするベクターとの50:50ミックスとしてトランスフェクトする。ネオマイシン耐性をコードするプラスミド、phshsneoDNAを各トランスフェクションに含めて、選択培地(Geneticin G418-硫酸塩, Gibco/BRL, Gra 50

nd Island, NY) 中でトランスフェクタントを増殖させることによってHCクラス I を安定に発現した細胞の集団が得られようにした。

#### E. ペプチド生成

本発明による抗原性ペプチドは天然に存在する源から得ることができるか、あるいは公知の方法を用いて合成することができる。ここに開示する種々の例において、ペプチドはApplied Biosystems 合成器, ABI 431A (Foster city, CA) で合成し、引き続いてHPLCによって精製する。

「ランダム」ペプチドの単離または合成も、特に、特定のエピトープを確認して空のMHC分子に前駆体CD8<sup>+</sup>細胞をもっとも刺激するらしいペプチドを負荷する場合には適当であり得る。「ランダム」ペプチドの混合物はプロテアソーム (例えば、実施例2, B. 6参照) の使用を介して、あるいは蛋白質またはポリペプチドを分解プロセス、例えばキモトリプシンでの分解に付すことによって生成させることができるか、あるいはペプチドを合成することができる。我々は本発明の細胞系が蛋白質およびポリペプチドをヒト・クラスI MHC分子に負荷できるより小さなペプチドに分解できることを観察したが、より小さなペプチド、例えば8-量体および9-量体を直接細胞培養に導入して、より迅速な負荷および発現プロセスを容易とするのが好ましい。

もしペプチド、例えばランダム8-、9-および18-アミノ酸ペプチドを合成するのならば、全ての種々のアミノ酸を好ましくは合成の各サイクルの間に取り込む。しかしながら、種々のパラメーター、例えばあるアミノ酸の溶媒不適合性の結果、あるアミノ酸を欠くペプチドを含有する混合物となる。かくして、該プロセスは要すれば、溶媒および反応条件を変更することによって調整して最大種類のペプチドを得るべきである。

前記したごとく、ヒトβ-2ミクログロブリンと複合体化したネズミ重鎖は、もしネズミβ-2ミクログロブリンと複合体化した場合よりもほぼ6-8度高い温度で安定であった。また、ペプチドおよび異種β-2ミクログロブリンによって与えられた安定性は相加的であることが観察された。もし8-9量体を用いれば、12-25量体と比較して、クラスI分子の熱安定性の大きな増加が起こり；事実、より大きなペプチドと比較して8-9量体によって与えられた安定化の間の差異は、従前に観察されたものよりも大きいであろう。というのは、ペプチドはHPLCによって精製されたが、8-9量体によるより大きなペプチドのいくらかの汚染があるからである。

クラスI分子の熱安定性は見かけ上、(1) β-2ミクログロブリンの起源；(2) ペプチドの存在；および(3) このペプチドの長さおよび配列に依存する。

従前の研究 (Petersonらに対する米国特許第5, 314, 813号；Jacksonら, PNAS USA 89: 12117-12121 (1992)) は、クラスI MHC重鎖が単独で、あるいはそれらがβ-2ミクログロブリンと会合した場合にペプチドに結合できることを示している。しかしながら、ペプチド-負荷ヒト・クラスI MHCの表面発現は、重鎖をβ-2ミクログロブリンと複合体化させた後に、分子にペプチドを負荷することによって最高に助長されるようである。

#### 1. ヒトMHCの発現

一旦我々がクラスI分子の熱安定性がβ-2の起源、ペプチドの存在、およびこのペプチドの長さおよび配列に依存すると判断したので、我々は、ペプチド-負荷ヒト・クラスI MHC分子の発現を介して、CD8<sup>+</sup>細胞を特異的に活性化できる細胞系の生成でこの情報を利用した。

熱不安定性はクラスI分子の固有の特性のようであり；それは、恐らくは、ペプチドを含有しないかまたは貧弱な結合特性 (これは、熱安定性をほとんど与えない) のペプチドを含有するクラスI分子が自己破壊することを確実にするように展開している。このようにして、細胞はその表面上の空のクラスI分子の数を最小化する。というのは、かかる状況は、恐らくは、外因的に誘導されたペプチドは結合され提示される点で危険だからである。ヒトβ2と共に昆虫細胞で発現されたヒト・クラスI分子は37℃での延長されたインキュベーションに対して安定ではなく；クラスI分子へのペプチド負荷に欠陥があるこれが示された突然変異体細胞系T2で発現されたヒト・クラスI分子もそうでなかった (H

oeskenおよびBevan, Science 248:367-70 (1990); Cerundoloら, Nature 345:449-452 (1990))。かくして、重鎖と $\beta$ -2ミクロglobリンとの間の親和性は分子の共進化を通じて注意深く保存され、従って、空のクラスI分子、または貧弱に結合するペプチドを担持するものは、「宿主」生物の体温で自己破壊するようである。

ヒト・クラスI MHC分子をS2細胞で発現させた。従前に記載されている方法を用い、ヒト $\beta$ -2ミクロglobリンおよびHLA A2.2Y、HLA A2.1、HLA B7、またはHLA B27を共発現する細胞系を確立した。略言すると、前記蛋白質をコードするcDNAをDrosophila発現ベクターpRmHa-3にクローン化し、ここに開示する方法を介して、ヒト $\beta$ -2ミクロglobリン含有プラスミドpshshsneopラスミドでS2細胞に共トランスフェクトした。3週間または4週間後、G418-耐性T-細胞の集団を新鮮な選択培地で1:5希釈した。一旦健康に増殖する細胞集団が得られたならば、CuSO<sub>4</sub>を細胞のアリコットに添加し、24時間後、 $\beta$ -2ミクロglobリンと会合した場合にヒト・クラスI重鎖の単形決定基を認識するモノクローナル抗体W6/32(ATCC HB95, Bethesda, MD)を用いるフローサイトメトリーを介して細胞を分析した。(Barnstableら, Cell 14:9 (1978) 参照)。CuSO<sub>4</sub>の添加によって、ヒト・クラスI分子の各々の高レベルの発現が誘導された(データは示さず)。これらの安定な集団を、後記するサイトフロメトリーを用いる高発現細胞のために貯蔵した。全ての引き続いての実験で用いたのは細胞のこれらの分けた集団である。

FACS分析に24時間先立って、CuSO<sub>4</sub>を安定にトランスフェクトされたS2細胞( $3-4 \times 10^6$ 細胞/ml)に1mMの最終濃度まで添加し、それによりトランスフェクトされた遺伝子からの発現に「スイッチを入れた」。細胞を24-ウェル培養皿中で平板培養した(ウェル当たり2ml)。FACS分析に8時間先立って、CuSO<sub>4</sub>培地を、50 $\mu$ g/mlの濃度のペプチドを含むまたは含まない新鮮な培地(1ml)で置き換える。分析のために細胞を収穫するに先立って、種々の時間間隔にて37℃の室内で皿を平坦な表面に移すことによって、37℃の温度攻撃を行う。

S2細胞でのクラスI MHCの表面発現を分析するために、細胞のアリコット( $5 \times 10^5$ )を氷上の試験管に移し、遠心(1,000 $\times$ g、4分間)によって収集し、3mlのPBS/1%BSA、0.02%アジ化ナトリウムに再懸濁し、遠心によって収集し、適当な一次抗体(腹水Y3、28:14:8S、30.5.7., W6/32, 1:200希釈)を含有するPBS/BSA(0.5ml)に再懸濁する。ウサギ抗血清を1:500希釈し、B22.293ハイブリドーマ上清を直接用いる。氷上での1時間のインキュベーションの後、細胞を3mlのPBS/BSA中で2回洗浄し、FITC標識二次抗体(Cappel, Durham, NC)および1ng/mlヨウ化プロピジウムを含有するPBS/BSA0.5mlに再懸濁する。氷上での30分のインキュベーションの後、細胞をPBS/BSAで1回洗浄し、 $1 \times 10^6$ /mlの濃度のこの緩衝液中に再懸濁する。次いで、FACS 440(Becton Dickinson)によって試料を分析する。ヨウ化プロピジウムで染色された死滅細胞を、分析に生ゲートを含ませることによって排除する。

細胞ソーティングのために、全ての染色操作を滅菌フード中で行う以外は、前記で概説したのと同じ手法を用いる。抗体を含む溶液を濾過滅菌し、PBS/BSAの代わりにSchneider培地またはExcel 400を用いる。一次抗体に特異的に結合する細胞を、Becton Dickinsonセルソーターを用いて分ける。分けた細胞( $2-8 \times 10^5$ )を、 $2 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度で平板培養する前に培地中で1回洗浄する。

F. ペプチドとのイン・ビトロインキュベーションによる膜-結合した空のMHC分子の負荷

Drosophila細胞の表面で発現されるヒト・クラスI分子が空の場合、細胞を37℃で2時間インキュベートし、細胞表面発現をサイトフルオリメトリーによって分析し

10

20

30

40

50

た。HLA B27およびA2.1双方の表面発現は、もし細胞を37℃で2時間インキュベートすると大いに低下する；しかしながら、クラスI分子に結合することが知られているHIVペプチド中で細胞をプレインキュベートすると、クラスIに対して有意な熱安定性が与えられ、他方、結合しないペプチドはほとんど効果を有しない（図4参照）。（HIVのPOL蛋白質からの9-アミノ酸ペプチドILKEPVHGV（配列番号42）はHLA A2.1に結合し、それを安定化する。HIVのVpr蛋白質からの9-アミノ酸ペプチドはB27（FRIGCRHSR；配列番号41）に結合しそれを安定化させる）。これらのデータは、Drosophila細胞の表面で発現されたヒト・クラスI分子が空であり、結合特異的HIVペプチドによって安定化できることを示す。

図4および5は、HIVペプチドによるDrosophila細胞の表面に発現されたHLA B27およびHLA A2.1のペプチド誘導熱安定化を示す。HLA B27またはA2.1いずれかを発現するDrosophila細胞を示したペプチドと共にインキュベートし、次いで、（ATCC HB95からの）抗体W6/32およびサイトフルオリメトリーの使用によるクラスI分子の表面発現の分析に先立って、2時間28℃で維持するか、あるいは37℃でインキュベートした。各細胞集団の平均蛍光をインキュベーション時間に対してプロットして示す。HIV POLペプチド（ILKEPVHGV、配列番号42）はA2.1を安定化させるがB27を安定化させず（図4）、他方、HIV Vprペプチド（FRIGCRHSR、配列番号41）はB27を安定化させるがA2.1を安定化させない（図5）。

## 実施例 2

### 合成抗原提示細胞の調製

#### A. 浸透圧負荷

オボアルブミン蛋白質でのSC2および3T3細胞の浸透圧負荷はMoorseら、Cell 54:777-785（1988）によって記載されているごとくに行った。アッセイ手法は以下の通りである。96-ウェルの皿中、 $1 \times 10^5$  Drosophila細胞（負荷したペプチド/蛋白質を含むまたは含まない）または3T3細胞を、10%胎児ウシ血清を補足したRPMI培地200  $\mu$ l中の $1 \times 10^5$  B3/CD8T-細胞ハイブリドーマ細胞と共に培養した。インキュベーションの24時間後、これらの培養からの上清100  $\mu$ lを5,000のCTL細胞を含有するRPMIの100  $\mu$ lに添加した。1  $\mu$ Ciの<sup>3</sup>Hチミジン（Amersham）を添加すると、細胞を37℃で24時間共培養した。37℃における15時間のさらなるインキュベーションの後、放射性同位体標識のCTL細胞への取り込みをシンチレーションカウンティングによって測定した。また、ネズミMHCで行ったアッセイにより、昆虫細胞はペプチドをクラスI分子に負荷することができることが確認された。特定の抗原を含有する200-500と少ないMHC分子を発現する細胞はT-細胞によって検出できる。Drosophila細胞はクロムを蓄積しないので、B3/CD8、T-細胞ハイブリドーマに基づく抗原提示アッセイを用いた。B3/CD8はB3（H-2K<sup>b</sup>クラスI分子によって提示されるオボアルブミンペプチド253-276に特異的な細胞傷害性T-細胞）、およびCD8-を担持するIL-2分泌細胞系間のハイブリドーマである（Carboneら、前掲、1989参照）。抗原刺激に際して、IL-2-依存性T-細胞系CTLへの<sup>3</sup>Hチミジン取り込みによって測定するとB3/CD8はIL-2を産生する（Gillisら、J. Immunol. 120:2027（1978））。かくして、産生されたIL-2の量を測定することによって、T-細胞認識についてのアッセイをすることができる。

OVAペプチドが由来するオボアルブミン蛋白質の細胞内プールを供するために、オボアルブミン（Sigma Chem. Co., MO）をMooreら、前掲（1988）によって記載されているごとく浸透圧により細胞に負荷した。負荷の直後、細胞をT-細胞ハイブリドーマと混合した。2日間のインキュベーションの後、培地を取り出し、IL-2につき検定した。IL-2の量は、IL-2-依存性T-細胞系CTLの増殖を支持する培地の能力によって測定し（Gillisら、前掲、1978）、増殖は、細胞へ取り込まれた放射性チミジンの量によって定量した。

10

20

30

40

50

K<sup>b</sup>/β 2でトランスフェクトしたS 2または3 T 3細胞を、等張 (I s o) または高張 (H y p) 培地中、オボアルブミン蛋白質 (O v P r o) またはオボアルブミンペプチド、O V A 2 4 (O v P e p) と共にインキュベートした。(ネズミ細胞系は受託番号C C L 1 6 3でA T C Cから入手可能である。) 処理後、細胞をT-細胞ハイブリドーマB 3 / C D 8と共培養した。B 3 / C D 8は、B 3 (C a r b o n e ら, J. E x p. M e d . 1 6 9 : 6 0 3 - 1 2 (1 9 8 9))、H-2 K<sup>b</sup>クラス I 分子によって提示されたオボアルブミンペプチド2 5 3 - 2 7 6に特異的な細胞傷害性T-細胞、およびC D 8を担持するI L-2分泌細胞系との間のT-細胞ハイブリドーマである。抗原刺激に際して、I L-2-依存性細胞系C T L Lへの<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みによって測定して、B 3 / C D 8はI L-2を産生する (G i l l i s ら, J. I m m u n o l . 1 2 0 : 2 0 2 7 (1 9 7 8))。かくして、産生されたI L-2の量を測定することによって、T-細胞認識につき検定できる。共培養からの上清は、I L-2-依存性細胞系C T L L (A T C C 番号 T I B 2 1 4) による<sup>3</sup>HチミジンによってI L-2につき分析した。取り込まれた<sup>3</sup>Hチミジンの量を最初の細胞処理に対してプロットする。

図6より、もしオボアルブミンペプチドを培養基に添加したならば、T-細胞はD r o s o p h i l a細胞によく応答し、もし細胞にオボアルブミンペプチドを負荷すれば、認識は起こらないことが分かる。昆虫細胞の細胞表面に発現されたM H Cクラス I 分子は、もしペプチドを培養基に添加したならば該ペプチドに結合できる点で十分に機能的であり、T-細胞によってそれが認識されるよう正しい意味でそれを提示できる。

#### B. イン・ビトロ条件の最適化

特異的細胞傷害性T-細胞の生成のためのイン・ビトロ条件の最適化のために、D r o s o p h i l a細胞刺激体細胞の培養を好ましくは無血清培地 (例えば、E x c e l l 4 0 0) 中で維持する。D r o s o p h i l a細胞刺激体細胞を好ましくは> 2 0 μ g / m l ペプチドと共にインキュベートする。エフェクター：刺激体比率 (リンパ球：D r o s o p h i l a細胞比率) は好ましくは約3 0 : 1ないし3 0 0 : 1の範囲である。最大特異的C D<sup>8+</sup>は一般に5日間の培養の後に観察される。

アッセイを殺すための標的細胞の培養は好ましくは無血清培地に維持する。

#### 実施例 3

##### アーム付きエフェクターT-細胞の増殖および分化の刺激

我々は、M H Cクラス I 分子および特異的助力 (assisting) 分子でトランスフェクトしたD r o s o p h i l a S 2細胞がイン・ビトロでT-細胞からの一次応答を刺激できることを見出した。我々はマウスモデル系から本実施例において以下のデータを示す。本実施例では、マウスM H Cクラス I (L<sup>d</sup>)、β 2ミクログロブリン、特異的助力分子をコードする構築体を用い、T-細胞受容体導入マウスのリンパ節からのC D<sup>8+</sup>細胞でテストした。

図7のデータは、トランスフェクトされたD r o s o p h i l a S 2細胞がトランスフェクトされたネズミ遺伝子の蛋白質産物を発現する証拠を提供する。蛍光活性化セルソーター (F A C S) および蛍光的に標識した抗体を用いるフローサイトメトリーを用いて、トランスフェクトされたD r o s o p h i l a S 2細胞によるL<sup>d</sup> (重鎖およびβ 2を含むM H C分子) および特異的助力分子B 7. 1 (C D 8 0) およびI C A M-1 (C D 5 4) の発現を示した。トランスフェクトされた細胞をF A C Sで分離して、L<sup>d</sup>分子を発現する細胞が得られ、次いで、イン・ビトロで維持した。

D r o s o p h i l a S 2細胞のトランスフェクションを表2にまとめる。該データは、C u S O<sub>4</sub>での誘導後における細胞系でのフローサイトメトリーによって測定されたL<sup>d</sup>、B 7. 1およびI C A M-1発現を示す。対照抗体 (c t r A b) に対し、トランスフェクタントの全ては細胞表面でL<sup>d</sup>分子を発現することが明らかである。同様に、L<sup>d</sup>およびB 7. 1で共トランスフェクトされた細胞 (L<sup>d</sup>. B 7) はI C A M-1ではなくB 7. 1を発現し、他方、L<sup>d</sup>およびI C A M-1で共トランスフェクトされた細胞 (L<sup>d</sup>. I C A M) はB 7. 1ではなくI C A M-1を発現し；L<sup>d</sup>、B 7. 1およびI C A M<sup>-1</sup>での三重トランスフェクション (L<sup>d</sup>. B 7. 1. I C A M) は3種の分子全ての発現に導

いた。

標準的な組織培養系 (Cai, Z. および Sprent, J. (1994) J. Exp. Med. 179:2005-2015) を用い、 $5 \times 10^4$  用量の精製  $CD^{8+}2C$  リンパ節 (LN) 細胞を、 $3 \times 10^5$  用量のトランスフェクトされたハエ細胞土ペプチド ( $10 \mu M$  最終濃度) と共に  $37^\circ C$  で培養した。ペプチドは R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute (Sykulev ら, (1994) Immunity 1:15-22 によって合成した。増殖応答は、収穫の 8 時間前に  $^3H$  TdR ( $1 \mu Ci$  / ウェル) を添加することによって測定した。IL-2 産生は、48 時間に培養から上清を取り出し、 $50 \mu l$  の上清を IL-2 応答インジケータ細胞系 (CTLL) に添加することによって測定した; インジケータ系の増殖は  $^3H$  TdR の添加によって測定した。表 2 に示されるデータは三連の培養の平均値である。トランスフェクトされた *Drosophila* S2 細胞は  $37^\circ C$  で迅速に死滅し、この温度では  $^3H$  TdR を取り込まなかった。

表 2 におけるデータは、トランスフェクタントがマウス T 細胞の一次応答を刺激できることを示す。

表 2

2C T 細胞受容体導入マウスからの  $CD^{8+}$  リンパ節細胞による一次増殖応答および IL-2 産生を刺激するトランスフェクトされたハエ細胞の能力

表 2

以下のものを発現するトランスフェクトされたハエ細胞にての  $^3H$  TdR 取り込み

(cpm  $\times 10^3$ )

| アッセイ    | 添加<br>ペプチド | $L^d$ | $L^d +$<br>B7.1 | $L^d +$<br>ICAM-1 | $L^d +$<br>B7.1 +<br>ICAM-1 | $L^d +$ B7.1 を<br>$L^d +$ ICAM-1 と<br>組み合わせる |
|---------|------------|-------|-----------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| 増殖      | -          | 0.2   | 0.1             | 0.3               | 0.2                         | -                                            |
| (第 3 日) | p2Ca       | 0.2   | 0.3             | 1.5               | 142.0                       | 1.5                                          |
|         | QL9        | 0.2   | 60.9            | 73.9              | 263.7                       | 132.9                                        |
| IL-2 産生 | -          | 0.3   | 0.2             | 0.1               | 1.2                         | -                                            |
| (第 2 日) | p2Ca       | 0.2   | 0.2             | 0.1               | 64.6                        | 0.3                                          |
|         | QL9        | 0.1   | 0.4             | 0.2               | 158.6                       | 0.5                                          |

2C T 細胞受容体 (TCR) は、ある種のペプチド、例えば p2Ca (配列番号 46) または QL9 (配列番号 47) と複合体化した  $L^d$  分子に対して強力に反応性である。これらの 2 種のペプチドは、可溶性  $L^d$  分子に対して中程度ないし高い親和性を有する (p2Ca につき  $4 \times 10^6 M^{-1}$ 、および QL9 につき  $4 \times 10^9 M^{-1}$  (Sykulev ら))。可溶性  $L^d$  分子に複合体化させた場合、2 種のペプチドは可溶性 2C TCR 分子に対して高い結合親和性を有する。しかしながら、TCR 結合および  $L^d$  結合双方において、QL9 ペプチドは p2Ca ペプチドよりも高い親和性を明らかに有する。

表 2 は、より弱いペプチド p2Ca に対する応答体 2C 細胞による増殖応答および IL-2 産生が、刺激体  $L^d$  - トランスフェクト細胞が B7.1 および ICAM-1 双方を発現すること;  $L^d +$  B7.1 または  $L^d +$  ICAM-1 いずれかを発現する細胞の混合物は非刺激性であることを示す。対照的に、より強いペプチド QL9 に関しては、B7

または ICAM を発現する  $L^d$ 。ハエ細胞は明らかに有意な応答を誘導するが、B7 および ICAM の組合せ発現はかなり高い応答を生成する。T 細胞増殖についてのこれらの発見とは対照的に、QL9 ペプチドに応答しての IL-2 産生は B7 および ICMA の同時発現を要し；別々の細胞でこれらの分子の発現は効果的でない。

