

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4365784号
(P4365784)

(45) 発行日 平成21年11月18日(2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年8月28日(2009.8.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
請求項の数 15 (全 64 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2004-513495 (P2004-513495)	(73) 特許権者 505443953 株式会社癌免疫研究所 大阪府吹田市江の木町13番9号
(86) (22) 出願日 平成15年6月12日(2003.6.12)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2003/007463	(74) 代理人 100068526 弁理士 田村 恭生
(87) 国際公開番号 W02003/106682	(74) 代理人 100087114 弁理士 齋藤 みのり
(87) 国際公開日 平成15年12月24日(2003.12.24)	(73) 特許権者 000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
審査請求日 平成18年5月16日(2006.5.16)	(73) 特許権者 000002912 大日本住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
(31) 優先権主張番号 特願2002-171518 (P2002-171518)	(74) 代理人 100068526 弁理士 田村 恭生
(32) 優先日 平成14年6月12日(2002.6.12)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	最終頁に続く
(31) 優先権主張番号 特願2002-275572 (P2002-275572)	
(32) 優先日 平成14年9月20日(2002.9.20)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

(54) 【発明の名称】 H L A - A 2 4 拘束性癌抗原ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のアミノ酸配列：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2)、
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5)、および
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6)、
のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項2】

配列番号：2、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】

請求項1または2記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】

配列番号：2、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列をコードする、請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項3または4記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項6】

請求項5記載の発現ベクターを含有する細胞。

【請求項7】

請求項6記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、請求項1または2記載のペプチドの製造方法。

【請求項8】

請求項1または2記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項9】

請求項1または2記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞。

【請求項10】

配列番号：2、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている、請求項9記載の抗原提示細胞。

10

【請求項11】

請求項1または2記載のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL。

【請求項12】

配列番号：2、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識する、請求項11記載のCTL。

【請求項13】

請求項1または2記載のペプチド、請求項3または4記載のポリヌクレオチド、請求項5記載の発現ベクター、請求項6記載の細胞、請求項9または10記載の抗原提示細胞、あるいは請求項11または12記載のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

20

【請求項14】

請求項1または2記載のペプチド、請求項3または4記載のポリヌクレオチド、請求項5記載の発現ベクター、請求項6記載の細胞、請求項9または10記載の抗原提示細胞、あるいは請求項11または12記載のCTLを有効成分とする癌ワクチン。

【請求項15】

請求項1または2記載のペプチド、請求項3または4記載のポリヌクレオチド、請求項5記載の発現ベクター、請求項6記載の細胞、請求項9または10記載の抗原提示細胞、あるいは請求項11または12記載のCTLにおける、癌ワクチンを製造するための使用

30

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は癌ワクチン療法の分野に属し、HLA-A24拘束性癌抗原ペプチドに関する。詳細には、本発明は、イン・ピボでCTL誘導活性を有するWT1由来のHLA-A24拘束性癌抗原ペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれを含有する癌ワクチン、癌ワクチンとしての使用およびそれを利用する癌の治療・予防方法に関する。

背景技術

生体による癌細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（以下、CTLと称する）が重要な働きをしている。CTLは、癌細胞上の癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）とMHC（Major Histocompatibility Complex）クラスI抗原（ヒトの場合はHLA抗原と称する）により形成される複合体を認識し、癌細胞を攻撃・破壊する。

40

癌抗原タンパク質は、Immunity, vol. 10: 281, 1999のtable 1に記載のものが代表例として挙げられる。具体的にはメラノサイト組織特異的タンパク質であるgp100（J. Exp. Med., 179: 1005, 1994）、MART-1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3515, 1994）、およびチロシナーゼ（J. Exp. Med., 178: 489, 1993）などのメラノソーム抗原、メラノーマ以外の癌抗原タンパク質としてはHER2/neu（J. Exp

50

. Med. , 181 : 2109 , 1995)、CEA (J . Natl . Cancer . Inst . , 87 : 982 , 1995)、およびPSA (J . Natl . Cancer . Inst . , 89 : 293 , 1997)などの癌マーカーが挙げられる。癌抗原ペプチドは、癌抗原タンパク質が細胞内プロテアーゼによりプロセシングされて生成される約8から11個のアミノ酸から成るペプチドであり (Cur . Opin , Immunol . , 5 : 709 , 1993 ; Cur . Opin , Immunol . , 5 : 719 , 1993 ; Cell , 82 : 13 , 1995 ; Immunol . Rev . , 146 : 167 , 1995)、前記のように、この生成された癌抗原ペプチドとMHCクラスI抗原 (HLA抗原) との複合体が細胞表面に提示され、CTLにより認識される。従って、CTLによる癌細胞破壊を利用する癌免疫療法剤 (癌ワクチン) を開発する場合、CTLを効率良く誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質より同定することが、非常に重要となる。

MHCクラスI分子は、多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性 (結合モチーフ) が存在する。例えば、HLA - A2の結合モチーフは、2番目のアミノ酸がロイシン、メチオニンまたはイソロイシン、9番目のアミノ酸がバリン、ロイシンまたはイソロイシンである。またHLA - A24の結合モチーフは、2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファン、9番目のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。また最近では、前記モチーフを含むHLA抗原への推定結合配列をデータベース上で検索することも可能である (例えばBIMASソフト (http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/))。従って、CTLを誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質より同定するには、第一に、癌抗原タンパク質のアミノ酸配列より目的のHLAタイプの結合モチーフまたは推定結合配列に一致する約8から11個のアミノ酸より構成されるペプチド領域を同定する。

しかしながら、結合モチーフや推定結合配列より同定されたペプチドが必ず免疫原性を有するとは