結果は、ネズミ・クラス I 分子および共刺激性分子でトランスフェクトされた *Drosophila* 細胞がペプチド抗原に応答して T 細胞を誘導して、一次増殖応答およびリンホカイン (IL-2) 産生を上昇させることを示す。また、該系はヒト T 細胞に適用でき、これを用いて、イン・ビトロで腫瘍-特異的抗原に特異的な非感作 (または感作) T 細胞を刺激することができ；腫瘍-特異的抗原に特異的なクローン的に増殖した T 細胞のイン・ビボ融合は癌を持つ患者を治療するであろう。ウイルス抗原に特異的な T 細胞の融合はウイルス感染、例えば HIV を持つ患者で有用であろう。

10

#### 実施例 4

##### アビジン-被覆赤血球細胞に対するビオチニル化 MHC 分子の固定化

NHS-LC-ビオチン、ニュートラアビジンおよびビオチン-BMCC は Pierce (Rockford, IL) から購入した。ヒツジ赤血球細胞は Colorado Serum Company (Denver, CO) から得た。 $L^d$  および組換え  $L^d$  を発現する *Drosophila* S2 細胞は実施例 1 および 2 に記載したごとくに調製した。モノクローナル抗体 30.5.7 (抗- $L^d$ ) および 1B2 (2C T 細胞受容体に対する抗-クロノタイプ抗体) はハイブリドーマ細胞培養上清として用いた。

使用したプロトコルは Muzykantov および Taylor (Anal. Biochem. (1994) 223, 42-148) によって記載されている。略言すると、SRBC をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中で 4 回洗浄し、NHS-LC-ビオチンを用いてビオチン化し、PBS 中で再度 4 回洗浄し、ニュートラアビジンと共にインキュベートし、最後に 4 回洗浄し、3% 胎児ウシ血清および 0.02% アジ化ナトリウムを含有する PBS 中、4°C で保存した。

20

ビオチン-BMCC、チオール基と反応するマレイミドにカップリングしたビオチンを用い組換え  $L^d$  をビオチン化した。 $L^d$  は遊離チオール基、システイン 121 の側鎖 (これは、ペプチド結合部位にはない) を呈する。ビオチン化は製造業者によって推奨されるごとくに行った。未反応ビオチンを Centricon 10 を用いて除去した。

アビジン-被覆 SRBC と共に 0.2 mg/ml の最終濃度で 30 分間インキュベートし、続いて、10% 胎児ウシ血清を含有する DMEM 中で洗浄することによって、ビオチン化  $L^d$  を固定化した。 $L^d$  が付着した SRBC を直ちに使用した。

30

マウスのリンパ節からの 2C TCR トランスジェンを発現する T 細胞を、磁性枯渇 (magnetic depletion) によって精製した。精製した T 細胞は、抗-クロノタイプ抗体 1B2 を用いるサイトフルオロメトリーにおける染色に終始 97-98% 陽性であった。

ビオチン化  $L^d$  のアビジン-被覆 SRBC への固定化は前記したごとくに行った。付着は、抗- $L^d$  抗体 30.5.7 を用いるフローサイトフルオロメトリーを用いて評価した。典型的な実験は図 8 に示す。陰性対照 (細胞マイナス抗体) は点線で示す。塗られたピークは蛍光抗体で標識された細胞よりなる。細胞の 99.78% が標識された。蛍光強度は、我々が合成抗原-提示細胞上の  $L^d$  につき観察した強度の最高レベルと同一範囲であった。

40

同一手法を用い、 $K^b$  (重鎖および  $\beta 2$  を含む MHC 分子) もビオチン化した。我々は、フローサイトフルオロメトリーによって評価してアビジン-被覆 SRBC 上にビオチン化  $K^b$  を固定化することができた (図 9)。細胞の 99.88% が標識された。

ロゼットティング実験により、付着 MHC 分子が T 細胞と機能的に相互作用することが確認された。 $L^d$ 、 $L^d$ -被覆 SRBC を発現する *Drosophila* S2 細胞を氷上で QL9 ペプチド (0.02 mM) または無関係ペプチド (MCMV, 0.02 mM) と共に 30 分間インキュベートし；次いで、2C+T 細胞を添加し、1 *Drosophila* S2 細胞につき 2C+T 細胞であり、あるいは 1 2C+T 細胞につき 10 SRBC であり；混合物をペレット化し、氷上に少なくとも 30 分間保持した。次いで、細胞を

50

注意深く再懸濁し、ロゼットをカウントし、ロゼットは少なくとも3つの2C+T-細胞に結合した*Drosophila* S2細胞、または少なくとも3つのSRBCに結合した2C+T-細胞である。ロゼットは全ての場合に観察された。典型的には、QL9ペプチドを添加した場合、リンパ球の30-40%がロゼットに含まれた。無関係ペプチドの存在下ではロゼットは観察されなかったが、場合により少数の単細胞の付着が観察された。

これらの例は、大量のMHCクラスI分子を、モノクローナル抗体結合およびロゼティング実験（T-細胞受容体結合）によって判断して、天然のコンフォメーションにて、種々の表面（ハエ細胞、赤血球細胞、ラテックスビーズ）に固定化する新しい方法を記載する。この方法は人工リン脂質膜を含めた他の合成表面へ拡大させることができる。ホスファチジルエタノールアミンならびにアビジンがカップリングしたリン脂質は我々の研究に特に関係がある。これらのリン脂質はLipex Biomembrane Inc., Vancouver, BC, カナダ国から商業的に入手可能である。

#### 実施例 5

##### アビジン-被覆ラテックスビーズへのビオチン化MHC分子の固定化

6ミクロン直径ラテックススルフェートビーズはInterfacial Dynamics Corporation (Portland, OR) から購入し、実施例4に記載したプロトコルに従ってビオチン化した。

アビジン-被覆ラテックスビーズは、室温で1mg/mlのニュートラアビジンを含むPBST中にて1時間インキュベートしたラテックスビーズの1%懸濁液を用いて調製した。次いで、10%胎児ウシ血清を含む等容量のPBSTを添加した。室温でのインキュベーションの1時間後、ビーズを3回洗浄し、組換えビオチン化L<sup>d</sup>の結合に用いた。組換えビオチン化L<sup>d</sup>は、アビジン-被覆ラテックスビーズと共に0.2mg/mlの最終濃度でインキュベートし、続いて10%胎児ウシ血清を含むDMEM中で洗浄することによって固定化した。L<sup>d</sup>が付着したSRBCを直ちに使用した。

ロゼティング実験により、ラテックスビーズ上に付着したMHC分子はT-細胞と機能的に相互作用することが確認された。組換えL<sup>d</sup>およびL<sup>d</sup>-被覆ラテックスビーズを発現する*Drosophila* S2細胞を氷上でQL9ペプチド（0.02mM）または無関係ペプチド（MCMV、0.02mM）と共に30分間インキュベートし；次いで、2C+T-細胞を添加し、割合は1*Drosophila* S2細胞につき10の2C+T-細胞、または1の2C+T-細胞につきL<sup>d</sup>-ラテックスビーズであり；混合物をペレット化し、氷上に少なくとも30分間保持した。次いで、細胞を注意深く再懸濁し、ロゼットをカウントし、ロゼットは少なくとも3つの2C+T-細胞に結合した*Drosophila* S2細胞、または少なくとも3つのラテックスビーズに結合した2C+T-細胞であった。ロゼットは全ての場合に観察された。典型的には、QL9ペプチドを添加した場合、リンパ球の30-40%がロゼットに含まれた。無関係ペプチドの存在下ではロゼットは観察されなかったが、場合によって少数の単細胞の付着が観察された。

#### 実施例 6

##### プラスチックマイクロウェルプレートのごとき種々の固体支持体に結合させた組換え蛋白質の固定化および検出

MHC分子はマイクロタイタープレート（Corning）への直接結合によって固定化し、以下のごとくに検出した。

MHC K<sup>b</sup>分子をPBST中に所望の濃度まで、例えば、100ng/ウェルに対して0.001g/mlまで希釈した。100μlの希釈したK<sup>b</sup>をプラスチックマイクロタイタープレート上の各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBSTで1回洗浄し、PBST（0.05%）およびTween（PBST）中の200μlの2%ウシ血清アルブミン（BSA）を添加し、室温でさらに1時間インキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄し、ビオチン化抗-K<sup>b</sup>mAbをPBST中の2%BSAに添加した（1:2500）。プレートを室温でさらに1時間インキュベートし、PBSTで3回洗浄した。アビジン-コンジュゲートド

10

20

30

40

50

H R PをP B S中の2 % B S Aに添加した(1 : 2 5 0 0)。室温でのさらに1時間後、プレートをP B S Tで3回洗浄し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>またはトフェニルジアミンを添加した。H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub>で反応を停止させた。反応生成物を490 nmで比色法により検出した。

図10は、3つの異なるモノクローナル抗体を用いる、M H C K<sup>b</sup>分子の存在の検出結果を示す。

別法として、組換えM H C K<sup>b</sup>分子はビオチン-アビジン連結相互作用を介して基質と結合することができる。この具体例では、マイクロウェルプレートをP B S中に0.001 mg/mlの濃度に希釈した100 μlアビジンで被覆した。過剰のアビジンをP B S洗浄によって除去した。K<sup>b</sup>を提示しその結合を検出する前記手法を次に行った。

別法として、基質に結合したニッケルと相互作用するM H Cに付加されたポリヒスチジンタグに基づく結合によって組換えM H C分子を固定化することもできる。

ニッケルキレート被覆マイクロウェルプレート(Xenopore)を用いて、結合および検出についての前記手法を行い、前記ベクターp R m H a / H i s<sub>6</sub>を用いて、ポリヒスチジンタグを持つ組換えM H C分子を発現させた。

#### 実施例7

##### 可溶性の空のクラスI M H C分子へのイン・ビトロでのペプチドの直接結合

##### A. 手法

H-2 K<sup>b</sup>: 実施例1. Bに記載したごとくに調製。

H-2 K<sup>b</sup> S o l : K<sup>b</sup> s o l c D N Aは、クラスI M H C分子の細胞外部分をコードする、K<sup>b</sup>の誘導体である。K<sup>b</sup> s o l c D N Aは、E n n i s ら, P N A S U S A 8 7 : 2 8 3 3 - 7 ( 1 9 9 0 ) および Z e m m o u r ら, I m m u n o g e n e t i c s 3 3 : 3 1 0 - 2 0 ( 1 9 9 1 ) に記載されているものごとき、公知方法に従ってP C Rによって生成させることができる。具体的には、アミノ酸位置+275のアルファ3ドメインの末端に挿入された停止コドンを持つ切形K<sup>b</sup>分子をコードするc D N AをB a m H I断片としてp C M U発現プラスミドから切り出し、K<sup>b</sup> c D N Aとしてp R m H a - 3にクローン化する。K<sup>b</sup> s o l c D N Aは完全なK<sup>b</sup> c D N Aの誘導体であり(前記参照)、これはS t y I部位を含む5'オリゴヌクレオチド、および以下の3'オリゴヌクレオチドを用いるP C R反応において鋳型として用いる。

5' A T A T G G A T C C T C A C C A T C T C A G G G T

G A G G G G C 3'

#### (配列番号43)

得られたP C R断片を平滑末端とし、p B S (S t r a t a g e n e, L a J o l l a , C A)のS m a I部位にクローン化し、配列決定し、K<sup>b</sup>の残りの5'配列をS t y I部位にクローン化する。完全なK<sup>b</sup>蛋白質をコードするc D N AはB a m H I制限断片として得ることができた。

H-2 D<sup>b</sup>およびH-2 L<sup>d</sup>は前記実施例1. Bに記載したごとくに調製する。

K<sup>b</sup> α1α2α3ドメイン(274残基)およびネズミβ-2ミクログロブリン(99残基)をコードするc D N Aを、各々、メタロチオネインプロモーターp R M H a - 3 (B u n c h ら, N u c l e i c A c i d R e s . 1 6 : 1 0 4 3 - 1 0 6 1 ( 1 9 8 8 ))を保有する発現ベクターの唯一のB a m H I部位にクローン化した。前記したリン酸カルシウム沈殿法によって、プラスミドp h s h s n e o (ネオマイシン耐性遺伝子を含む)に加えてこれらの組換えプラスミドでD r o s o p h i l a S 2 / M 3細胞を形質転換した。ネオマイシン-アナログ抗生物質G 4 1 8に対し嚙み取された形質転換細胞を無血清培地中で27℃にて増殖させ、0.7 mM C u S O<sub>4</sub>の添加によって可溶性重鎖K<sup>b</sup>およびβ-2ミクログロブリンを共発現させた。

製造業者(P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J)の指示に従い、抗-K<sup>b</sup>モノクローナル抗体Y 3を用いるアフィニティークロマトグラフィー、続いてP h a r m

acia Mono Q FPLCカラム上のイオン交換クロマトグラフィーによって、 $K^b$ の組み立てられたヘテロダイマーを培養上清から精製した。 $K^b$ 調製物のSDS-ポリ  
アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、続いてのクーマシーブルーでの染色  
は、約32,000における相対的分子量 (Mr) のただ1つのバンドおよび約12,0  
00におけるMrの1つのバンドを示し、検出可能な不純物はなかった。高度に精製され  
た $K^b$ をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) に対して透析し、濾過滅菌し、さらなる実験  
の使用した。可溶性 $K^b$  (「 $K^b$ sol」) 蛋白質 (43.2 kDa) の吸光係数は280  
nmにおいて69,200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>である。

1% TX-100を含有するまたは含有しないPBS中の精製された $K^b$ sol (0.3  
μM) を種々の温度 (すなわち、4℃、23℃、32℃、37℃、42℃および47℃) 10  
に1時間暴露した。次いで、4℃にて、モノクローナル抗体Y3およびプロテインAセフ  
ァロースビーズ (Pharmacia, Piscataway, NJ) と共にインキュベ  
ートすることによって、蛋白質を2時間で各々免疫沈降させた。12.5% SDS-P  
AGE、続いてのクーマシーブルーでの染色によって試料を分析した。ゲル上の2つの濃厚  
なバンドは抗体Y3の軽鎖および重鎖である。もう1つの手法において、 $K^b$ sol (0  
.3 μM) を23℃にてPBS中の50 μMペプチドと共に2時間インキュベートして、  
 $K^b$ sol-ペプチド複合体を形成させた。1% TX-100の添加の後、試料を12℃  
、37℃または47℃の温度に1時間暴露した。複合体を免疫沈降させ、前記したごとく  
にSDS-PAGEによって分析した。第3の手法において、23℃にて、 $K^b$ sol (2.7 μM) を、  
各々、50 μMのOVA-8、VSV-8またはSEV-8ペプチドと 20  
共に2時間インキュベートした。試料を5%ポリアクリルアミドIEFゲルに適用した。  
IEFをpH5-7から流し、ゲルを銀で染色した。

次に、クロラミン-T方法 (Hunterら, Nature 194:495-6 (196  
2)) を用いてVSV-8ペプチドを放射性ヨウ素標識し、C<sub>18</sub>カラム (OPC car  
tridge, Applied Biosystems, Foster City, CA) によって遊離<sup>125</sup>Iを除去した。標識したペプチドをC<sub>18</sub>逆相HPLCによってさらに  
精製した。溶出の後、標識ペプチドを凍結乾燥し、PBS中に再懸濁した。

274 nmにおけるチロシンの吸光係数 (1420 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) を用いることによって、  
[<sup>125</sup>I] VSV-8の特異的活性 (約250 Ci/ミリモル) を分光光度法によって測  
定した。まず、23℃にて $K^b$ sol (0.5 μM) を [<sup>125</sup>I] VSV-8 (1.5 nM) 30  
および未標識VSV-8 (50 nM) と16時間で混合して、複合体形成を行った。試  
料の一部をPBS中のゲル濾過 (Superose 12, Pharmacia, Pisc  
ataway, NJ) によって分析した。溶出後、各画分 (0.05 ml) に含まれる放  
射能を測定した。280 nmにおける吸光度によって蛋白質をモニターした。

第2の手法において、[<sup>125</sup>I] VSV-8 (0.39 nM) を、1% ウシ血清アルブミ  
ン (BSA) を含有するPBS中の種々の濃度の $K^b$ solと混合した。23℃における  
2-16時間のインキュベーションの後、PBS中の小ゲル濾過 (Bio-Gel P3  
0, BioRad, Richmond, CA) によって、 $K^b$ -ペプチド複合体を遊離ペ  
プチドから分離した。P30ゲル濾過は約5分以内に結合および遊離ペプチドの95%を  
越える分離を可能とした。結合および遊離ペプチドの放射能を測定し、データを直線回帰 40  
によって解析した。供された $K^b$ solの最大レベルにおいて、全標識ペプチドの約65  
%が結合した。 $K^b$ sol蛋白質への標識ペプチドのこの最大結合能力は、恐らくは、V  
SV-8に結合した<sup>125</sup>Iによる放射のため、時間と共に低下した。

第3の手法において、各試料は0.39 nMの [<sup>125</sup>I] VSV-8 (約18,000 c  
pm)、示した濃度の未標識ペプチド、および72 μlの最終容量で未標識ペプチドの不  
存在下で [<sup>125</sup>I] VSV-8結合の約50%を与える30 nMの $K^b$ solを含有した。  
全ての成分を溶解させ、1% BSAを含有するPBSに希釈した。23℃における2-1  
6時間のインキュベーションの後、前記したP30ゲル濾過によって50 μl 試料を分析  
した。未標識ペプチドについての解離定数を [<sup>125</sup>I] VSV-8および未標識ペプチド  
のモル濃度から決定し、前記した $K^b$ solへの [<sup>125</sup>I] VSV-8結合の50%阻害を 50

与えた。(Mullerら, Meth. Enzymol. 92, 589-601 (1983) 参照)。

次いで、4℃、23℃および37℃で、K<sup>b</sup>sol (0.3 μM) および [<sup>125</sup>I] VSV-8 (0.39 nM) をインキュベートし、P30ゲル濾過によって種々の時点で会合を測定した。示した濃度でのインキュベーションの前に、要すれば、ネズミβ-2ミクログロブリンを添加した。組換えDrosophila細胞の培養上清から抗β-2ミクログロブリンポリクローナル抗体K355を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって、ネズミβ-2ミクログロブリンを調製した。(Logdbergら, Molec. Immun. 14:577-587 (1979) も参照)。もう1つの実験において、23℃にて、K<sup>b</sup>sol (0.3 μMまたは1.8 μM) および [<sup>125</sup>I] VSV-8 (2.4 nM) を2時間インキュベートし、P30ゲル濾過によってペプチド-K<sup>b</sup>sol 複合体を単離した。試料は非常に少量の [<sup>125</sup>I] VSV-8 および K<sup>b</sup>sol 複合体 (最大で2.4 nM) ならびに約50ないし300 nMの最終濃度の空のK<sup>b</sup>sol を含有した。いくつかの試料に、3 μMのβ-2ミクログロブリン、3 μMのβ-2ミクログロブリン+20 nMの未標識VSV-8、20 μMの未標識VSV-8、または1% TX-100を添加した。37℃で試料を種々の時間インキュベートし、P30カラムを通すことによって解離を測定した。

#### B. 考察

クラス I MHC分子は抗原性ペプチドを細胞傷害性T-リンパ球に提示する。イン・ビトロでのペプチドのクラス I 分子への直接結合は、結合部位における先に結合したペプチドの存在 (ChenおよびPerham, Nature 337:743-5 (1989)) または結合特異性の欠如によって妨害された。(例えば、Frelingerら, J. Exp. Med. 172:827-34 (1990); Choppinら, J. Exp. Med. 172:889-99 (1990); Chenら, J. Exp. Med. 172:931-6 (1990) 参照)。切形H-2K<sup>b</sup>sol およびネズミβ-2ミクログロブリン遺伝子で形質転換したDrosophila細胞から精製された可溶性の空のクラス I 分子へのペプチド結合のイン・ビトロ分析はをここに開示する。結果は、ペプチド結合が非常に迅速で、天然でプロセッシングされたペプチド (オクタペプチド; 例えば、Van Bleekら, Nature 348:213-6 (1990); Falkら, Nature 351:290-6 (1991) 参照) はナノモル範囲のK<sup>b</sup>sol に対する最高の親和性を有することを示し、オクタペプチドと複合体化したK<sup>b</sup>sol は安定であるが、他方、わずかに短いまたは長いペプチドと複合体化したものは寿命が短いことを示す。遊離重鎖およびβ-2ミクログロブリンとの間の相互作用は、界面活性剤の不存在では基本的に可逆的である。ペプチドは、β-2ミクログロブリンの解離なくして、自然発生的に空のクラス I 分子の結合する。しかしながら、過剰のβ-2ミクログロブリンは、ヘテロダイマーが不安定である条件下での遊離重鎖とβ-2ミクログロブリンとの再会合の結果として、空のクラス I へのペプチドの結合を明らかに促進する。

(重鎖のα1α2α3ドメインよりなる) 可溶性H-2K<sup>b</sup>分子およびネズミβ-2ミクログロブリンを、切形重鎖およびβ-2ミクログロブリン遺伝子で同時に形質転換されたDrosophila細胞の培養上清から精製した。予備の実験は、Drosophila細胞が細胞表面の内因性ペプチドを欠くクラス I MHC分子を発現することを示唆した。空のクラス I 分子の特性のいくつかは、それらが37℃で安定性が低く、それらの構造はペプチドの結合によって安定化されるという観察を含む。(例えば、Schumacherら, Cell 62:563-7 (1990); Ljunggrenら, Nature 346:476-80 (1990) 参照)。精製された可溶性K<sup>b</sup>も空であることを確認するために、界面活性剤を含まない溶液中でのそれらの熱安定性を調べた。驚くべきことに、47℃で1時間加熱された蛋白質は、コンフォメーション抗体Y3を用いる免疫沈降によって十分回収された。この予期せぬ結果は我々をして界面活性剤、1%トリトンX-100 (ポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル) を蛋白質溶液に添加せしめた。というのは、クラス I 分子の安定性をテストするための同様の実験は界面活

10

20

30

40

50

性剤溶解物中で常に行われてきたからである (Schumacherら, 前掲参照)。界面活性剤の存在下で得られた結果は、精製された $K^b$ s o l が今や $37^{\circ}\text{C}$ で不安定であることを示す。このおよび他の系列の証拠は、 $K^b$ s o l ヘテロダイマーが高温で重鎖および $\beta$ -2ミクログロブリンに解離し、 $\beta$ -2ミクログロブリンが解離した遊離重鎖と再会合するのを界面活性剤が妨げることを示唆する (後記参照)。第2に、ペプチドで精製された $K^b$ s o l を安定化させる可能性を調べた。最初に記載した実験の結果は、ペプチドは、それが天然にプロセッシングされたペプチドであることが示された (Van Bleeckら, 前掲引用) オクタペプタド (水泡性口内炎ウイルスヌクレオキャプシド蛋白質 [VSV-8]、後記表3参照) と混合された場合のみ安定化できることを示唆する。これらの観察は前記した空のクラスI分子の特性と合致する。

精製された $K^b$ s o l 分子は空であるという独立したサポートは、天然条件下での等電点電気泳動 (IEF) によって供される (データは示さず)。Drosophila細胞から精製された可溶性 $K^b$ はヒト・リンパ芽球細胞系から精製されたHLA-A2分子よりもかなり単純なパターンを呈した (Silverら, Nature 350: 619-22 (1991) の図3参照)。IEFでのHLA-A2の複雑なパターンは、分子に結合した異種ペプチドの存在の結果と推定される。精製された $K^b$ s o l の単純なバンドは内因性ペプチドの不存在を示す。加えて、 $K^b$ s o l と抗原性ペプチドとのインキュベーションはIEFゲルでのバンドの顕著なシフトを引き起こし、これはペプチド結合による $K^b$ s o l の等電点の変化を反映する。先に結合した内因性ペプチドの除去後に、HLA-A2を「復元条件」にペプチドと共にインキュベートするのでなければ、かかるバンドのシフティングは、HLA-A2分子をペプチドと単純に混合した場合は該分子では観察されなかったことに注意すべきである。考え併せると、天然IEF上でのこれらの観察も、Drosophila細胞から精製された可溶性 $K^b$ が空であることを示す。

$^{125}\text{I}$ -標識VSV-8と $K^b$ s o l との会合がゲル濾過によって示された (示さず)。高分子量物質の放射能はペプチド- $K^b$ s o l 複合体に対応し、他方、低分子量物質のそれは遊離ペプチドに対応する。未標識VSVおよびオボアルブミン (OVA) ペプチドは標識VSV-8と競合でき (後記参照)、 $[^{125}\text{I}]$  VSV-8は $K^b$ s o l 分子に特異的に結合していることを証明する。逆相HPLCは、 $K^b$ -結合  $[^{125}\text{I}]$  VSV-8が入力ペプチドと同一の保持時間を有することを明らかとした。標識VSV-8への $K^b$ s o l の結合は飽和性であり、約 $33\text{ nM}$ の解離定数 ( $K_D$ ) を示す (示さず)。Scatchardプロットのx-軸から、標識VSV-8の約65%が $K^b$ に結合し得ることが分かった。

種々のペプチドの $K^b$ に対する親和性を測定するために、 $[^{125}\text{I}]$  VSV-8を用いる競合ラジオイムノアッセイ (RIA) を行った (データは示さず)。RIAで用いた阻害性ペプチドを表3にリストする。各ペプチドについての $K_D$ を同様に表3にまとめる。

10

20

30

表 3

本実験で用いた種々の抗原性ペプチド\*

| <u>記号</u> | <u>配列</u>                | <u>K<sub>D</sub> (M)</u> |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| VSV-7     | GYVYQGL                  | $5.3 \times 10^{-8}$     |
| VSV-8     | RGYVYQGL                 | $3.7 \times 10^{-8}$     |
| VSV-9N    | LRGYVYQGL                | $7.3 \times 10^{-8}$     |
| VSV-10N   | DLRGYVYQGL               | $3.9 \times 10^{-7}$     |
| VSV-9C    | RGYVYQGLK                | $6.9 \times 10^{-8}$     |
| VSV-10C   | RGYVYQGLKS               | $2.1 \times 10^{-8}$     |
| OVA-8     | SIINFEKL                 | $4.1 \times 10^{-8}$     |
| OVA-9N    | ESIINFEKL                | $8.9 \times 10^{-8}$     |
| OVA-10N   | LESIINFEKL               | $2.8 \times 10^{-7}$     |
| OVA-9C    | SITNFEKLT                | $1.1 \times 10^{-8}$     |
| OVA-10C   | SIINFEKLTE               | $1.4 \times 10^{-8}$     |
| OVA-24    | EQLESIINFEKLTEWTSSNVMEER | $7.1 \times 10^{-5}$     |
| SEV-9     | FAPGNYPAL                | $2.7 \times 10^{-8}$     |

10

20

30

V S V - 8 : 水泡性口内炎ウイルスヌクレオキャプシド蛋白質  
 52-59 (Van Bleekら, Nature 348 :  
 213-216 (1990))。

O V A - 8 : オボアルブミン257-264 (Carbon  
 eら, J. Exp. Med. 169 : 603-12 (1989));

40

S E V - 9 : センダイウイルスヌクレオ蛋白質324-

3 3 2 ( S c h u m a c h e r ら , N a t u r e 3 5 0 :  
7 0 3 - 7 0 6 ( 1 9 9 1 ) )

\* 全てのペプチドは C<sub>18</sub> 逆相 H P L C に よ っ て 精 製 し て 、 異  
な る 結 合 特 性 を 持 つ よ り 短 い 汚 染 ペ プ チ ド を 排 除 し た 。 各 ペ プ  
チ ド に つ い て の 3 - 文 字 記 号 表 示 お よ び 配 列 番 号 を 以 下 に 与 え  
る 。

10

---

V S V - 7 : G l y T y r V a l T y r G l n G l y L e u  
( 配 列 番 号 4 0 、 残 基 番 号 4 - 1 0 )

V S V - 8 : A r g G l y T y r V a l T y r G l n G l y  
L e u ( 配 列 番 号 4 0 、 残 基 番 号 3 - 1 0 )

20

V S V - 9 N : L e u A r g G l y T y r V a l T y r G l  
n G l y L e u ( 配 列 番 号 4 0 、 残 基 番 号 2 - 1 0 )

V S V - 1 0 N : A s p L e u A r g G l y T y r V a l T  
y r G l n G l y L e u ( 配 列 番 号 4 0 )

30

V S V - 9 C : A r g G l y T y r V a l T y r G l n G l  
y L e u L y s ( 配 列 番 号 4 4 、 残 基 番 号 1 - 9 )

V S V - 1 0 C : A r g G l y T y r V a l T y r G l n G  
l y L e u L y s S e r ( 配 列 番 号 4 4 )

40

O V A - 8 : S e r I l e I l e A s n P h e G l u L y s

L e u (配列番号 39、残基番号 5 - 12)

O V A - 9 N : G l u S e r I l l e I l l e A s n P h e G l

u L y s L e u (配列番号 39、残基番号 4 - 12)

O V A - 10 N : L e u G l u S e r I l l e I l l e A s n P

h e G l u L y s L e u (配列番号 39、残基番号 3 - 12)

10

O V A - 9 C : S e r I l l e I l l e A s n P h e G l u L y

s L e u T h r (配列番号 39、残基番号 5 - 13)

O V A - 10 C : S e r I l l e I l l e A s n P h e G l u L

y s L e u T h r G l u (配列番号 39、残基番号 5 - 14)

20

O V A - 24 : G l u G l n L e u G l u S e r I l l e I l l

e A s n P h e G l u L y s L e u T h r G l u - T r p T h

r S e r S e r A s n V a l M e t G l u G l u A r g (配列

番号 39)

30

S E V - 9 : P h e A l a P r o G l y A s n T y r P r o

A l a L e u (配列番号 45)

天然にプロセッシングされたサイズのペプチド (V S V および O V A については 8 量体、  
 および センダイウイルス核蛋白質 (S E V) については 9 量体) は 2.7 ないし 4.1 n  
 M の範囲からの最高で顕著に類似の親和性を有した。天然ペプチドのこの過度に高い親和  
 性は最近の観察と合致する。(例えば、Schumacher ら, Nature 350 :  
 703-6 (1991) ; Christnick ら, Nature 352 : 67-70 (1991) 参照)。しかしながら、1 または 2 残基のように少しだけ短いまたは長いペ  
 プチドは 2 ないし 100 のファクターだけ親和性を低下させた。親和性のこの低下はかなり  
 長いペプチドでより顕著である ; すなわち、24 量体ペプチド (O V A - 24) の親和  
 性は O V A - 8 のそれよりも 10,000 倍低い。これらの結果は、より長いペプチドを  
 用いる初期の報告がマクロモル範囲の親和性を主張しているのが何故であるのかを説明  
 する助けとなる。例えば、Frelinger らおよび Choppin ら、共に前掲にて  
 引用参照)。カルボキシル末端におけるペプチドの伸長はアミノ末端における伸長よりも  
 親和性の破壊がかなり低いことは特に興味深い。H L A - A 2 の三次元構造によると、ペ  
 プチド結合溝 (groove) は反平行  $\beta$  鎖上の 2 つの長い  $\alpha$  ラセンによって形成され、窪み (cleft) は約 25 オングストローム長であり、これは約 8 残基の伸長ペプチドペプチド鎖

40

50

を収容すると提案されている（例えば、Bjorkmanら, Nature 329: 506-12 (1987)）。窪みの一方の端部において、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ラセンは密に接近し、他方、他の端部においては、窪みはかなり解放されている。今や、VSVおよびOVAペプチドは同一方向で窪みに結合し\*、ペプチドのカルボキシル末端は、カルボキシル末端におけるペプチドの伸長がひどい立体障害を引き起こさないように、窪みの比較的解放された端部と相互作用をするらしいと推定される。

次いで、実験を行って、各々、4℃および23℃における $K^b$ へのペプチド結合の速度を測定した（示さず）。結合は特に23℃で非常に迅速で、標識ペプチドの極端に低い濃度においてさえ（約0.4 nM）約5分の半減期であった。これは、約2時間の会合の半減期を示す従前の観察とは対照的である。（例えば、Choppinら、前掲にて引用参照）。再度、全標識ペプチドの65%のみが結合することができた。過剰の $\beta-2$ ミクログロブリンの添加は、 $K^b$ ヘテロダイマーが安定であるような（会合したまま）低温でのペプチド結合反応速度に影響しなかった。これは、 $\beta-2$ ミクログロブリンの変化がペプチド結合の前提要件ではない、すなわち、ペプチドは、 $\beta-2$ ミクログロブリンの解離なくして自然に空のクラスI分子に結合できることを意味する。対照的に、過剰の遊離 $\beta-2$ ミクログロブリンは見かけ上37℃においてペプチド結合を促進する（データは示さず）。添加した $\beta-2$ ミクログロブリンの濃度が増加するに従い、より多くのペプチドが $K^b$ 分子に結合した。空の $K^b$ は37℃で不安定であるので、ある分率のヘテロダイマーは重鎖および $\beta-2$ ミクログロブリンに解離し、それにより、ヘテロダイマーは遊離重鎖および遊離 $\beta-2$ ミクログロブリンと平衡している。そこで、 $\beta-2$ ミクログロブリンの付加は平衡を、ペプチドに結合できるヘテロダイマーの形成の方向にシフトするはずである。この見解は、通常の細胞表面にはかなりの数のクラスI遊離重鎖があり、外因的に付加された $\beta-2$ ミクログロブリンは、 $\beta-2$ ミクログロブリンと遊離重鎖との再会合の結果として細胞表面の空のクラスI分子へのペプチドの結合を容易とするという最近の観察によって裏付けられる。例えば、Rockら, Cell 65: 611-620 (1991); Kozlowskiら, Nature 349: 74-77 (1991); Vitellioに, Science 250: 1423-6 (1990) 参照）。

次いで、37℃におけるペプチドの解離速度が観察された。ゲル濾過によって $[^{125}\text{I}]$ VSV-8および $K^b$ 複合体を単離した直後、50または300 nMの $K^b$ を含有する試料を37℃の温度に暴露した。いくらかの試料には3  $\mu\text{M}$ の $\beta-2$ ミクログロブリンおよび/または20  $\mu\text{M}$ の未標識VSV-8、または1% TX-100を補足した。 $K^b$ からの標識ペプチドの解離を種々の時点で測定した（示さず）。大過剰の未標識ペプチドの存在下では、ペプチドの解離速度は一次反応に従い、解離半減期は約36分であった（ $3.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数）。この予期せぬ標識ペプチドの比較的速い解離は、安定なペプチド-クラスI複合体のいくつかの現在の見解と適合しない。事実、確認された結果（示さず）は、 $K^b$ およびVSV-8複合体が安定であることを示す。この矛盾は、未標識VSV-8（3.7 nM）と比較して、放射性同位体標識VSV-8の10-倍低い親和性（33 nM）から生起するに違いない。

未標識ペプチドの代わりに界面活性剤を添加した場合にも一次反応が観察され、これは界面活性剤はペプチド解離プロセスを不可逆なものとするを示す。対照的に、ペプチド解離プロフィールは、未標識ペプチドまたは界面活性剤の不存在下では一次反応には従わなかった。これは、ペプチドの会合/解離が可逆的で、ペプチドの結合はヘテロダイマーの濃度に依存することを示唆する（ $K^b$ の50 nMおよび300 nMの間の速度論を比較されたし）。これは、過剰の $\beta-2$ ミクログロブリンを添加した場合により明らかとなった。これらの結果は、重鎖、 $\beta-2$ ミクログロブリンおよびペプチドの間の相互作用が、界面活性剤の不存在下では、基本的には37℃において全くではないにせよ可逆的であるという従前の議論を支持する。恐らくは、TX-100のごとき界面活性剤は $\beta-2$ ミクログロブリンが37℃で遊離重鎖と再会合するのを妨げるであろう。これは、界面活性剤の不存在下で一旦高温まで加熱された $K^b$ が何故コンフォメーション抗体によって効果的に免疫沈降されるかを合理的に説明し得る（示さず）。興味深いことには、過剰の未標識

10

20

30

40

50

ペプチドの存在下で $\beta$ -2ミクログロブリンの添加がペプチド解離を抑制せず、これは、未標識ペプチドは $\beta$ -2ミクログロブリンの解離なくして複合体から放出されることを示す。しかしながら、 $[^{125}\text{I}]$  V S V-8の親和性は天然ペプチドのそれよりも約10倍低いことを思い出すべきである。従って、これは天然ペプチドの場合には必ずしも当てはまらない。

イン・ビトロのペプチド-結合アッセイ系を用いる実験は、クラス I 分子へのペプチド結合が単純な質量作用かつリガンド-受容体相互作用であることを示唆する。ここに使用したアプローチは、クラス I 分子のペプチド結合特異性、および T-細胞受容体とのペプチド-クラス I 複合体の相互作用の特徴付けを可能とする。

#### 実施例 8

10

#### 治療的適用

##### A. クラス I 分子バンク

50ないし100の最も通常のクラス I MHC重鎖のうちの1つ、 $\beta$ -ミクログロブリン、ならびに少なくとも1つの助力分子 (assisting molecule) を発現する各細胞系でもって、昆虫細胞系の貯蔵器または「バンク」を確立し、維持できる。これらの蛋白質をコードする cDNA を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を介して、それを含有する細胞系から得られた HLA 変異体に基づいてクローン化し (Ennie ら, PNAS USA 87: 2833-7 (1990) 参照)、昆虫発現ベクターのごとき適当なベクターに挿入して、各 HLA 変異体を発現する細胞系を得ることができる。

例えば、以下のプロトコルに従うテストを用いて、選択したウイルスに由来するいずれのペプチドが種々のクラス I MHC 分子に最良に結合するかを判断することができる。種々の培養を適当に標識またはカタログを付して、いずれのクラス I MHC 分子が特定のペプチドでの使用に最良であるかを示すことができる。別法として、要すれば、一過性培養を確立することができる。ここに議論するごとく、昆虫細胞とベクターとの培養のば48時間のインキュベーションの後に、その培養は、 $\text{CD}8^+$ 細胞を活性化する目的で選択されたペプチド(類)を負荷できる空のMHC分子を明らかに発現できる。

20

##### B. 「特異的」細胞系の調製

HLAのタイプ分けの後、もし好ましいHLAを発現する昆虫細胞系が入手できなければ、好ましいHLAおよび助力分子をコードするcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応の使用を介してクローン化できる。前記B. 1節に開示したプライマー(配列番号1ないし配列番号12)を用いて、別々の反応において、適当なHLA-A、-B、-C、-E、-Fまたは-G cDNAを増幅でき、次いで、実施例1に開示した方法に記載したごとくに、これをクローン化し配列決定できる。次いで、Gene Cleanキット(Bio 101, San Diego, CA)を用いてDNAをPCR反応から精製し、pRMH a-3のSma I部位に直接連結することができる。個々のクローンを単離し、配列を確認し、HLAを発現する安定なDrosophila細胞系を確立した。別法として、組換えプラスミドの大集団を大規模に増殖させ、塩化セシウム勾配によってDNAを精製することができる。次いで、精製したDNAを用いて、リン酸カルシウム沈殿法を用い、S2細胞をトランスフェクトする。24時間後、沈殿を細胞から洗い去り、1mM  $\text{CuSO}_4$ を含有する新鮮なSchneider培地で置き換える。48時間後、一過的にトランスフェクトされた細胞の大集団を、同系ペプチドまたは特異的蛋白質のプロテアーゼ消化物とのインキュベーションの後に、 $\text{CD}8^+$ のイン・ビトロ活性化で用いる。

30

40

次いで、クローン化HLAを発現する安定な細胞系を確立することができる。別法として、PCR反応からのクローン化組換え分子の大集団を一過的に発現する昆虫細胞の集団をイン・ビトロ $\text{CD}8^+$ 活性化で用いることができる。

また、細胞系で発現されたI MHCがイン・ビボで発現されたエレメントではない場合、ペプチドと共にインキュベートされたクラス I MHCを発現する昆虫細胞を用い、ハプロタイプ-特異的 $\text{CD}8$ を活性化することが可能である。これは、対立遺伝子制限のためにイン・ビボでは可能でない、特定のMHCと会合した特異的抗原を認識する $\text{CD}8^+$ 細胞を増殖させるユニークな機会を提供する。例えば、インフルエンザウイルスの核蛋白

50

質からのペプチド (NP) は通常  $D^b$  分子に制限されている ; しかしながら、我々は、かかるペプチドは  $K^b$  ( $D^b$  よりも弱いにも拘わらず) に結合でき、 $K^b$  に対するある程度の熱安定性を生じさせることができることを見い出した (図 3 参照)。さらに NP ペプチドと共にプレインキュベートし、B6 マウスからの脾臓細胞と共培養した  $K^b$ -発現 *Drosophila* 細胞により、NP ペプチドと会合した  $K^b$  分子を特異的に認識する  $CD8^+$  がイン・ビトロで活性化される。加えて、オボアルブミンに由来する  $K^b$ -制限ペプチド (OVA) および  $D^b$ -発現 *Drosophila* 細胞を用いる逆実験の結果、OVA ペプチドを含有する  $D^b$  を特異的に認識する  $CD8^+$  が増殖される。かかる  $CD8$  は、オボアルブミンをコードする cDNA でトランスフェクトされた細胞 (EL4 OVA) を殺すことができ、これは、イン・ビボで、いくらかの  $D^b$  分子に OVA ペプチドが負荷されることを示す。

10

従って、この系は、イン・ビボでは、そのペプチドに対して制限的エレメントではないクラス I 分子によって提示された特異的抗原に対して  $CD8^+$  を増殖させるユニークな機会を提供する。十分な抗原が、 $CD8^+$  によって認識され殺されるべき細胞に対して該クラス I によってイン・ビボで提示され、かかる  $CD8$  をイン・ビボで増殖させるのは十分ではない。*Drosophila* 細胞によって発現される空のクラス I 分子にペプチドを負荷させることにより、我々は、十分な抗原がクラス I によって提示されて、この複合体を認識する特異的  $CD8^+$  を活性化するように、非競合的環境において過剰の抗原性ペプチドをクラス I 分子に供することによってイン・ビボ制限をなくすることができる。

#### C. AIDS - 治療

20

イン・ビボ療法のために、イン・ビトロ活性化細胞を患者に投与することができる。好ましくは、個体のクラス I MHC 遺伝子型 (ハプロタイプ) をまず決定する。慣用的な組織タイプ分けがこの目的に適し、治療センターによって、あるいはある適当な商業的操作によって行うことができる。一旦個体の HLA タイプ (類) が決定されたならば、個々の患者に適したペプチドおよびクラス I MHC 分子の最良の組合せを確認し、前記したごとくに調製し、適当な昆虫細胞系およびペプチドを供する。次いで、患者の血液からの休止中のまたは前駆体  $CD8^+$  T-細胞を、昆虫細胞培養によって生成された適当なペプチド-負荷 MHC で刺激する。活性化の後、 $CD8^+$  細胞を患者の血流に再度導入し、患者における病気のプロセスを継続してモニターする。細胞成分を取り出し、再度導入する方法は当該分野で公知であり、Honsik らに対する米国特許第 4, 844, 893 号および Rosenberg に対する米国特許第 4, 690, 915 号に例示されているもののごとき手法を含む。

30

要すれば、病気が十分に治癒されるまで、さらなる治療を加えることができる。同様の治療プロトコルは、移植患者、老人等を含めた他の免疫抑制された個体での使用に適する。

#### D. 癌治療

癌患者において、前記したのと同様の治療手法が利用される。しかしながら、かかる患者においては、腫瘍塊を減少させる通常の療法をここに記載する免疫療法に先行させることができることは予期される。従って、免疫細胞を破壊する傾向にある、照射または化学療法のごとき通常の療法の開始に先立って、推定患者からの血液試料を得て、(例えば、凍結を介して) それを保存するのが好ましい。もしあってもウイルス感染に応答して生じる癌の形態は少ないので、免疫治療のための標識ペプチドは容易には観察されない。しかしながら、最近の研究は、オンコジーン *ras*、*neu*、および *p53* における突然変異が癌の全ケースのうち 50% までにおいて癌に寄与することを示している。かくして、これらの突然変異した分子領域に由来するペプチドは本療法のための標的として第一の候補である。ここに開示するプロトコルに従い、個々の患者のためのペプチドおよびクラス I 分子の最良の組合せを決定し、投与することができる。

40

例えば、多くの腫瘍は冒された個体に由来する  $CD8^+$  細胞によってイン・ビトロで認識される抗原を発現する。本発明の方法を用いる正確に標的化された免疫治療のために、通常の細胞では発現されないかかる抗原はかくして同定でき、ならびにそれを  $CD8^+$  細胞に提示する HLA タイプも同様である。例えば、van der Bruggen らは、

50

その発現が特異的遺伝子によって指示される抗原を記載しており、その抗原はH L A A 1によって提示されるようである（S c i e n c e 2 5 4 : 1 6 4 3 - 1 6 4 7 1 ( 1 9 9 1 ) ）。種々のヒト腫瘍抗原が単離され、記載されているので、それらはここに記載するごとく免疫治療適用のための良好な候補となる。

もう1つの別の治療様式において、他の免疫原と組み合わせて、本発明のイン・ビトロで活性化したC D 8 <sup>+</sup>細胞を投与することも可能である。例えば、米国特許第5, 0 4 5, 3 2 0 号に開示されている大きな多価免疫原を活性化C D 8 <sup>+</sup>細胞と組み合わせて投与できる。

また、T-細胞の分化および活性化を媒介するI L - 2およびI L - 4のごときサイトカインも同様に投与できる。というのは、サイトカインはイン・ビボで腫瘍細胞に対するT-細胞応答を刺激できるからである。I L - 2はC D 8 <sup>+</sup>前駆体の増殖および分化ならびにC D 8 <sup>+</sup>増殖で主要な役割を演じていると考えられている。I L - 2の癌患者への投与は、しばしば、腫瘍-特異的T-細胞の誘導に関連するようである改良された抗-腫瘍応答と関連する。しかしながら、I L - 2の最良の治療効果は、I L - 2の全身的ではなくむしろ継続的な局所投与によって得られ、かくして、I L - 2の毒性を最小化し、その生物学的活性を延ばす。I L - 2遺伝子構築体で腫瘍細胞をトランスフェクトすることによって局所的送達を達成することができる。

I L - 2 c D N AはE u r . J . I m m u n o l . 1 8 : 9 7 - 1 0 4 ( 1 9 8 8 ) においてK a r a s u y a m aおよびM e l c h e r sによって記載されているごとくに構築される。I L - 2の完全なc D N A配列はプラスミドp B M G n e o I L - 2からX h o I断片として得られ（K a r a s u y a m aおよびM e l c h e r s, 前掲参照）、p R m H a - 3中のS a l I部位に直接連結される。（H i n d I I Iでの制限マッピングを介して決定して）正しい向きのインサートを持つ組換えp R m H a - 3プラスミドはセシウム勾配によって精製され、これを用いて、リン酸カルシウム技術を用い、S 2細胞を共トランスフェクトする。（プラスミドD N Aの混合物をこの目的で調製した；I L - 2 c D N Aを含有する1 0 μ gのp R m H a - 3、M H CクラスI重鎖またはβ-2ミクログロブリンを含有する各々6 μ gのp R m H a - 3プラスミドおよび2 μ gのp h s h s n e o D N A）。C u S O <sub>4</sub>を介して誘導できて、重鎖、β-2ミクログロブリンおよびI L - 2を発現する安定な細胞系は、トランスフェクタントをG 4 1 8培地で増殖させることによって得た。これらの安定な細胞系をペプチドで被覆し、前記したごとくイン・ビトロアッセイで用いた。I L - 2でトランスフェクトした腫瘍細胞は、親腫瘍細胞に対するC T L（C D 8）活性を増給し、イン・ビボでの抗腫瘍または細胞傷害性応答の誘導におけるC D 4およびT-ヘルパー機能を逸らすことが観察されている。従って、I L - 2遺伝子との共トランスフェクションを介するD r o s o p h i l a系の可能性を増大させることをここに提案する。

#### 実施例 9

##### 抗原-提示系を用いる活性化T-細胞の産生の用量依存性

抗原-提示細胞（antigen-presenting cells: A P C）は、実施例 3に記載したごとくにD r o s o p h i l a細胞をトランスフェクトすることによって生成させ、次いで、トランスジェニックマウスの2 C系からのT-細胞に抗原を提示するその能力につきテストした。抗原-提示細胞としてのマウス細胞に関しては、この系は、クレブス回路酵素、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（O G D H）に由来する内因性8-量体ペプチド、p 2 C a（L e u - S e r - P r o - P h e - P r o - P h e - A s p - L e u、配列番号4 6）で複合体化したL<sup>d</sup>分子につき強力なアロ反応性を呈する。該p 2 C aペプチドはB 1 0 . D 2細胞のごときH-2<sup>d</sup>細胞の表面のL<sup>d</sup>に暴露されて天然でそれに結合する。該p 2 C aペプチドは可溶性L<sup>d</sup>分子に対して中程度の結合親和性（ $4 \times 10^6 M^{-1}$ ）および2 C T C R分子に対して高親和性（ $2 \times 10^6 M^{-1}$ ないし $1 \times 10^7 M^{-1}$ ）を有する。密接に関連する9-量体ペプチド、Q L 9（G l n - L e u - S e r - P r o - P h e - P r o - P h e - A s p - L e u、配列番号4 7）はこれらの分子に対して高親和性（L<sup>d</sup>に対して $2 \times 10^8 M^{-1}$ および2 C T C Rに対して $2 \times 10^7 M^{-1}$ ）を有する。N末端

10

20

30

40

50

の1つの付加的アミノ酸（グルタミン）を除き、Q L 9はp 2 C aと同一の配列を有し、p 2 C aと同様に、O G D Hの天然配列の一部を形成する。

（合成形態で調製した）p 2 C aおよびQ L 9ペプチドを用いて、成熟非感作2 C C D 8<sup>+</sup>細胞に対する抗原－提示細胞要件をイン・ビトロで調べた。まず、m A b＋補体処理、続いて陽性パニングにより、C D 4<sup>+</sup>細胞、クラスI I－陽性細胞およびB細胞を除去することによって、C 5 7 B L／6（B 6、H－2<sup>b</sup>）バックグラウンド上の2 C マウスのプールしたリンパ節（L N）から応答体C D 8<sup>+</sup>細胞を精製した。

組織グラインダーを用い、若い成体マウスのプールした頸部、腋窩、鼠蹊および腸間膜L Nから細胞懸濁液を調製した。細胞の精製には、L N細胞をまず3 7℃でm A b（抗－C D 4、抗－H S A、抗－I－A<sup>b</sup>）＋補体のカクテルで4 5分間処理した。生き残った細胞を、抗－C D 8 m A bで被覆したペトリ皿上で4℃で6 0～9 0分間パニングすることで、更にC D 8<sup>+</sup>細胞とC D 8<sup>-</sup>（C D 4<sup>-</sup>）細胞に分けた。付着されたC D 8<sup>+</sup>細胞を、3 7℃で5分間インキュベートし、続いて激しくピペッティングすることによって回収した。非付着細胞を溶出させ、抗－C D 8 m A bおよび補体で処理してC D 8<sup>-</sup> I B 2<sup>+</sup> 2 C細胞を得た。得られたC D 8<sup>+</sup>細胞の9 5%より多くがクロノタイプ－陽性（I B 2<sup>+</sup>）であって、これらの細胞の9 8%がナイーブな（C D 4 4<sup>1 0</sup>）表現型を呈した。

T C R刺激は細胞内事象の複合体パターンを誘導し、これは細胞表面のC D 6 9およびC D 2 5（I L－2受容体またはI L－2 R）の初期上昇調節に導いた。これらの変化は刺激から数時間内に明白であり、続いて、サイトカイン合成および細胞増殖が起こる。D r o s o p h i l a細胞をL<sup>d</sup>、L<sup>d</sup>およびB 7. 1（L<sup>d</sup>、B 7）、L<sup>d</sup>およびI C A M－1（L<sup>d</sup>、I C A M）またはL<sup>d</sup>、B 7. 1およびI C A M－1（L<sup>d</sup>、B 7. I C A M）についての遺伝子でトランスフェクトした。図1 1は、トランスフェクトされたD r o s o p h i l a細胞およびp 2 C a対Q L 9ペプチド、濃度1 0 μ Mで1 2時間刺激した精製ナイーブC D 8<sup>+</sup> 2 C細胞上のC D 6 9およびC D 2 5発現を示す。精製C D 8<sup>+</sup> 2 C細胞を、バルク（2 m l）培養中の種々のD r o s o p h i l a細胞＋ペプチド（p 2 C aまたはQ L 9いずれか、1 0 μ M）と共に1 2時間インキュベートし、次いで、C D 6 9またはC D 2 5につき染色した。L<sup>d</sup>、B 7、L<sup>d</sup>、I C A MまたはL<sup>d</sup>、B 7. I C A MでトランスフェクトしたD r o s o p h i l a細胞によって提示されたp 2 C aまたはQ L 9はC D 6 9およびC D 2 5の上昇調節を刺激するにおいて効果的であった。しかしながら、ペプチドまたはD r o s o p h i l a細胞なくしての非培養2 C細胞はC D 6 9およびC D 2 5の上昇調節を示さなかった（頂部パネル）。

L<sup>d</sup>単独を発現するD r o s o p h i l a細胞の存在下において、C D 8<sup>+</sup> 2 C細胞上のC D 6 9およびC D 2 5の誘導は、強力なQ L 9ペプチドに関しては、低いものの有意であったが、弱いp 2 C aペプチドではかろうじて検出可能であった。L<sup>d</sup>、B 7またはL<sup>d</sup>、I C A M抗原－提示細胞に関しては、両ペプチドはC D 6 9およびC D 2 5の顕著な上昇調節を誘導した。しかしながら、L<sup>d</sup>、B 7. I C A M抗原－提示細胞はこれらの分子のより高い発現を誘導した。

L<sup>d</sup>単独でトランスフェクトしたD r o s o p h i l a細胞は外因性リンホカインの不存在下で2 C C D 8<sup>+</sup>細胞のp 2 C aまたはQ L 9ペプチドいずれかへの増殖を引き起こさず、C D 6 9およびC D 2 5発現を誘導する抗原－提示細胞としてのこれらの細胞の最小能力と合致する。結果を図1 2に示す。示した濃度のペプチドの存在下または不存在下で、5 × 1 0<sup>6</sup>の精製C D 8<sup>+</sup> 2 C細胞を2 × 1 0<sup>5</sup>のD r o s o p h i l a細胞と共に3日間培養することによって、p 2 C a（上方）およびQ L 9（下方）に対する応答を測定した。培養の最後の8時間の間に[<sup>3</sup>H] T d Rを添加し；r I L－2を2 0ユニット／m lの最終濃度で添加した。データは三連の培養の平均値である。しかしながら、外因性I L－2を補足した場合、両ペプチドは高用量（1 0 μ M）で有意な増殖応答を刺激した。Q L 9によって誘導された増殖応答はp 2 C aよりもはるかに強力であった（上方および下方パネルのx－軸の縮尺の間の大きな差異に注意されたい）。

p 2 C aペプチドペプチドを提示し、L<sup>d</sup>、B 7. I C A MでトランスフェクトされたD r o s o p h i l a細胞によって誘導された第3日における増殖についての用量－依存的

10

20

30

40

50

関係を、Q L 9 ペプチドを提示する  $L^d$ ・B7、 $L^d$ ・ICAMまたは  $L^d$ ・B7・ICAMでトランスフェクトした *Drosophila* 細胞によって誘導されたものと比較した。結果（三連培養の平均）を図13に示す。*Drosophila* APC ( $2 \times 10^6$  細胞) をペプチドの存在下または不存在下で  $5 \times 10^4$   $CD8^+$  2C細胞と共に3日間培養した。 $[^3H]$  TdRを培養の最後の8時間の間に添加し；IL-2は培養に添加しなかった。

第3日における  $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞によって誘導された最適増殖応答は高濃度のp2Caペプチド、例えば  $10 \mu M$  ( $10^{-5} M$ ) を要した（図13）。Q L 9 ペプチドについての結果は異なっていた。 $L^d$ ・B7抗原-提示細胞+Q L 9および  $L^d$ ・ICAM抗原-提示細胞+Q L 9についての用量-応答曲線を、 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞+p2Caについての結果に近似した（図13）。しかしながら、 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞に関しては、第3日におけるQ L 9に対する増殖応答は  $100 nM$  ( $10^{-7} M$ ) で最大であり、 $10 pM$  と低い用量 ( $10^{-11} M$ ) で明らかに明白であった（図13）。高用量、例えば  $10 \mu M$  ( $10^{-5} M$ ) では、Q L 9は第3日において増殖応答を阻害した（図13、対数スケールに注意されたし）。

$L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞およびQ L 9ペプチドによる増殖の阻害はIL-2産生については当てはまらず（図14、右）、それは高用量の抗原-提示細胞で観察されたに過ぎなかった（図14、左）。 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞+Q L 9ペプチドは、再度、 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞+p2CaペプチドよりもIL-2産生を誘導するにおいてより効果的であることが判明した（図14、右）。データは、ペプチドなくしての抗原-提示細胞がテストした抗原-提示細胞密度の100倍の範囲にわたっていずれかの応答を誘導するにおいて効果が無かったことを示している（図14、「-p e p」開いた四角）。

Q L 9ペプチドと  $L^d$ ・B7、 $L^d$ ・ICAMまたは  $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞を用い、第3日、第4日および第5日における  $CD8^+$  2C細胞の応答の用量-応答関係における変化を調べた。結果を図15に示す。示したペプチド濃度にて  $5 \times 10^6$   $CD8^+$  2C細胞および  $3 \times 10^5$  抗原-提示細胞にて応答を測定した。データは三連の培養の平均結果である。

$100 nM$  ( $10^{-7} M$ ) Q L 9ペプチドの中間的用量に関しては、 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞に対する増殖応答は第3日には高く（図15、左）、第4日にはピークに達し（図15、中央）、次いで、第5日には低レベルまで減衰した（図15、右）。しかしながら、 $10 \mu M$  ( $10^{-5} M$ ) Q L 9ペプチドの高用量に関しては、応答は第3日には低く（図15、左）、しかし次いで第5日には高ピークまで顕著に増加した（図15、右）。

T細胞/APC相互作用の親和性が非常に高い場合には、第3日にQ L 9によって誘導された増殖の一過性阻害が観察されたに過ぎなかった。低用量のAPC（図14、左）または低用量のQ L 9ペプチド（図15、左）を用いることによって、T細胞/APC相互作用の親和性を低下させると、第3日の増殖応答を増大させた。T細胞/APC相互作用の親和性を低下させると、初期（第3日）増殖応答を増強させたが、後期（第5日）応答を低下させ、また、IL-2産生（図16、右）を低下させた。図16において、第2日、第3日、第4日および第5において  $CD8^+$  2Cおよび  $CD8^-$  細胞を用いて得られた結果を比較する。

観察は高度に免疫原性の  $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞に適用される。しかしながら、免疫原性のより低い  $L^d$ ・B7または  $L^d$ ・ICAM抗原-提示細胞に関しては、Q L 9ペプチドに対する増殖応答には高用量のペプチドを要し（図13、図15）、応答体細胞による  $CD8$  発現に大きく依存した（図16）。 $L^d$ ・B7および  $L^d$ ・ICAM抗原-提示細胞でのこれらの応答は（第5日ではなくむしろ）第3日または第4日にピークに達し、 $L^d$ ・B7・ICAM抗原-提示細胞でのものよりもはるかに低かった。低用量のQ L 9、例えば  $1 nM$  ( $10^{-9} M$ ) では、 $L^d$ ・B7および  $L^d$ ・ICAM抗原-提示細胞での増殖応答は全く検出できなかった ( $< 100 cpm$ )（図13）。これは、 $1 nM$  Q

10

20

30

40

50

L9が高応答に導いた ( $>10,000\text{ cpm}$ )、 $L^d$ . B7. ICAM抗原-提示細胞を用いて観察された結果と顕著に対照的であった (図13)。高用量のQL9ペプチド ( $10\text{ }\mu\text{M}$ 、表2)での結果とは対照的に、増殖応答についてのB7およびICAMの間の相乗的相互作用が低ペプチド用量で顕著となった。

理解されるごとく、 $L^d$ . B7. ICAM細胞はナイーブ2C細胞に対して極度に優れた抗原-提示細胞として作用する。T細胞/APC相互作用の親和性を高レベルまで上昇させると、初期の増殖応答を阻害するが、後期応答を増強し、IL-2産生は増強される。QL9のごとき高親和性ペプチドについては、B7およびICAMの間の共働が低用量の抗原で顕著である。

#### 実施例10

10

##### 抗原提示系を用いる細胞傷害性T細胞の産生

実施例3に記載したごとくにDrosophila細胞をトランスフェクトすることによって抗原-提示細胞 (APC) を生産し、次いで、CTL活性を誘導するその能力につきテストした。CTL活性は、QL9ペプチド、ペプチドは無しまたは無関係ペプチド (MCMV) で感作した $^{51}\text{Cr}$ -標識RMA. S- $L^d$ 標的でテストした。24-ウェル培養プレート (Cai, Z. および J. Sprent (1994)) 中、2mlの容量にて、 $\text{CD8}^+$  2C細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を  $2 \times 10^6$  トランスフェクトDrosophila細胞と共に培養した。10mMの濃度にて培養の間にペプチドを存在させた。4日後、細胞をプールし、所要数に調整した。標的を調製するために、ペプチドの存在下または不存在下でRMA-S.  $L^d$ 細胞を  $37^\circ\text{C}$  にて $^{51}\text{Cr}$  ( $100\text{ mCi} / 1-2 \times 10^6$ 細胞) で90分間標識した。標識の後、細胞を徹底的に洗浄し、ペプチドを含むまたは含まない培地に再懸濁した。特異的 $^{51}\text{Cr}$ 放出を確立された手法によって計算した (前掲)。

20

バルク培養中、 $10\text{ }\mu\text{M}$  QL9ペプチドに対してCTL活性を誘導する $L^d$ . B7、 $L^d$ . B7. ICAMおよび $L^d$ . ICAM抗原-提示細胞の能力を図17に示す。強力に免疫原性の $L^d$ . B7. ICAM抗原-提示細胞はQL9-特異的CTLを生成するのに効果的であった (図17、中央)。有意には、 $L^d$ . B7抗原-提示細胞もQL9に対してCTLを生成するのに効果的であった (図17、左)。しかしながら、驚くべき発見は、 $L^d$ . ICAM抗原-提示細胞が全くCTL生成を刺激できなかったことである (図17、右)。この結果 (3つの異なる実験の代表) は予期せぬことであった。何故ならば、 $L^d$ . ICAM抗原-提示細胞はQL9に対する増殖応答を誘導するにおいて $L^d$ . B7抗原-提示細胞ほど低くはなかったからである (図13および15)。図17における $L^d$ . ICAM-刺激培養は多数の芽細胞を含有し、合計細胞収量は入力数よりも3倍高かった。

30

驚くべき発見は、 $L^d$ . ICAM抗原-提示細胞が外因性リンホカインを補足しなかった培養に対して適用されたCTL生成を全く刺激できなかったことである。しかしながら、外因性IL-2を培養に添加すると、 $L^d$ . ICAM抗原-提示細胞はQL9に対して強力なCTL活性を誘導した (図18、右;  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  外因性IL-2)。

#### 実施例11

##### 抗原-提示系によって誘導された通常T細胞の増殖

抗原-提示細胞 (APC) は、実施例3に記載されたごとくにDrosophila細胞をトランスフェクトすることによって生成させ、次いで、正常 (非トランスジェニック) ネズミT細胞において増殖を誘導するそれらの能力につきテストした。

40

2C TCRトランスジェニック $\text{CD8}^+$ 細胞の強力な一次応答を誘導する $L^d$ . B7. ICAM Drosophila細胞の能力は、Drosophila細胞が正常 (非トランスジェニック)  $\text{CD8}^+$ 細胞について抗原-提示細胞として作用し得るか否かという議論を生じた。2CマウスはB6 ( $\text{H-2}^b$ ) バックグラウンド上にあったので、正常B6  $\text{CD8}^+$ 細胞の応答をテストした。通常B6マウスからの $\text{CD8}^+$ 細胞の段階移行用量を、 $L^d$ . B7. ICAM Drosophila抗原-提示細胞によって提示された $10\text{ }\mu\text{M}$  QL9ペプチドと共に培養した。すなわち、発散レパトリのT細胞を高濃度ではあるが単一のアロ抗原 ( $L^d + \text{QL9}$ ) のみに暴露した状況であった。図19 (左) に

50

示すごとく、 $L^d$ 、B7、ICAM抗原－提示細胞によるQL9の提示は、事実、正常B6  $CD8^+$ 細胞に対して免疫原性であって、添加されたサイトカインの不存在下で、大用量の応答体細胞 ( $1 \times 10^6$ ) にて第3日に認識され得る増殖応答に導いた；無関係ペプチドMCMVに対する応答はかなり低く（しかし有意）、ペプチドの不存在下では応答は起こらなかった。予期されたごとく、正常B6  $CD8^+$ 細胞のQL9+ $L^d$ 、B7、ICAM抗原－提示細胞に対する応答は抗原提示細胞としての正常B10、D2脾臓細胞についてのものよりも実質的に低かった（ここに、アロ刺激体は、低濃度ではあるが、 $L^d$ 、 $K^d$ および $D^d$ に結合した多数の自己抗原によって供した）（図19、右、Y軸の縮尺に注意）。

#### 実施例12

#### 固定化精製組換えMHCクラスI分子および助力分子を用いる細胞傷害性T－細胞の活性化

断りのある場合を除き、細胞、材料および試薬は実施例4に記載したごとくに調製した。ビオチン化抗－マウスCD28モノクローナル抗体（クローン37.51）はPharmingen（San Diego, CA）から購入した。また、この抗体はCaltag（South San Francisco, CA）からも入手可能である。CD28共刺激性受容体、T－細胞の表面のB7.1およびB7.2のリガンドに結合するこの抗体はT－細胞の増殖を増加させる（Grossら, J. Immunol. 149, 380－388, 1992）。IL-2をコンカナバリンA上清として用いた（10%最終濃度）。

基材は以下のごとく調製した：1マイクログラム/mlのニュートラビジンを含有する50マイクロリットルのPBSを96ウェル細胞培養プレート（Corning カタログ#25860）の各ウェルに添加した。室温での2時間後、ビオチン化分子とのインキュベーションに先立って、ウェルをPBSで3回洗浄した。実施例4でアビジン－被覆ヒツジ赤血球細胞につき記載したごとくに、アビジン－被覆マウス赤血球細胞を調製した。アビジン－被覆ラテックスビーズは実施例4に記載したごとくに調製した。

組換え $L^d$ のビオチン化は実施例4に記載したごとくに行った。ビオチン化組換え $L^d$ を、ビオチン化抗－CD28抗体と共に基材上に固定化した。アビジン－被覆赤血球細胞またはラテックスビーズを0.2mg/mlのビオチン化 $L^d$ 、0.025mg/mlビオチン化抗－CD28、またはその混合物と共に室温にて30分間インキュベートし、次いで、10%FCSを含有するDMEM中で3回洗浄し、直ちに使用した。アビジン－被覆96ウェルプレートをウェル当たり50マイクロリットルの2マイクログラム/mlビオチン化 $L^d$ 、0.25マイクログラム/ml抗－CD28、またはその混合物と共に室温で30分間インキュベートし、次いで、10%FCSを含有するDMEMを用いて3回洗浄し、直ちに使用した。

2C+T－細胞は実施例4に記載したごとくに調製した。C57BL/6マウスからの $CD8^+$ 細胞は磁気涸渇によってこれらのマウスのリンパ節から調製した。精製した細胞は、フローサイトフルオロメトリーで測定して、CD8発現につき一貫して90－92%陽性であった。

T－細胞活性化は精製 $L^d$ 分子および抗－CD28抗体で被覆した培養プレートで行った。T－細胞およびペプチド（0.02mM最終濃度）を、0.2ml/ウェルの最終容量にて、 $L^d$ および/または抗－CD28で被覆した96ウェルプレートに添加し、5% $CO_2$ を含有する湿潤雰囲気中、37℃にて適当な時間培養した。

精製 $L^d$ 分子および抗－CD28抗体で被覆した赤血球細胞またはラテックスビーズを用いるT－細胞活性化は、非被覆培養プレートで行った。T－細胞およびペプチド（0.02mM）を、100,000赤血球細胞またはラテックスビーズと共に各ウェルに添加した。最終容量は0.2mlであった。培養条件は前記した通りである。

T－細胞分裂促進は、三連の培養により、ウェル当たり1 $\mu Ci$ のトリチウム化チミジンのパルスの取り込みによってアッセイした。8時間後に細胞を収穫し、チミジン取り込みをシンチレーションカウンター中の濾液をカウントすることによって測定した。

L<sup>d</sup>を発現するRMA- S細胞（標識細胞）を37℃にて放射性標識クロムと共に90分間インキュベートし、3回洗浄し、0.01mMの適当なペプチドの存在下、96ウェルU-底プレート（Coaster カタログ番号3799）中に分配した（ウェル当り5000～10000細胞）。種々の量の活性化T-細胞（エフェクター細胞）を、150および1の間の範囲のエフェクター／標的比率（E／T比率）に到達するように添加した。37℃での5時間のインキュベーション後、0.1mlの上清を各ウェルから収集し、ガンマカウンターでカウントした。パーセント溶解を標準的方法（Coliganら, Current Protocols in Immunology, 3.11節, Wiley, New York (1991)）によって測定した。

固定化精製L<sup>d</sup>および抗-CD28抗体は2C+T-細胞に対して分裂促進的であった。QL9ペプチドを用いる場合、ウェル当たり100,000cpmを超えるチミジン取り込みが一貫して3-5日の培養によって測定された（図20）。3つの活性化方法（プラスチック上、赤血球細胞上またはラテックスビーズ上に固定化された分子）のうちいずれを用いてもその同一範囲の最大チミジン取り込みが得られた。活性化分子をプラスチックに固定化した場合、プラスチック上の固定化したL<sup>d</sup>単独は一過性分裂促進を誘導し（図20、破線）、他方、L<sup>d</sup>+抗-CD28抗体はより高くより持続した分裂促進を誘導した（図20、実線）。L<sup>d</sup>に加えて、抗-CD28抗体が、赤血球細胞を用いるモデルにおいて、いずれの分裂促進の誘導にも必要であった。しかしながら、抗-CD28抗体単独ではいずれの分裂促進も誘導しなかった。

QL9-L<sup>d</sup>複合体は高親和性をもって2C-T-細胞受容体によって認識される。低い親和性をもってこの受容体によって認識される他のペプチドおよびL<sup>d</sup>の複合体は2C+T-細胞を活性化させることができた；これらはペプチドp2CaおよびSL9を含んだ（図21）。しかしながら、培養の第2日に添加したIL-2がこれらのペプチドを用いる分裂促進を観察するのに必要であった。LCMVペプチド（2C-T-細胞受容体によって認識されない対照ペプチド）は活性化を誘導しなかったので、活性化はペプチド特異的であった。ウェル（96プレートウェル）当たり700と少ないT-細胞で開始して、分裂促進は測定可能であり、これは該方法がペプチド特異的に非常に少数のT-細胞を活性化したことを示す。

2C+T-細胞をC57BL/6マウスからの全CD28<sup>+</sup>細胞と1/99の比率で混合し、ペプチドQL9の存在下で、細胞を固定化L<sup>d</sup>および抗-CD28抗体と共に培養した。IL-2は培養の第2日に添加し、引き続いて1日置きに添加した。集団の形成、徐々にウェルで拡大した拡大細胞の存在によって示されるごとき、細胞の活性化および増殖が認められた。培養の第12日に、細胞を収穫し、抗クロノタイプ抗体で染色し、フローサイトフルオロメトリーによって分析することによって、2C-T-細胞受容体を発現する細胞のパーセントを評価した；ペプチドQL9の存在下で最初に培養した細胞の43%が2C+であり（図22）、他方、ペプチドp2Caでの刺激の後に細胞の49%が2Cを発現し（図23）、ペプチドSL9での刺激の後に22%が発現した（図24）。これは、培養12日後における特異的T-細胞のかかなりの富化（43倍、49倍および22倍）を示す。富化はSL9（2C-T-細胞受容体とで低親和性複合体を形成するペプチド）でも観察された。かくして、この方法はT-細胞の異種混合物から抗原特異的T-細胞の小亜集団を活性化し、富化させることができる。

QL9ペプチドの存在下でL<sup>d</sup>および抗-CD28抗体を用いて活性した2C+T-細胞を5日間培養し、次いで、それらの細胞傷害性能力を評価した。図25に示す結果は、固定化活性化分子が細胞を誘導してエフェクター細胞傷害性T-細胞に分化させたことを示す。溶解はQL9ペプチドの存在下で観察されたが、対照ペプチド（LCMV）の存在下では観察されなかったので、特異的であった。かくして、休止T-細胞は固定化分子によって活性化されて、標的を特異的に殺すことができる細胞傷害性T-細胞に分化した。

理解されるごとき、固定化精製MHCクラスIおよび助力分子を用いて、ナイーブ休止T-細胞を特異的に活性化して、細胞傷害性T-細胞とすることができる。MHCクラスIおよび助力分子は活性化に十分であり；抗原-提示細胞起源のさらなるシグナルは必要な

10

20

30

40

50

い。細胞培養プレートのごとき基材上に固定化されたMHCクラスIおよび助力分子は、T細胞活性化のための適当なツールを提供する。かかる被覆基材によっていくつかの利点が提供される。それらは調製したり操作するのが容易であり、それらはよく制御された量の分子で被覆することができ、再現可能な活性化条件を保証する。

### 実施例13

#### ヒト細胞傷害性T細胞の活性化

ヘパリン(10  $\mu$ /ml)中に収集したヒト血液(450ml)のユニットを、Scripps Clinic, La Jolla, CAのGeneral Clinical Research Center (GCRC)を介して入手した。製造業者の仕様に従い、血液をまず50cc円錐遠心管内のFicoll-Hypaque密度勾配中で加工した、一旦バッフィコートが得られたならば、試料を緩衝液1(Ca<sup>++</sup>またはMG<sup>++</sup>を含まないD-PBS)、次いで、緩衝液2(4%胎児ウシ血清(FCS)を含むPRMI)および緩衝液3中の最終洗液(D-PBS+1%ヒト血清アルブミン(HSA、25% BumbleBaxter-Hyland)および0.2%クエン酸ナトリウム(w/v))中で洗浄した。

全末梢血液単核細胞(PBMC)調製物を洗浄した細胞からカウントした。次いで、この調製物をMaxSep<sup>TM</sup>単離手法(Baxter)を介して採取し、ここに、CD8<sup>+</sup>細胞は陰性選択によって選択した。除去するための標的化細胞に対するmAbのカクテル(CD19-PharMingen, CD4-Ortho-mune, CD15-PharMingen, CD56-PharMingen, CD14-PR1)を2  $\mu$ g/ml細胞にて調製した。合計PBMC細胞カウントを緩衝液3中で $20 \times 10^6$ /mlまで希釈し、抗体を添加した。

混合物(ほぼ40ml)を4℃にて回転振盪機で回転させ(4rpm)、合計30分間、チューブが試料を上下にして混合するようにした。感作相の後、細胞を緩衝液3で洗浄し、ヒツジ抗マウスIgG(SAM)で被覆した磁性Dynalビーズ(Dynabeads M450 #110.02)と共に同緩衝液に再懸濁した。ビーズのストックは通常 $4 \times 10^8$ ビーズ/mlであった。最終ビーズ：標的細胞比率は10：1である。

使用するビーズの最終容量を測定するために、以下の式に従った：

(感作合計細胞)  $\times$  (標的細胞の集団の%) = 合計理論標的細胞数

合計理論標的細胞数  $\times 10$  = 所要合計ビーズ

所要合計ビーズ/ストックのビーズ濃度 = 所要ビーズの容量

最終感作細胞：ビーズ混合物の容量はほぼ50mlであった。混合物を150mlのFenwal Transfer Pack(#4R2001)に入れ、ニードルで空気を加え、前記と同様の条件下で混合物を回転させた(30分間、4℃、4rpm、上下に攪拌)。インキュベーション時間の最後に、製造業者の仕様に従い、標的細胞をMaxSep<sup>TM</sup>分離デバイスで取り出した。分離した細胞をバッグから移し、カウントして回収を測定した。FACS分析を行って、試料の純度を測定した。

トランスフェクトされ、ヒトHLA A2.1、B7.1および/またはLFA-3を発現することが示されているDrosophila(ハエ)抗原提示細胞で、得られた分離されたヒトCD8<sup>+</sup>細胞を刺激した。ハエ細胞を、10%FCS血清を含むSchneiderの培地中、 $10^6$ /mlに希釈した。翌日、CuSO<sub>4</sub>を培養細胞に添加し、これを27℃で24時間インキュベートし、収穫した。収穫した細胞を洗浄し、100  $\mu$ g/mlの最終ペプチド濃度にて昆虫Xpress培地中に懸濁し、27℃で3時間インキュベートした。

使用したペプチドはHIV-RT(ILKEPVHGV)(配列番号48)、チロシナーゼ(Tyrosinase)(YMNGTMSQV)(配列番号49)、およびインフルエンザ・マトリックス(Influenza matrix)(GILGFVFTL)(配列番号50)であった。

対照ペプチドは肝炎ウイルスのコアに由来し、配列FLPSDFFP SV(配列番号51)を有していた。

10

20

30

40

50

ハエ抗原－提示細胞を1：10（APC：CD8<sup>+</sup>T－細胞）の比率でCD8<sup>+</sup>細胞に添加した。37℃にて、細胞を平坦底ウェル（48ウェル）中、4日間インキュベートした。第5日、IL-2（10μ/ml）およびIL-7（10μ/ml）（Genzyme）を培地の交換と共に添加した。第11日に、CTLアッセイを行った。

クロム放出アッセイにおいて、JY（HLA2.1、B7を発現するEBV－形質転換ヒトB細胞系）を標的細胞として使用した。Visserieu, M. J. W. ら, J. Immunol. 154: 3991-3998 (1995)。アッセイの24時間前に、JY細胞を3×10<sup>5</sup>細胞/mlにて、10% FCSを含むRPMI中に接種した。JY細胞をカウントし、RPMI洗浄溶液（RPMI中4% Rehaudin FCS、1% HEPES、0.025% ゲンタマイシン）中で1回洗浄して、試料当たり5×10<sup>6</sup>細胞を得た。細胞ペレットを100μlの<sup>51</sup>クロムストック（0.1mCi, NEN）中に温和に再懸濁し、37℃の水浴に1時間入れ、15分毎に攪拌した。標識されたJY溶液を、10mlのRPMI洗液中、各1400rpmにて6分間4回洗浄した。細胞をRPMI/10% Hyclone 中、1×10<sup>5</sup>細胞/mlに調整した。標的細胞標識化の効率は、標準的なガンマカウンター技術によって確認する。

標識細胞のペプチド負荷については、2mlの標識JY細胞（2×10<sup>6</sup>細胞）を室温にて10μg/mlのペプチドと共に30分間インキュベートした。ペプチドストック溶液（1mg/ml）を-70℃で保存した。96ウェル丸底プレート中、100μlのエフェクター細胞および100μlのペプチド負荷標的細胞を84：1、17：1および3.4：1（エフェクター：標的）の比率で合わせた。自然放出および<sup>51</sup>Crの最大放出を測定するための対照を二連で含ませた。試料を37℃で6時間インキュベートした。

10% FCSと共にRPMI中の10<sup>7</sup>/mlの濃度のK562細胞を20：1の比率（未標識K562：標識JY）で添加した。この赤白血病細胞系を用いて、クロム放出アッセイにおいて、NKバックグラウンド細胞溶解を低下させた。プレートを1000rpmで5分間遠心し、各試料からの100μlの上清を96チューブの収集チューブに移した。細胞溶解の分析は、標準的なガンマカウンティング技術（Gamma cell 1000, Nordion）によって決定する。

インフルエンザマトリックスペプチド（配列番号50）を負荷した抗原－提示細胞でヒトCD8<sup>+</sup>T－細胞を活性化することによって生成したCTL活性を図26に示す。インフルエンザウイルスへの先の暴露は、このCTL活性が二次的応答であることを示す。データ点は三連培養からの値の平均である。A2.1、B7.1およびICAM-1を発現する抗原－提示細胞は、A2.1およびB7.1を発現する抗原－提示細胞またはA2.1、B7.1およびLFA-3を発現する抗原－提示細胞よりもより効果的であった。

HIV-RTペプチド（配列番号48）を負荷した抗原－提示細胞でヒトCD8<sup>+</sup>T－細胞を活性化する結果を図27に示す。この患者の血液のスクリーニングはHIVへの先行暴露を示さなかったため、これらの結果はCTL活性は一次応答に基づくものであったことを示す。この場合、A2.1、B7.1およびICAM-1を発現する抗原－提示細胞のみが、対照レベルよりも有意に大きいCTL活性を生じた。

図28は、チロシナーゼペプチド（配列番号49）を負荷した抗原－提示細胞によって活性化されたヒトCD8<sup>+</sup>T－細胞のCTL活性を示す。チロシナーゼはメラノーマ腫瘍細胞で過剰発現される通常に生じる酵素である。再度、すべての3種の分子、ICAM-1ならびにA2.1およびB7.1を発現する抗原－提示細胞が、特にテストした低いエフェクター：標的比率において最も効果的であった。

これらの結果は、抗原提示系が、腫瘍細胞で過剰発現される内因性蛋白質に由来するペプチドに対して向けられたヒトCD8<sup>+</sup>T－細胞において効果的なCTL活性を生じることができることを示す。また、これは、B7およびICAMを共に用いるCD8<sup>+</sup>T－細胞のこのイン・ビトロ刺激が、さもなければ自己として認識されるペプチドに対してさえ細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T－細胞を生じさせることを示す。これは、かかる「自己」ペプチドを用いて細胞傷害性T－細胞を生じさせることができないという現在の知識とは対照的である。この方法は、腫瘍に対してCD8<sup>+</sup>T－細胞を活性化させるのに使用できる可能な腫瘍特

10

20

30

40

50

異的抗原の数を大いに増やす。

前記したのは本発明を説明する意図のもので、限定的なものではない。本発明の精神および範囲を逸脱することなく、多数の変形および修飾を行うことができる。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

10

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC 23

配列番号：2

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

20

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG 23

配列番号：3

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

30

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC 23

配列番号：4

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

40

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC 23

配列番号：5

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

50

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC 23

配列番号：6

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

10

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG 23

配列番号：7

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

20

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC 23

配列番号：8

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

30

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA 23

配列番号：9

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

40

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGGC GCCCGAAGC CTC 23

配列番号：10

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

50

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG 23

配列番号：11

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロギー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

10

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC 23

配列番号：12

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロギー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

20

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG 23

配列番号：13

配列の長さ：427

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロギー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

30

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

AATTCGTTGC AGGACAGGAT GTGGTGCCCG ATGTGACTAG CTCTTTGCTG CAGGCCGTCC  
60

TATCCTCTGG TTCCGATAAG AGACCCAGAA CTCGGGCCCC CCACCGCCCA CCGCCACCCC  
120

CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG  
180

TTTTGCATCC CATACAAGTC CCCAAAGTGG AGAACC GAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC  
240

40

AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTCGAAT TTGGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT  
300

GAATCGAAG AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA  
360

TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGATCAT CTCAGTGCAA  
420

CTAAGG  
427

配列番号：14

50

配列の長さ：740

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

ATTGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AAACCTTCCA TGAAAAATAT  
60

GGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA  
120

TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTCCGC CAATCAGTCG  
180

TAAACAGAA GTCGTGGAAA GCGGATAGAA AGAATGTTTG ATTTGACGGG CAAGCATGTC  
240

TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTTCT CATGACCAAG  
300

AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GGTTCCTGTC CAGATCGAAC TCAAACTAG  
360

TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTCATGTTA GTTTCGCGCT  
420

GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTCAGTTTG GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT  
480

TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATCAAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTTT  
540

TTTTAATGAT AAGCATTGTC TCGTTTATAC TTTTATATT TCGATATTAA ACCACCTATG  
600

AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG  
660

GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT  
720

TACTCTCTCT ACTCTAGAGT  
740

配列番号：15

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC

CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC

60

配列番号：16

配列の長さ：36

配列の型：核酸

10

20

30

40

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGATCCGGAT GGTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC

36

配列番号：17

配列の長さ：19

配列の型：核酸

10

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GGAGCCGTGA CTGACTGAG

19

配列番号：18

配列の長さ：24

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCCTCGGCAC TGACTGACTC CTAG

24

配列番号：19

配列の長さ：38

配列の型：核酸

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GATCCTTATT AGATCTCACC ATCACCATCA CCATTGAG

38

配列番号：20

配列の長さ：38

配列の型：核酸

40

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA(genomic)

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

TGACTCAAT GGTGATGGTG ATGGTGAGAT CTAATAAG

38

配列番号：21

配列の長さ：3875

配列の型：核酸

50

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| TTGCAGGACA GGATGTGGTG CCCGATGTGA CTAGCTCTTT GCTGCAGGCC GTCCTATCCT  | 60  |
| CTGSTTCCEA TAAGAGACCC AGAACTCCGG CCCCCACCG CCCACCGCCA CCCCCATACA   | 120 |
| TATGTGGTAC GCAAGTAAGA GTCCCTGCGC ATGCCCCATG TSCCCACCA AGAGCTTTGC   | 180 |
| ATCCCAATACA AGTCCCCAAA GTGGAGAACC GAACCAATTC TTCGCGGGCA GAACAAAAGC | 240 |
| TTCTGCACAC GTCTCCACTC GAATTTGGAG CCGGCCGGCG TGTGCAAAG AGGTGAATCG   | 300 |
| AACGAAAGAC CCGTGTGTAA AGCCGCGTTT CCAAATGTA TAAAACCGAG AGCATCTGGC   | 360 |
| CAATGTGCAT CAGTTGTGGT CAGCAGCAA ATCAAGTGAA TCATCTCAGT GCAACTAAAG   | 420 |
| GGGAATTCTGA GCTCGGTACC CGGGGATCCT TATTAGATCT CACCATCACC ATCACCATTG | 480 |
| AGTCGACCTG CAGGCATGCA AGCTATTCTGA TGCACACTCA CATTCTTCTC CTAATACGAT | 540 |
| AATAAACTT TCCATGAAAA ATATGGAATA ATATATGAAA ATTGAGAAAT CCAAAAACT    | 600 |
| GATAAACGCT CTACTTAATT AAAATAGATA AATGGGAGCG GCAGGAATGG CGGAGCATGG  | 660 |
| CCAAGTTCTT CCGCCAATCA GTCGTAAAC AGAAGTCGTG GAAAGCGGAT AGAAGGAATG   | 720 |
| TTTGATTTGA CGGGCAAGCA TGTCTGCTAT GTGGCGGATT GCGGAGGAAT TGCCTGGAG   | 780 |
| ACCAGCAAGG TTCTCATGAC CAAGAATATA GCGGTGAGTG AGCGGGAAGC TCGGTTTCTG  | 840 |
| TCCAGATCGA ACTCAAACT AGTCCAGCCA GTCCCTGTCT AACTAATTA AGTCAATGAG    | 900 |

10

20

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TTTTTCATGT TAGTTTCGCG CTGAGCAACA ATTAAGTTTA TGTTTCAGTT CGGCTTAGAT  | 960  |
| TTCGCTGAAG GACTTGCCAC TTTCAATCAA TACTTTAGAA CAAATCRAA ACTCATTTCTA  | 1020 |
| ATAGCTTGGT GTTCATCTTT TTTTAAATG ATAAGCATT TGTCTTTAT ACTTTTATA      | 1080 |
| TTTCGATATT AAACCACCTA TGAAGTCCAT TTTAATCGCC AGATAAGCAA TATATTGTGT  | 1140 |
| AAATATTTGT ATTCTTTATC AGGAAATTCA GGGAGACGGG AAGTTACTAT CTACTAAAG   | 1200 |
| CCAAACAATT TCTTACAGTT TTAATCTCTC TACTCTAGAG TAGCTTGGCA CTGGCCCTCG  | 1260 |
| TTTTACACG TCGTGACTGG GAAACCCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC   | 1320 |
| ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC  | 1380 |
| AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GATGGCCGCC TGATGCGGTA TTTCTCCTT ACGCATCTGT   | 1440 |
| GCGGTATTTT ACACCGCATA TGGTGCACTC TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCCGCATAGT  | 1500 |
| TAAGCCAGCC CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC  | 1560 |
| CGGCATCCGC TTACAGACAA GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATCTGT CAGAGGTTTT  | 1620 |
| CACCGTCATC ACCGAAACGC GCGAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCTA TTTTATAGG   | 1680 |
| TTAATGTCAT GATAATAATG GTTCTTAGA CGTCAGGTGG CACTTTTCGG GGAAATGTGC   | 1740 |
| GCGGAACCCC TATTTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAAA TAGTATCCG CTCATGAGAC    | 1800 |
| AATAACCCCTG ATAAATGCTT CAATAATCTT GAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT  | 1860 |
| TCCGTGTGCG CCTTATCCC TTTTTCGCG CATTTTGCCT TCCTGTTTTT GCTCACCAG     | 1920 |
| AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTACATCG   | 1980 |
| AACCTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTT AGAGTTTTTCG CCCCAGAGAA CGTTTTCCAA | 2040 |
| TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTATT GACGCCGGGC  | 2100 |
| AAGAGCAACT CGGTCGCCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTGGGTTGAG TACTCACCAG  | 2160 |
| TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT GCTGCCATAA  | 2220 |
| CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC  | 2280 |
| TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAACCTG CCTTGATCGT TGGGAACCCG  | 2340 |
| AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGTA GCAATGGCAA  | 2400 |
| CAACGTTGCG CAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA   | 2460 |
| TAGACTGGAT GGAGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACTTCT GCGCTCGGCC CTTCGGGCTG  | 2520 |
| GCTGGTTTTAT TGCTGATAAA TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG | 2580 |
| CACTGGGGCC AGATGGTAAG CCTTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG  | 2640 |
| CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAGCATT  | 2700 |

10

20

30

40

GGTAAGTGC AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTTT 2760  
 AATTTAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAA ATCCCTTAAC 2820  
 GTGAGTTTTT GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGAG 2880  
 ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGCAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG 2940  
 TGGTTTGTIT GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTTCG GAAGGTAAGT GGCTTCAGCA 3000  
 GAGCGCAGAT ACCAAATACT GTCCTTCTAG TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA 3060  
 ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAGTG GCTGCTGCCA 3120  
 GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC 3180  
 AGCGGTCGGG CTGACCGGGG GGTTCGTGCA CACAGCCCAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA 3240  
 CCGAACTGAG ATACCTACAG CGTGAGCATT GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA 3300  
 AGGCGGACAG GTATCCGGTA AGCGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCAG AGGGAGCTTC 3360  
 CAGGGGGAAA CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCGGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC 3420  
 GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG 3480  
 CCTTTTTIACG GTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTCTTTCC TCGGTTATCC 3540  
 CCTGATCTCG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGC TCGCCGACGC 3600  
 CGAACCGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA 3660  
 ACCGCCTCTC CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATGCAGC TGGCAGGACA GGTTCCTCGA 3720  
 CTGGAAGCG GGCAGTGAGC CCAACGCAAT TAATGTGAGT TAGCTCACTC ATTAGGCACC 3780  
 CCAGGCTTTA CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 3840  
 ATTTACACAA GGAACAGCT ATGACATGAT TACCG 3875

配列番号：2 2

配列の長さ：7 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

GATCCTTATT AGATCTTACC CATACGACGT CCCAGATTAC GCTCGATCTC ACCATCACCA 60  
 TCACCATTGA G 71

配列番号：2 3

配列の長さ：7 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

TCGACTCAAT GGTGATGGTG ATGGTGAGAT CGAGCGTAAT CTGGGACGTC GTATGGGTAA 60  
 GATCTAATTA G 71

10

20

30

40

50

配列番号：24

配列の長さ：3908

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| TTGCAGGACA GGATGTGGTG CCCGATGTGA CTAGCTCTTT GCTGCAGGCC GTCCTATCCT  | 60  |
| CTGGTTCCGA TAAGAGACCC AGAACTCCGG CCCCCACCG CCCACCGCCA CCCCATACA    | 120 |
| TATGTGGTAC GCAAGTAAGA GTGCCTGCGC ATGCCCCATG TGCCCCACCA AGAGcTTTGC  | 180 |
| ATCCCATACA AGTCCCCAAA GTGGAGAACC GAACCAATTC TTCGCGGGCA GAACAAAAGC  | 240 |
| TTCTGCACAC GTCTCCACTC GAATTTGGAG CCGGCCGGCG TGTGCAAAAG AGGTGAATCG  | 300 |
| AACGAAAGAC CCGTGTGTAA AGCCGCGTTT CCAAAATGTA TAAACCGAG AGCATCTGGC   | 360 |
| CAATGTGCAT CAGTTGTGGT CAGCAGCAA ATCAAGTGAA TCATCTCAGT GCAACTAAAG   | 420 |
| GGGAATTCTGA GCTCGGTACC CGGGGATCCT TATTAGATCT TACCCATACG ACGTCCCAGA | 480 |
| TTACGCTCGA TCTCACCATC ACCATCACCA TTGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTATT  | 540 |

10

20

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| CGATGCACAC TCACATTCTT CTCCTAATAC GATAATAAAA CTTTCCATGA AAAATATGGA  | 600  |
| AAAATATATG AAAATTGAGA AATCCAAAAA ACTGATAAAC GCTCTACTTA ATTAATAATAG | 660  |
| ATAAATGGGA GCGGCAGGAA TGGCGGAGCA TGGCCAAGTT CCTCCGCCAA TCAGTCGTAA  | 720  |
| AACAGAAGTC GTGGAAAGCG GATAGAAAGA ATGTTGCGATT TGACGGGCAA GCATGTCTGC | 780  |
| TATGTGGCGG ATTGCGGAGG AATTGCACTG GAGACCAGCA AGGTTCTCAT GACCAAGAAT  | 840  |
| ATAGCGGTGA GTGAGCGGGA AGCTCGGTTT CTGTCCAGAT CGAACTCAAA ACTAGTCCAG  | 900  |
| CCAGTCGCTG TCGAAACTAA TTAAGTAAAT GAGTTTTTCA TGTTAGTTTC GCGCTGAGCA  | 960  |
| ACAATTAAGT TTATGTTTCA GTTCGGCTTA GATTTGCGTG AAGGACTTGC CACTTTCAAT  | 1020 |
| CAATACTTTA GAACAAAATC AAAACTCATT CTAATAGCTT GGTGTTTCATC TTTTTTTTTA | 1080 |
| ATGATAAGCA TTTTGTGCTT TATACTTTTT ATATTTGCGT ATTAAACCAC CTATGAAGTC  | 1140 |
| CATTTTAATC GCCAGATAAG CAATATATTG TGTAAATATT TGTATTCTTT ATCAGGAAAT  | 1200 |
| TCAGGGAGAC GGAAGTTAC TATCTACTAA AAGCCAAACA ATTTCTTACA GTTTTACTCT   | 1260 |
| CTCTACTCTA GAGTAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAACC   | 1320 |
| CTGSCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCGG CACATCCCCC TTTCGCCAGC TGGCGTAATA  | 1380 |
| GCGAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGGC   | 1440 |
| GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATATGGTGCA  | 1500 |
| CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA GCGCCGACAC CCGCCAACAC  | 1560 |
| CCGCTGACGC GCCCTGACGG GCTTGTCTGC TCCCGGCATC CGCTTACAGA CAAGCTGTGA  | 1620 |
| CCGTCTCCGG GAGCTGCATG TGTGAGAGGT TTTCAACGTC ATCACCAGAA CGCGCGAGAC  | 1680 |
| GAAAGGGCCT CGTGATACGC CTATTTTTAT AGGTTAATGT CATGATAATA ATGGTTTCTT  | 1740 |
| AGACGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCAGCGAAC CCTATTTTGT TTATTTTTCT  | 1800 |
| AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT  | 1860 |
| ATTCAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCTTTTTTTG  | 1920 |
| CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG  | 1980 |
| AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC  | 2040 |
| TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT  | 2100 |
| GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT  | 2160 |
| ATTCTCAGAA TGACTTGTTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA  | 2220 |
| TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT  | 2280 |
| TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG  | 2340 |
| ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACC  | 2400 |
| AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAACTA TTAAGTGCGG   | 2460 |

10

20

30

40

AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG 2520  
 CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG 2580  
 CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC 2640  
 GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA 2700  
 TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT 2760  
 ATATACTTTA GATTGATTTA AAATTCATT TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC 2820  
 TTTTGTATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG 2880  
 ACCCCGTAGA AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT 2940  
 GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGCTACCAG CCGTGGTTTG TTGCGCGAT CAAGAGCTAC 3000  
 CAACTCTTTT TCCGAAGSTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC 3060  
 TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT AGCACC GGCT ACATACCTCG 3120  
 CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT 3180  
 TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTTCGT 3240  
 GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC 3300  
 ATTGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA 3360  
 GGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCCCTGG TATCTTTATA 3420  
 GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCCTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG 3480  
 GGCGGAGCCT ATGGA AAAAC GCCAGCAACG CGGCCTTTTT ACGGTCCTGG CCTTTTGCTG 3540  
 GCCTTTTGCT CACATGTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC 3600  
 GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACCG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT 3660  
 GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT 3720  
 TCATTAATGC AGCTGGCACG ACAGGTTTCC CGACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC 3780  
 AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC 3840  
 TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACAT 3900  
 GATTACCG 3908

配列番号：25

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

GATCCTTATT AGATCTCACC ATCACCATCA CCATTGTTGA G

61

配列番号：26

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

10

20

30

40

50

41

TGCCCAAGTT CCTCCGCCAA TCAGTCGTAA AACAGAAGTC GTGGAAAGCG GATAGAAAGA 720

20

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ATGTTTCGATT TGACGGGCAA GCATGTCTGC TATGTGGCGG ATTGCGGAGG AATTGCACTG | 780  |
| GAGACCAGCA AGGTTCTCAT GACCAAGAAT ATAGCGGTGA GTGAGCGGGA AGCTCGGTTT  | 840  |
| CTGTCCAGAT CGAACTCAA ACTAGTCCAG CCAGTCGCTG TCGAAACTAA TTAAGTCAAT   | 900  |
| GAGTTTTTCA TGTAGTTTC GCGCTGAGCA ACAATTAAGT TTATGTTTCA GTTCGGCTTA   | 960  |
| GATTTTCGCTG AAGGACTTGC CACTTTCAAT CAATACTTTA GAACAAAATC AAAACTCATT | 1020 |
| CTAATAGCTT GGTGTTTCATC TTTTTTTTTA ATGATAAGCA TTTTGTCGTT TATACTTTTT | 1080 |
| ATATTTTCGAT ATTAAACCAC CTATGAAGTC CATTTTAATC GCCAGATAAG CAATATATTG | 1140 |
| TGTAATATT TGTATTCTTT ATCAGGAAAT TCAGGGAGAC GSGAAGTTAC TATCTACTAA   | 1200 |
| AAGCCAAACA ATTTCTTACA GTTTTACTCT CTCTACTCTA GAGTAGCTTG GCACTGGCCG  | 1260 |
| TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG  | 1320 |
| CACATCCCCC TTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC  | 1380 |
| AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GCGGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC  | 1440 |
| TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATATGGTGCA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT  | 1500 |
| AGTTAAGCCA GCCCCGACAC CCGCCAACAC CCGCTGACGC GCCCTGACGG GCTTGTCTGC  | 1560 |
| TCCCGGCATC CGCTTACAGA CAAGCTGTGA CCGTCTCCGG GAGCTGCATG TGTCAGAGGT  | 1620 |
| TTTCACCGTC ATCACCGAAA CGCGCGAGAC GAAAGGGCCT CGTGATACGC CTATTTTTAT  | 1680 |
| AGGTTAATGT CATGATAATA ATGGTTTCTT AGACCTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAATG   | 1740 |
| TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA  | 1800 |
| GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC   | 1860 |
| ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC  | 1920 |
| CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGACGA GTGGGTTACA   | 1980 |
| TCGAACGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT   | 2040 |
| CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG  | 2100 |
| GGCAAGAGCA ACTCGGTGCG CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGTT GAGTACTCAC   | 2160 |
| CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA  | 2220 |
| TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAAT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG   | 2280 |
| AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC  | 2340 |
| CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG  | 2400 |
| CAACAACGTT GCGCAACTA TTAACGCGG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT    | 2460 |
| TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG  | 2520 |
| CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG  | 2580 |
| CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACAG ACGGGGAGTC   | 2640 |
| AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC  | 2700 |

10

20

30

40

ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACCTTCATT 2760  
 TTAAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT 2820  
 AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA AAAGATCAAA GGATCTTCTT 2880  
 GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGCTACCAG 2940  
 CCGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA 3000  
 GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA 3060  
 AGAACTCTGT AGCACC GCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG 3120  
 CCACTGCGCA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG 3180  
 CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTTCT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT 3240  
 ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC ATTGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA 3300  
 GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC 3360  
 TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCTGTCTGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG 3420  
 AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GCGCGAGCCT ATGGAAAAAC GCCAGCAACG 3480  
 CGGCCTTTTT ACGGTCCTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTCTT TCCTGCGTTA 3540  
 TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC 3600  
 AGCCGAACCG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG 3660  
 CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCAGC ACAGGTTTCC 3720  
 CGACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC 3780  
 ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGCG TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA 3840  
 ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACAT GATTACCG 3878

配列番号：28

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

GATCCTTATT AGATCTGCTT GCGCCATCC TCAATTGGG GGTGAG 47

配列番号：29

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

TCGACTCAAC CCCCAATTG AGGATGGCGC CAGCAGATC TAATAAG 47

配列番号：30

配列の長さ：3883

配列の型：核酸

10

20

30

40

50

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| TTGCAGGACA GGATGTGGTG CCCGATGTGA CTAGCTCTTT GCTGCAGGCC GTCCTATCCT | 60  |
| TGGTTCCGAT AAGAGACCCA GAACTCCGGC CCCCCACCGC CCACCGCCAC CCCCATACAT | 120 |
| ATGTGGTACG CAAGTAAGAG TGCCTGCGCA TGCCCCATGT GCCCCACCAA GAGcTTTGCA | 180 |
| TCCCATACAA GTCCCCAAAG TGGAGAACCG AACCAATTCT TCGCGGGCAG AACAAAGCT  | 240 |
| TCTGCACACG TCTCCACTCG AATTGTGAGC CGGCCGGCGT GTGCAAAAGA GGTGAATCGA | 300 |
| ACGAAGAGAC CGTGTGTAAA GCCGCGTTTC CAAAATGTAT AAAACCGAGA GCATCTGGCC | 360 |
| AATGTGCATC AGTTGTGGTC AGCAGCAAAA TCAAGTGAAT CATCTCAGTG CAACTAAAGG | 420 |
| GGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGATCCTT ATTAGATCTG CTTGGCGCCA TCCTCAATTT | 480 |
| GGGGGTTGAG TCGACCTGCA GGCATGCAAG CTATTCGATG CACACTCACA TTCTTCTCCT | 540 |
| AATACGATAA TAAACTTTTC CATGAAAAAT ATGGAAAAAT ATATGAAAT TGAGAAATCC  | 600 |
| AAAAAACTGA TAAACGCTCT ACTTAATTAA AATAGATAAA TGGGAGCGGC AGGAATGGCG | 660 |
| GAGCATGGCC AAGTTCCTCC GCCAATCAGT CGTAAAACAG AAGTCGTGGA AAGCGGATAG | 720 |

10

20

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| AAAGAATGTT CGATTGACG GGCAAGCATG TCTGCTATGT GCGGATTGC GGAGGAATTG     | 780  |
| CACTGGAGAC CAGCAAGGTT CTCATGACCA AGAATATAGC GGTGAGTGAG CGGGAAGCTC   | 840  |
| GGTTTCTGTC CAGATCGAAC TCAAAACTAG TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG   | 900  |
| TtAATGAGTT TTTTCATGTTA GTTTCGCGCT GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTTCAGTTCG | 960  |
| GCTTAGATTT CGGTGAAGGA CTTGCCACTT TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATCAAAAC   | 1020 |
| TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTTT TTTTAATGAT AAGCATTITG TCGTTTATAC   | 1080 |
| TTTTTATATT TCGATATTAA ACCACCTATG AAGTtCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA   | 1140 |
| TATTGTGTAA ATATTGTAT TCTTTATCAG GAAATTCAGG GAGACGGGAA GTTACTATCT    | 1200 |
| ACTAAAAGCC AAACAATTC TTACAGTTTT ACTCTCTCTA CTCTAGAGTA GCTTGGCACT    | 1260 |
| GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT   | 1320 |
| TGCAGCACAT CCCCCITTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC   | 1380 |
| TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC   | 1440 |
| GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC   | 1500 |
| CGCATAGTTA AGCCAGCCCC GACACCCGCC ABCACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG   | 1560 |
| TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA   | 1620 |
| GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGACGAAAG GGCCTCGTGA TACGCCTATT   | 1680 |
| TTTATAGGTT AATGTCATGA TAATAATGGT TTCTTAGACG TCAGGTGGCA CTTTTCGGGG   | 1740 |
| AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATF TTTCTAAATA CATTCAAATA TGTATCCGCT   | 1800 |
| CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTATGAGTAT   | 1860 |
| TCAACATTTT CGTGTCGCCC TTATTCCCTT TTTTGCGGCA TTTTGCCCTTC CTGTTTTTGC  | 1920 |
| TCACCCAGAA ACGCTGGTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT CAGTTGGGTG CACGAGTGGG   | 1980 |
| TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTAA GATCCTTGAG AGTTTTCGCC CCGAAGAACG   | 2040 |
| TTTTCCAATG ATGAGCACTT TTAAAGTTCT GCTATGTGGC GCGGTATTAT CCCGTATTGA   | 2100 |
| CGCCGGGCAA GAGCAACTCG GTCGCCGCAT ACACTATTCT CAGAATGACT TGGTTGAGTA   | 2160 |
| CTCACCAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA GTAAGAGAAT TATGCAGTGC   | 2220 |
| TGCCATAACC ATGAGTGATA ACACTGCGGC CAACTTACTT CTGACAACGA TCGGAGGACC   | 2280 |
| GAAGGAGCTA ACCGCTTTTT TGCACAACAT GGGGGATCAT GTAACTCGCC TTGATCGTTG   | 2340 |
| GGAACCGGAG CTGAATGAAG CCATACCAAA CGACGAGCGT GACACCACGA TGCCTGTAGC   | 2400 |
| AATGGCAACA ACGTTGCGCA AACTATTAAC TGGCGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCGGCA   | 2460 |
| ACAATTAATA GACTGGATGG AGGCGGATAA AGTTGCAGGA CCACTTCTGC GCTCGGCCCT   | 2520 |
| TCCGGCTGGC TGGTTTATTG CTGATAAATC TGGAGCCGGT GAGCGTGGGT CTCGCGTAT    | 2580 |
| CATTGCAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC CTCCCGTATC GTAGTTATCT ACACGACGGG   | 2640 |

10

20

30

40

|                                                                    |      |    |
|--------------------------------------------------------------------|------|----|
| GAGTCAGGCA ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT  | 2700 |    |
| TAAGCATTGG TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAACT  | 2760 |    |
| TCATTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT   | 2820 |    |
| CCCTTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC  | 2880 |    |
| TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT  | 2940 |    |
| ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAAC TGG | 3000 |    |
| CCTCAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA  | 3060 |    |
| CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC  | 3120 | 10 |
| TGCTGCCAGT GGCATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA   | 3180 |    |
| TAAGGCGCAG CGGTCTGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC  | 3240 |    |
| GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA  | 3300 |    |
| AGGCAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG  | 3360 |    |
| GGAGCTTCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG  | 3420 |    |
| ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG  | 3480 |    |
| CAACGCGGCC TTTTACGGT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTCTTTCTCTG  | 3540 | 20 |
| CGTTATCCCC TGATCTCTGT GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC  | 3600 |    |
| GCCGCAGCCG AACCGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCCA  | 3660 |    |
| ATACGCAAAC CGCCTCTCCC CGCGCGTTGG CCGATTCAAT AATGCAGCTG GCACGACAGG  | 3720 |    |
| TTTCCCGACT GGAAGCGGG CAGTGAGCGC AACGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT   | 3780 |    |
| TAGGCACCCC AGGCTTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTGTGTGG AATTGTGAGC   | 3840 |    |
| GGATAACAAT TTCACACAGG AAACAGCTAT GACATGATTA CCG                    | 3883 |    |

配列番号：31

配列の長さ：879

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

10

20

30

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| GAATTCATGG GCCACACACG GAGGCAGGGA ACATCACCAT CCAAGTGTCC ATACCTCAAT  | 60  |
| TTCTTTTACG TCTTGGTGCT GGCTGGTCTT TCTCACTTCT GTTCAGGTGT TATCCACGTG  | 120 |
| ACCAAGGAAG TGAAAGAAGT GGCAACGCTG TCCTGTGGTC ACAATGTTTC TGTGAAAGAG  | 180 |
| CTGGCACAAA CTCGCATCTA CTGGCAAAAG GAGAAGAAAA TGGTGCTGAC TATGATGTCT  | 240 |
| GGGGACATGA ATATATGGCC CGAGTACAAG AACC GGACCA TCTTTGATAT CACTAATAAC | 300 |
| CTCTCCATTG TGATCCTGGC TCTGCGCCCA TCTGACGAGG GCACATACGA GTGTGTTGTT  | 360 |
| CTGAAGTATG AAAAAGACGC TTTCAAGCGG GAACACCTGG CTGAAGTGAC GTTATCAGTC  | 420 |
| AAAGCTGACT TCCCTACACC TAGTATATCT GACTTTGAAA TTCCAAC TTC TAATATTAGA | 480 |
| AGGATAATTT GCTCAACCTC TGGAGGTTTT CCAGAGCCTC ACCTCTCCTG GTTGGAAAAT  | 540 |
| GGAGAAGAAT TAAATGCCAT CAACACAACA GTTTCCCAAG ATCCTGAAAC TGAGCTCTAT  | 600 |
| GCTGTTAGCA GCAAACTGGA TTTCAATATG ACAACCAACC ACAGCTTCAT GTGTCTCATC  | 660 |
| AAGTATGGAC ATTTAAGAGT GAATCAGACC TTCAACTGGA ATACAACCAA GCAAGAGCAT  | 720 |
| TTTCCTGATA ACCTGCTCCC ATCCTGGGCC ATTACCTTAA TCTCAGTAAA TGGAAATTTTT | 780 |
| GTGATATGCT GCCTGACCTA CTGCTTTGCC CCAAGATGCA GAGAGAGAAG GAGGAATGAG  | 840 |
| AGATTGAGAA GGGAAAGTGT ACGCCCTGTA TAAGGATTC                         | 879 |

10

20

配列番号：3 2

配列の長さ：7 3 8

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

ハイボセティカル：N O

アンチセンス：N O

配列

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| GAATTCATGG GCCACACACG GAGGCAGGGA ACATCACCAT CCAAGTGTCC ATACCTCAAT  | 60  |
| TTCTTTTACG TCTTGGTGCT GGCTGGTCTT TCTCACTTCT GTTCAGGTGT TATCCACGTG  | 120 |
| ACCAAGGAAG TGAAAGAAGT GGCAACGCTG TCCTGTGGTC ACAATGTTTC TGTGAAAGAG  | 180 |
| CTGGCACAAA CTCGCATCTA CTGGCAAAAG GAGAAGAAAA TGGTGCTGAC TATGATGTCT  | 240 |
| GGGGACATGA ATATATGGCC CGAGTACAAG AACC GGACCA TCTTTGATAT CACTAATAAC | 300 |
| CTCTCCATTG TGATCCTGGC TCTGCGCCCA TCTGACGAGG GCACATACGA GTGTGTTGTT  | 360 |
| CTGAAGTATG AAAAAGACGC TTTCAAGCGG GAACACCTGG CTGAAGTGAC GTTATCAGTC  | 420 |
| AAAGCTGACT TCCCTACACC TAGTATATCT GACTTTGAAA TTCCAAC TTC TAATATTAGA | 480 |
| AGGATAATTT GCTCAACCTC TGGAGGTTTT CCAGAGCCTC ACCTCTCCTG GTTGGAAAAT  | 540 |
| GGAGAAGAAT TAAATGCCAT CAACACAACA GTTTCCCAAG ATCCTGAAAC TGAGCTCTAT  | 600 |
| GCTGTTAGCA GCAAACTGGA TTTCAATATG ACAACCAACC ACAGCTTCAT GTGTCTCATC  | 660 |
| AAGTATGGAC ATTTAAGAGT GAATCAGACC TTCAACTGGA ATACAACCAA GCAAGAGCAT  | 720 |
| TTTCCTGATA ACGGATTC                                                | 738 |

30

40

配列番号：3 3

配列の長さ：1 0 0 2

配列の型：核酸

50

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

|                                                                    |      |    |
|--------------------------------------------------------------------|------|----|
| GAGCTCATGG ATCCCCAGTG CACTATGGGA CTGAGTAACA TTCTCTTTGT GATGECCTTC  | 60   |    |
| CTGCTCTCTG GTGCTGCTCC TCTGAAGATT CAAGCTTATT TCAATGAGAC TGCAGACCTG  | 120  |    |
| CCATGCCAAT TTGCAAACCTC TCAAAACCAA AGCCTGAGTG AGCTAGTAGT ATTTTGGCAG | 180  | 10 |
| GACCAGGAAA ACTTGGTTCT GAATGAGGTA TACTTAGGCA AAGAGAAATT TGACAGTGTT  | 240  |    |
| CATTCCAAGT ATATGGGCGG CACAAGTTTT GATTCCGACA GTTGGACCCT GAGACTTCAC  | 300  |    |
| AATCTTCAGA TCAAGGACAA GGGCTTGTAT CAATGTATCA TCCATCACAA AAAGCCCACA  | 360  |    |
| GGAATGATTC GCATCCACCA GATGAATTCT GAAGTGTGAG TGCTTGCTAA CTTCAGTCAA  | 420  |    |
| CCTGAAATAG TACCAATTTT TAATATAACA GAAATGTGT ACAIAAATTT GACCTGCTCA   | 480  |    |
| TCTATACACG GTTACCCAGA ACCTAAGAAG ATGAGTGTGT TGCTAAGAAC CAAGAATTCA  | 540  |    |
| ACTATCGAGT ATGATGGTAT TATGCAGAAA TCTCAAGATA ATGTCACAGA ACTGTACGAC  | 600  |    |
| GTTTCCATCA GCTTGTCTGT TTCATTCCCT GATGTTACGA GCAATATGAC CATCTTCTGT  | 660  | 20 |
| ATTCTGGAAA CTGACAAGAC GCGGCTTTTA TCTTCACCTT TCTCTATAGA GCTTGAGGAC  | 720  |    |
| CCTCAGCCTC CCCCAGACCA CATTCCCTGG ATTACAGCTG TACTTCCAAC AGTTATTATA  | 780  |    |
| TGTGTGATGG TTTTCTGTCT AATTCTATGG AATGGAAGA AGAAGAAGCG GCCTCGCAAC   | 840  |    |
| TCTTATAAAT GTGGAACCAA CACAATGGAG AGGGAAGAGA GTGAACAGAC CAAGAAAAGA  | 900  |    |
| GAAAAATCC ATATACCTGA AAGATCTGAT GAAGCCCAGC GTGTTTTTAA AAGTTCGAAG   | 960  |    |
| ACATCTTCAT GCGACAAAG TGATACATGT TTTTAAGGGC CC                      | 1002 |    |

配列番号：34

配列の長さ：751

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

10

20

30

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| GAGCTCATGG ATCCCCAGTG CACTATGGGA CTGAGTAACA TTCTCTTTGT GATGGCCTTC  | 60  |
| CTGCTCTCTG GTGCTGCTCC TCTGAAGATT CAAGCTTATT TCAATGAGAC TGCAGACCTG  | 120 |
| CCATGCCAAT TTGCAAACTC TCAAAACCAA AGCCTGAGTG AGCTAGTAGT ATTTTGGCAG  | 180 |
| GACCAGGAAA ACTTG GTTCT GAATGAGGTA TACTTAGGCA AAGAGAAATT TGACAGTGTT | 240 |
| CATTCCAAGT ATATGGGCCG CACAAGTTTT GATTCTGGACA GTTGGACCCT GAGACTTCAC | 300 |
| AATCTTCAGA TCAAGGACAA GGGCTTGTAT CAATGTATCA TCCATCACAA AAAGCCCACA  | 360 |
| GGAATGATTC GCATCCACCA GATGAATTCT GAACTGTCAG TGCTTGCTAA CTTCAGTCAA  | 420 |
| CCTGAAATAG TACCAATTTC TAATATAACA GAAATGTGT ACATAAATTT GACCTGCTCA   | 480 |
| TCTATACACG GTTACCCAGA ACCTAAGAAG ATGAGTGTTT TGCTAAGAAC CAAGAATTCA  | 540 |
| ACTATCGAGT ATGATGGTAT TATGCAGAAA TCTCAAGATA ATGTCACAGA ACTGTACGAC  | 600 |
| GTTTCCATCA GCTTGTCTGT TTCATTCCCT GATGTTACGA GCAATATGAC CATCTTCTGT  | 660 |
| ATTCTGGAAA CTGACAAGAC GCGGCTTTTA TCTTCACCTT TCTCTATAGA GCTTGAGGAC  | 720 |
| CCTCAGCCTC CCCCAGACCA CATTGGGGCC C                                 | 751 |

配列番号：35

配列の長さ：1611

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

10

20

|                                                                    |      |    |
|--------------------------------------------------------------------|------|----|
| GAATTCATGG CTCCAGCAG CCCCCGGCCC GCGCTGCCCC CACTCCTGGT CCTGCTCGGG   | 60   |    |
| GCTCTGTTCC CAGGACCTGG CAATGCCCAG ACATCTGTGT CCCCCTCAAA AGTCATCCTG  | 120  |    |
| CCCCGGGGAG GCTCCGTGCT GGTGACATGC AGCACCTCCT GTGACCAGCC CAAGTTGTTG  | 180  |    |
| GGCATAGAGA CCCCCTTGCC TAAAAAGGAG TTGCTCCTGC CTGGGAACAA CCGGAAGGTG  | 240  |    |
| TATGAACTGA GCAATGTGCA AGAAGATAGC CAACCAATGT GCTATTCAAA CTGCCCTGAT  | 300  |    |
| GGGCAGTCAA CAGCTAAAC CTTCTCACC GTGTACTGGA CTCCAGAACG GGTGGAAGTG    | 360  |    |
| GCACCCCTCC CCTCTTGGA GCCAGTGGGC AAGAACCCTTA CCCTACGCTG CCAGGTGGAG  | 420  |    |
| GGTGGGGCAC CCGGGGCCAA CCTCACCGTG GTGCTGCTCC GTGGGGAGAA GGAGCTGAAA  | 480  | 10 |
| CGGGAGCCAG CTGTGGGGGA GCCCGCTGAG GTCACGACCA CGGTGCTGGT GAGGAGAGAT  | 540  |    |
| CACCATGGAG CCAATTTCTC GTGCCGCACT GAACTGGACC TGCGGGCCCA AGGGCTGGAG  | 600  |    |
| CTGTTTGAGA ACACCTCGGC CCCCTACCAG CTCCAGACCT TTGTCCTGCC AGCGACTCCC  | 660  |    |
| CCACAATTG TCAGCCCCCG GGTCTAGAG GTGGACACGC AGGGGACCGT GGTCTGTTCC    | 720  |    |
| CTGGACGGGC TGTTCAGT CTCGGAGGCC CAGGTCCACC TGGCACTGGG GGACCAGAGG    | 780  |    |
| TTGAACCCCA CAGTCACCTA TGGCAACGAC TCCTTCTCGG CCAAGGCCTC AGTCAGTGTG  | 840  |    |
| ACCGCAGAGG ACGAGGGCAC CCAGCGGCTG ACGTGTGCAG TAATACTGGG GAACCAGAGC  | 900  | 20 |
| CAGGAGACAC TGCAGACAGT GACCATCTAC AGCTTTCCGG CGCCCAACGT GATTCTGACG  | 960  |    |
| AAGCCAGAGG TCTCAGAAGG GACCGAGGTG ACAGTGAAGT GTGAGGCCCA CCCTAGAGCC  | 1020 |    |
| AAGGTGACGC TGAATGGGGT TCCAGCCCAG CCACTGGGCC CGAGGGCCCA GCTCCTGCTG  | 1080 |    |
| AAGGCCACCC CAGAGGACAA CGGGCGCAGC TTCTCCTGCT CTGCAACCCT GGAGGTGGCC  | 1140 |    |
| GGCCAGCTTA TACACAAGAA CCAGACCCG GAGCTTCGTG TCCTGTATGG CCCCCGACTG   | 1200 |    |
| GACGAGAGGG ATTGTCCGGG AAACTGGACG TGGCCAGAAA ATTCCCAGCA GACTCCAATG  | 1260 |    |
| TGCCAGGCTT GGGGGAACCC ATTGCCCGAG CTCAAGTGTC TAAAGGATGG CACTTTCCCA  | 1320 |    |
| CTGCCCATCG GGGAAATCAGT GACTGTCACT CGAGATCTTG AGGGCACCTA CCTCTGTCGG | 1380 | 30 |
| GCCAGGAGCA CTCAAGGGGA GGTACCCGC GAGGTGACCG TGAATGTGCT CTCCCCCGG    | 1440 |    |
| TATGAGATTG TCATCATCAC TGTGGTAGCA GCCGCAGTCA TAATGGGCAC TGCAGGCCTC  | 1500 |    |
| AGCACGTACC TCTATAACCG CCAGCGGAAG ATCAAGAAAT ACAGACTACA ACAGGCCCAA  | 1560 |    |
| AAAGGGACCC CCATGAAACC GAACACACAA GCCACGCCTC CCTGAGGATC C           | 1611 |    |

配列番号：36

配列の長さ：1452

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

10

20

30

40

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| GAATTCATGG CTCCCAGCAG CCCCCGGCCC GCGCTGCCCC CACTCCTGGT CCTGCTCGGG  | 60   |
| GCTCTGTTCC CAGGACCTGG CAATGCCCAG ACATCTGTGT CCCCCTCAAA AGTCATCCTG  | 120  |
| CCCCGGGGAG GCTCCGTGCT GGTGACATGC AGCACCTCCT GTGACCAGCC CAAGTTGTTG  | 180  |
| GGCATAGAGA CCCCCTTGCC TAAAAAGGAG TTGCTCCTGC CTGGGAACAA CCGGAAGGTG  | 240  |
| TATGAACTGA GCAATGTGCA AGAAGATAGC CAACCAATGT GCTATTCAAA CTGCCCTGAT  | 300  |
| GGGCAGTCAA CAGCTAAAC CTTCTCACC GTGTACTGGA CTCCAGAACG GGTGGAACTG    | 360  |
| GCACCCCTCC CCTCTTGGA GGCAGTGGGC AAGAACCCTA CCCTACGCTG CCAGGTGGAG   | 420  |
| GGTGGGGCAC CCGGGGCCAA CCTCACCCTG GTGCTGCTCC GTGGGGAGAA GGAGCTGAAA  | 480  |
| CGGGAGCCAG CTGTGGGGGA GCCCCTGAG GTCACGACCA CCGTGCTGGT GAGGAGAGAT   | 540  |
| CACCATGGAG CCAATTTCTC GTGCCGCACT GAACTGGACC TGCGGCCCCA AGGGCTGGAG  | 600  |
| CTGTTTGAGA ACACCTCGGC CCCCTACCAG CTCCAGACCT TTGTCCTGCC AGCGACTCCC  | 660  |
| CCACAACCTG TCAGCCCCCG GGTCTTAGAG GTGGACACGC AGGGGACCGT GGTCTGTTCC  | 720  |
| CTGGACGGGC TGTTCCCACT CTCGGAGGCC CAGGTCCACC TGGCACTGGG GGACCAGAGG  | 780  |
| TTGAACCCCA CAGTCACCTA TGGCAACGAC TCCTTCTCGG CCAAGGCCTC AGTCAGTGTG  | 840  |
| ACCGCAGAGG ACGAGGGCAC CCAGCGGCTG ACGTGTGCAG TAATACTGGG GAACCAGAGC  | 900  |
| CAGGAGACAC TGCAGACAGT GACCATCTAC AGCTTTCCGG CGCCCAACGT GATTCTGACG  | 960  |
| AAGCCAGAGG TCTCAGAAGG GACCGAGGTG ACAGTGAAGT GTGAGGCCCA CCCTAGAGCC  | 1020 |
| AAGGTGACGC TGAATGGGGT TCCAGCCCAG CCACTGGGCC CGAGGGCCCA GTCCTGCTG   | 1080 |
| AAGGCCACCC CAGAGGACAA CGGGCGCAGC TTCTCCTGCT CTGCAACCCT GGAGGTGGCC  | 1140 |
| GGCCAGCTTA TACACAAGAA CCAGACCCGG GAGCTTCGTG TCCTGTATGG CCCCCGACTG  | 1200 |
| GACGAGAGGG ATTGTCCGGG AACTTGACG TGGCCAGAAA ATTCCCAGCA GACTCCAAATG  | 1260 |
| TGCCAGGCTT GGGGGAACCC ATTGCCCCGAG CTCAGTGTG TAAAGGATGG CACTTTCCCA  | 1320 |
| CTGCCCATCG GGGAAATCAGT GACTGTCACT CGAGATCTTG AGGGCACCTA CCTCTGTCGG | 1380 |
| GCCAGGAGCA CTCAAGGGGA GGTCACCCGC GAGGTGACCG TGAATGTGCT CTCCCCCGG   | 1440 |
| TATGAGGGAT CC                                                      | 1452 |

配列番号：37

配列の長さ：726

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| GAGCTCATGG TTGCTGGGAG CGACGCGGGG CGGGCCCTGG GGGTCCTCAG CGTGGTCTGC  | 60  |
| CTGCTGCACT GCTTTGGTTT CATCAGCTGT TTTTCCCAAC AAATATATGG TGTGTGTAT   | 120 |
| GGGAATGTAA CTTTCCATGT ACCAAGCAAT GTGCCTTTAA AAGAGGTCCT ATGGAAAAAA  | 180 |
| CAAAAGGATA AAGTTGCAGA ACTGGAAAAT TCTGAATTCA GAGCTTTCTC ATCTTTTAAA  | 240 |
| AATAGGGTTT ATTTAGACAC TGTGTCAGGT AGCCTCACTA TCTACAACCT AACATCATCA  | 300 |
| GATGAAGATG AGTATGAAAT GGAATCGCCA AATATTACTG ATACCATGAA GTTCTTTCTT  | 360 |
| TATGTGCTTG AGTCTCTTCC ATCTCCCACA CTAACCTGTG CATTGACTAA TGGAAGCATT  | 420 |
| GAAGTCCAAT GCATGATACC AGAGCATTAC AACAGCCATC GAGGACTTAT AATGTACTCA  | 480 |
| TGGGATTGTC CTATGGAGCA ATGTAAACGT AACTCAACCA GTATATATTT TAAGATGGAA  | 540 |
| AATGATCTTC CACAAAAAAT ACAGTGTACT CTTAGCAATC CATTATTTAA TACAACATCA  | 600 |
| TCAATCATTT TGACAACCTG TATCCCAAGC AGCGGTCATT CAAGACACAG ATATGCACCTT | 660 |
| ATACCCATAC CATTAGCAGT AATTACAACA TGTATTGTGC TGTATATGAA TGTTCCTTAA  | 720 |
| GGATCC                                                             | 726 |

配列番号：38

配列の長さ：657

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| GAGCTCATGG TTGCTGGGAG CGACGCGGGG CGGGCCCTGG GGGTCCTCAG CGTGGTCTGC | 60  |
| CTGCTGCACT GCTTTGGTTT CATCAGCTGT TTTTCCCAAC AAATATATGG TGTGTGTAT  | 120 |
| GGGAATGTAA CTTTCCATGT ACCAAGCAAT GTGCCTTTAA AAGAGGTCCT ATGGAAAAAA | 180 |
| CAAAAGGATA AAGTTGCAGA ACTGGAAAAT TCTGAATTCA GAGCTTTCTC ATCTTTTAAA | 240 |
| AATAGGGTTT ATTTAGACAC TGTGTCAGGT AGCCTCACTA TCTACAACCT AACATCATCA | 300 |
| GATGAAGATG AGTATGAAAT GGAATCGCCA AATATTACTG ATACCATGAA GTTCTTTCTT | 360 |
| TATGTGCTTG AGTCTCTTCC ATCTCCCACA CTAACCTGTG CATTGACTAA TGGAAGCATT | 420 |
| GAAGTCCAAT GCATGATACC AGAGCATTAC AACAGCCATC GAGGACTTAT AATGTACTCA | 480 |
| TGGGATTGTC CTATGGAGCA ATGTAAACGT AACTCAACCA GTATATATTT TAAGATGGAA | 540 |
| AATGATCTTC CACAAAAAAT ACAGTGTACT CTTAGCAATC CATTATTTAA TACAACATCA | 600 |
| TCAATCATTT TGACAACCTG TATCCCAAGC AGCGGTCATT CAAGACACAG AGGATCC    | 657 |

配列番号：39

配列の長さ：24

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

10

20

30

40

50

Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg  
 20

配列番号：40

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

10

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly  
 1 5

Leu

10

配列番号：41

20

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg  
 1 5

30

配列番号：42

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
 1 5

40

配列番号：43

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

配列

50

ATATGGATCC TCACCATCTC AGGGTGAGGG GC

32

配列番号：44

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys  
1 5

10

Ser

10

配列番号：45

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu  
1 5

20

配列番号：46

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Ser Pro Phe Pro Phe Asp Leu  
1 5

30

配列番号：47

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

40

Gln Leu Ser Pro Phe Pro Phe Asp Leu  
1 5

配列番号：48

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメン

10

配列

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
1 5

配列番号：49

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

20

配列

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val  
1 5

配列番号：50

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

30

配列

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
1 5

配列番号：51

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

40

配列

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser  
1 5

Val

10

50

【图 2】

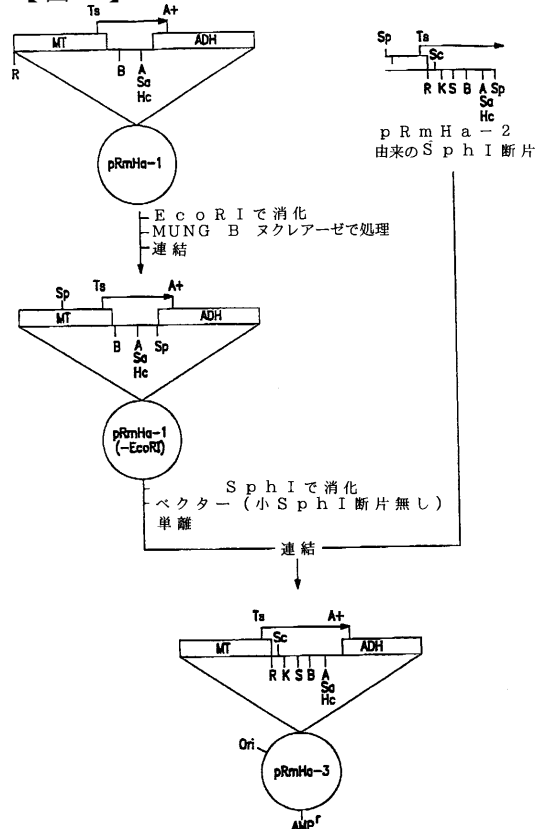


FIG. 2

【图 4】

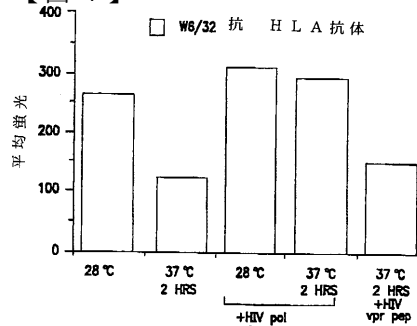


Figure 5 is a bar chart titled '【图 5】' showing the average fluorescence intensity (平均萤光) on the y-axis (ranging from 0 to 80) for two types of antibodies: W6/32 (represented by open bars) and HLA (represented by shaded bars). The x-axis shows five conditions: 28 °C, 37 °C 2 HRS, 28 °C, 37 °C 2 HRS, and 37 °C 2 HRS. The first two conditions are for W6/32, and the next three are for HLA. A bracket labeled '+HIV vir pep' spans the first three conditions, and another bracket labeled '+HIV pol A2 pep' spans the last two conditions.

| Condition   | Antibody Type | Average Fluorescence Intensity |
|-------------|---------------|--------------------------------|
| 28 °C       | W6/32         | ~64                            |
| 37 °C 2 HRS | W6/32         | ~32                            |
| 28 °C       | HLA           | ~69                            |
| 37 °C 2 HRS | HLA           | ~69                            |
| 37 °C 2 HRS | HLA           | ~32                            |

FIG. 5

【図 6】

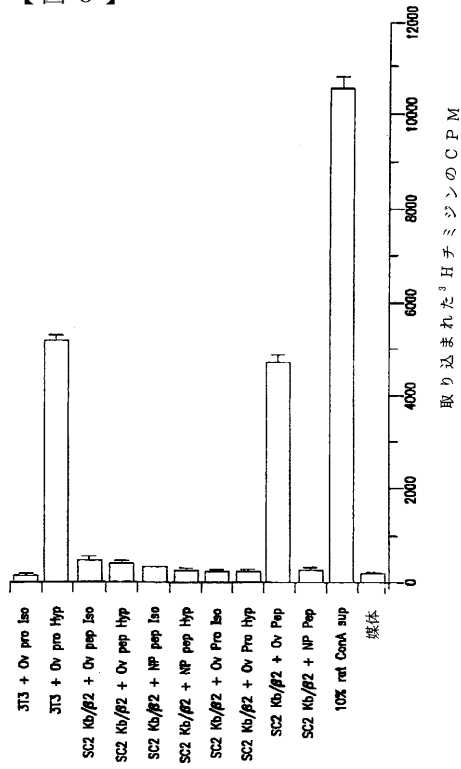


FIG. 6

【図 7】

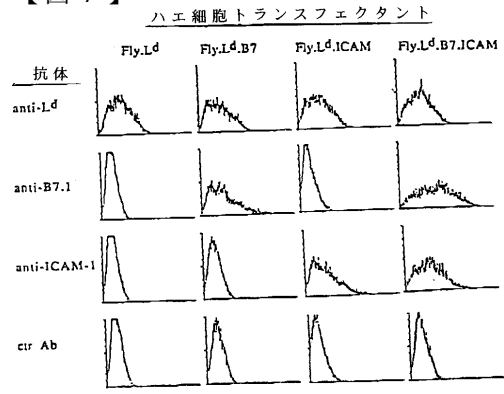


FIGURE 7

【図 8】

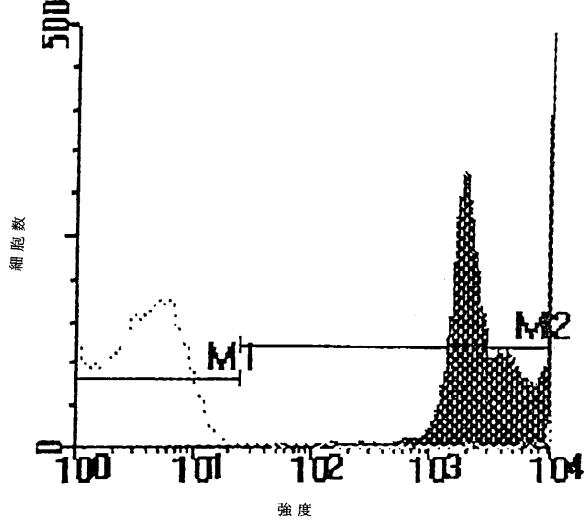


FIGURE 8

【図 9】

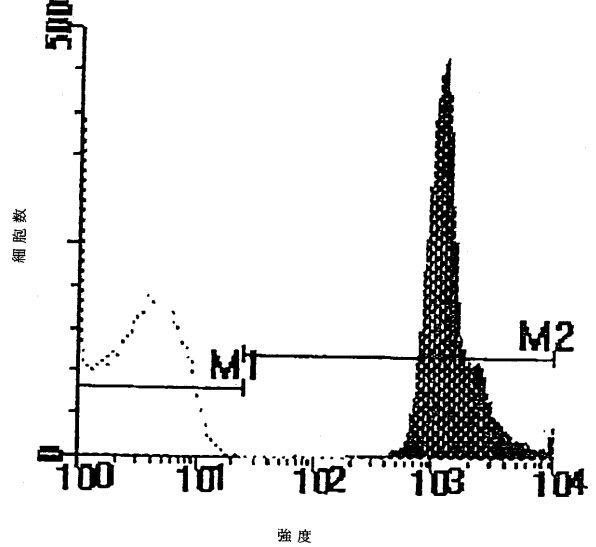


FIGURE 9

【図 10】

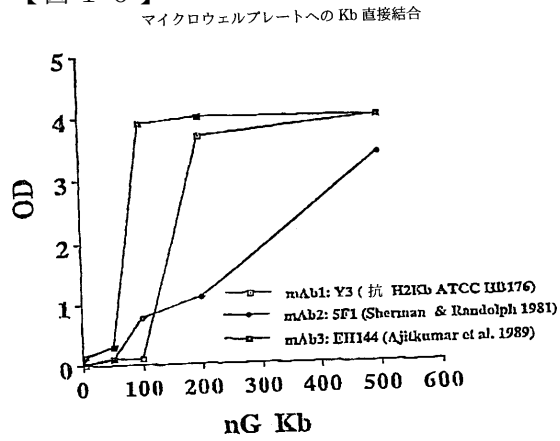


FIGURE 10

【図 11】

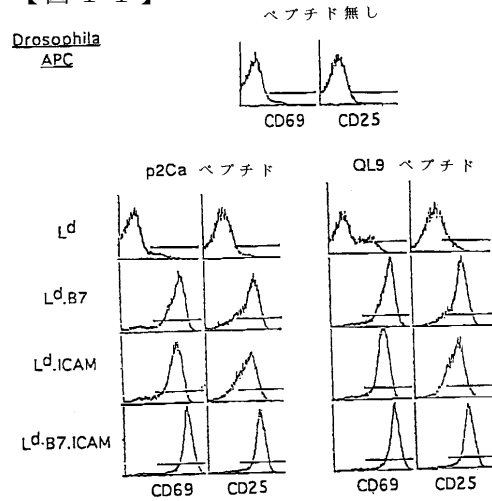


FIGURE 11

【図 12】

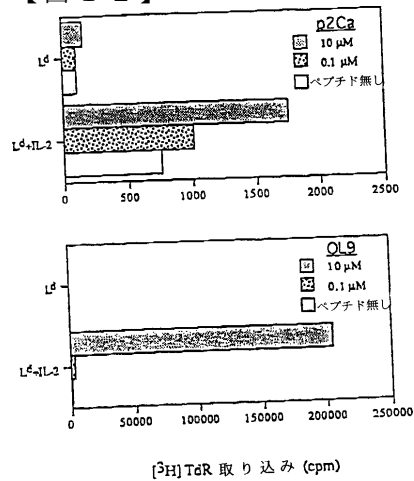


FIGURE 12

【図 13】

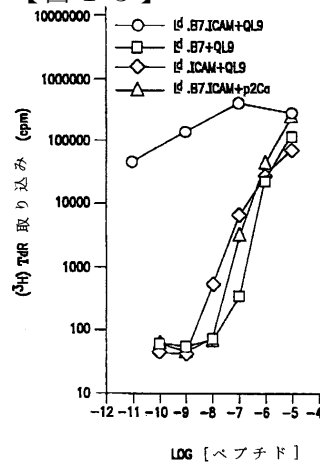


FIG. 13

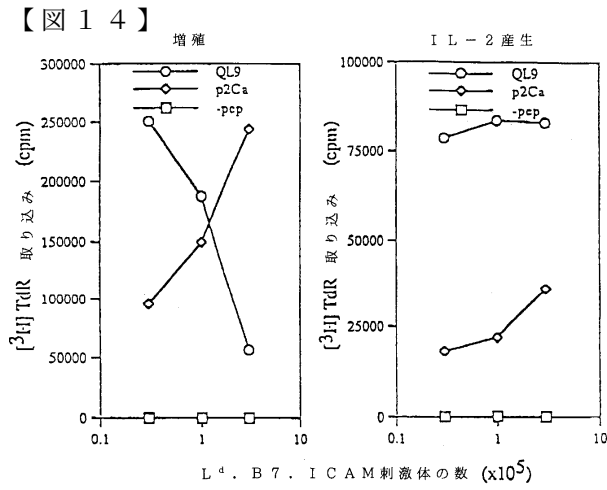


FIGURE 14

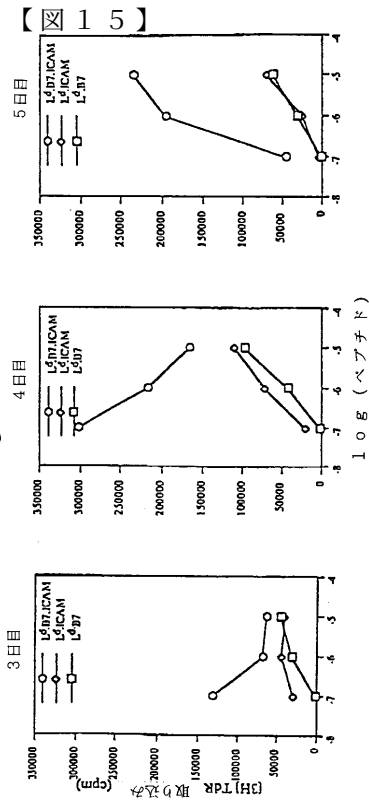


FIGURE 15

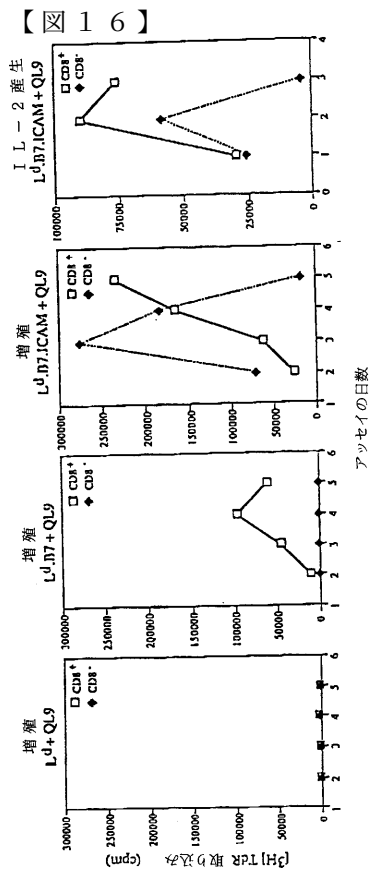


FIGURE 16

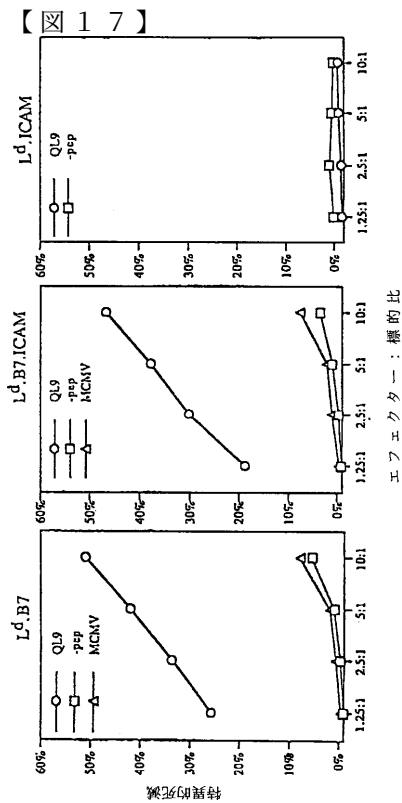


FIGURE 17

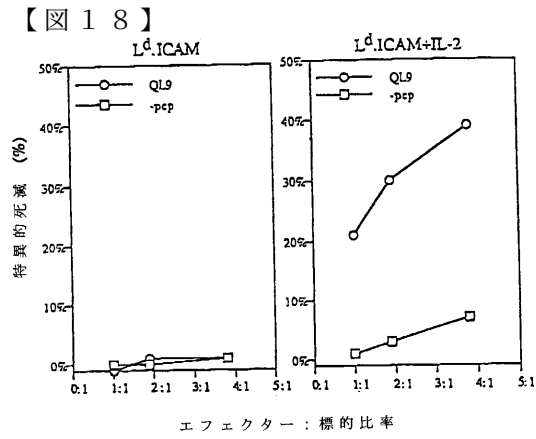


FIGURE 18

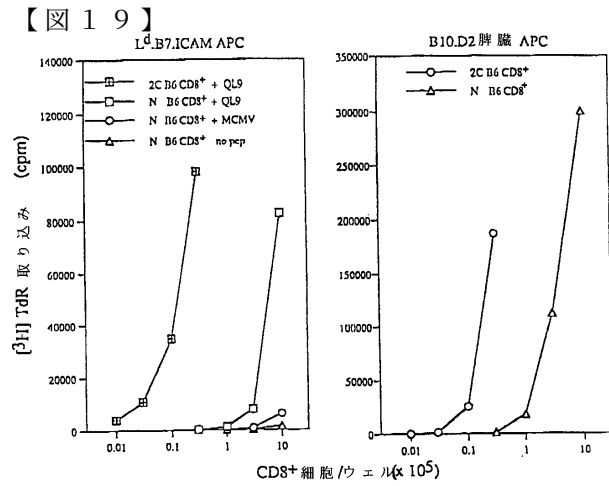


FIGURE 19

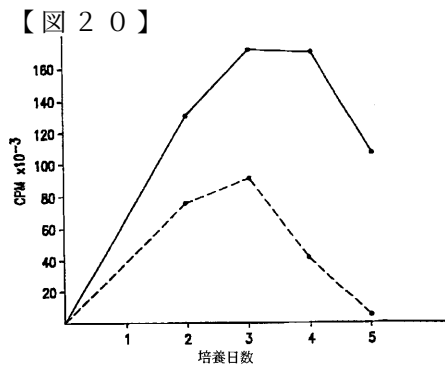


FIG. 20

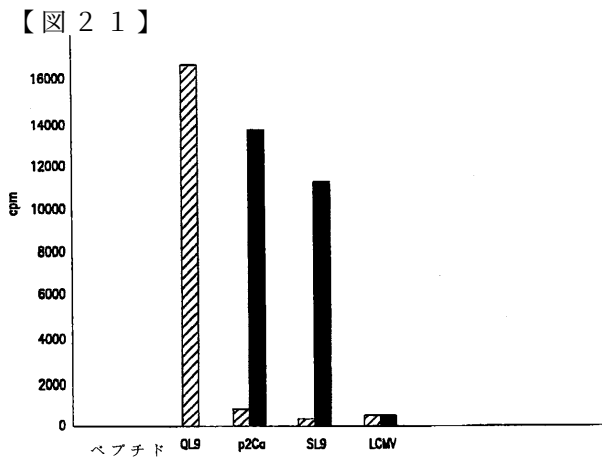


FIG. 21

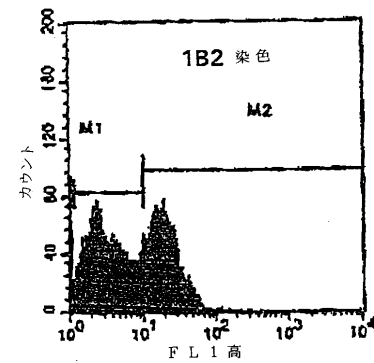
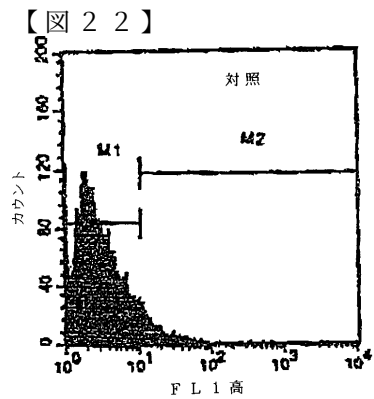


FIGURE 22

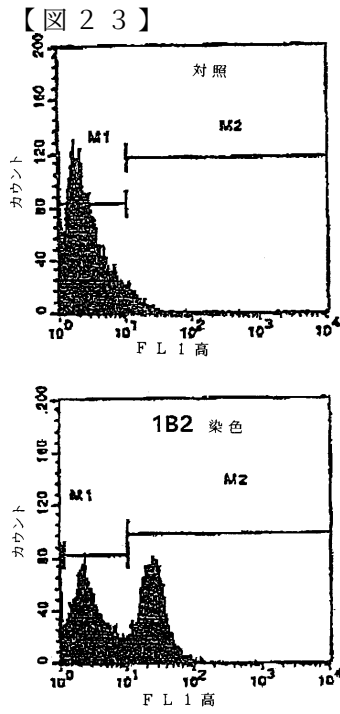


FIGURE 23

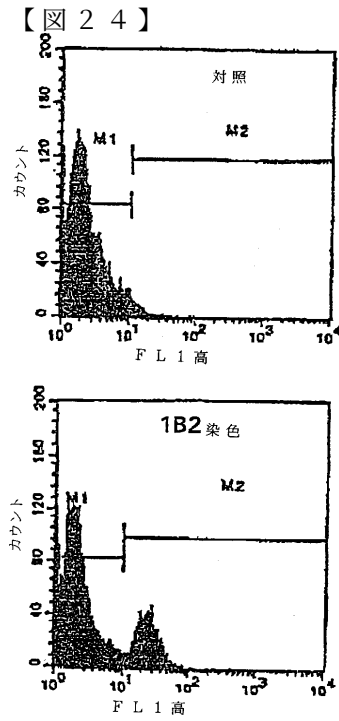


FIGURE 24

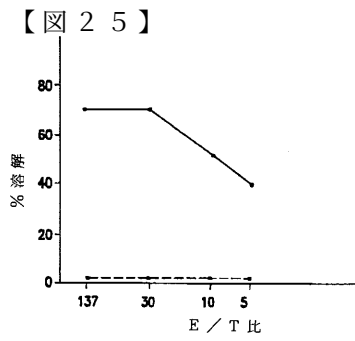


FIG. 25

インフルエンザママトリックス(MX)ペプチドを  
ロードしたハエ細胞で刺激したヒトCD8<sup>+</sup>  
細胞のCTL活性

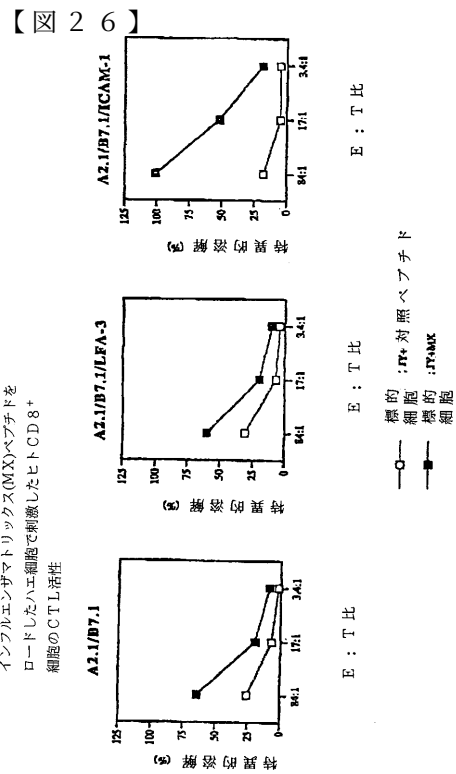


FIGURE 26

HIV-R-Tペプチドをロードしたハエ細胞で  
刺激したヒトCD8<sup>+</sup>細胞のCTL活性

【図 27】

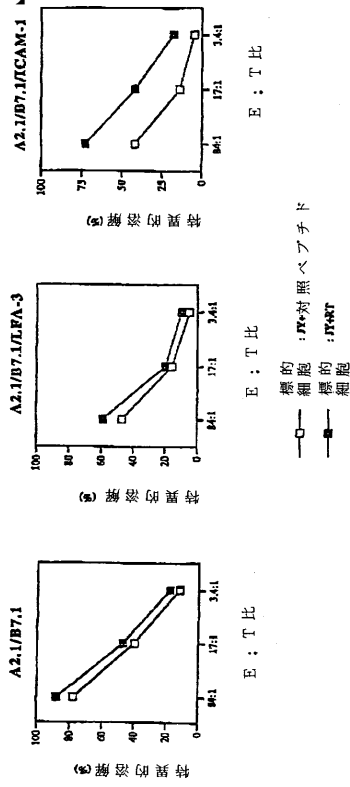


FIGURE 27

チロンナーゼペプチドをロードしたハエ細胞で  
刺激したヒトCD8<sup>+</sup>細胞のCTL活性

【図 28】

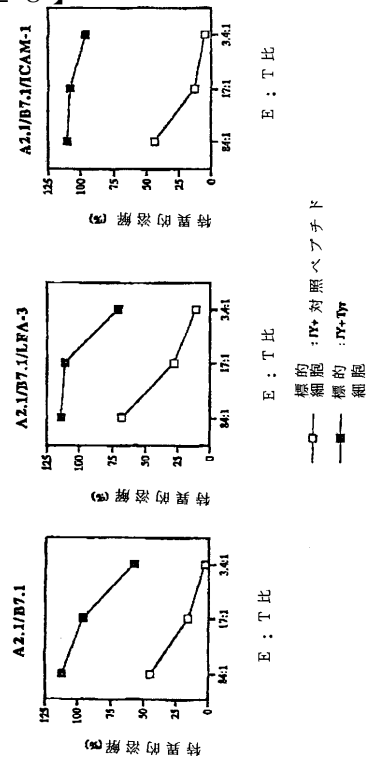


FIGURE 28

---

フロントページの続き

- (72)発明者 カイ, ツエーリン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２１２２、サン・デイエゴ、アベニダ・ナビダツド・７９８  
４・ナンバー・７４
- (72)発明者 スプレント, ジョナサン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２１２２、ルウカディア、ハイメタス・アベニュー・１０７  
６
- (72)発明者 ブランマーク, アンダース  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２１０９、サン・デイエゴ、リビエラ・ドライブ・３８５０  
・ナンバー・２・シー
- (72)発明者 ジャクソン, マイケル  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２０１４、デル・マー、ビラ・フェリノ・１２７２８
- (72)発明者 ピーターソン, パー・エイ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２０６７、ランチョ・サンタ・フェ、ピー・オー・ボックス  
・２３２３
- (72)発明者 リュクサンブール, アラン・エム・デ・ペアツシユ・デ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２０３７、ラ・ジョラ、エル・パセオ・グランデ・８１４１  
、アパートメント・８
- (72)発明者 ルテュルク, デイデイエ・ジヤン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２１０９、サン・デイエゴ、クラウン・ポイント・ドライブ  
・３９９１
- (72)発明者 モリアーティ, アン・エム  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２０６４、パウエイ、ロマス・ベルデス・ドライブ・１３０  
３８

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第９３／０１５５７ (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12N 5/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed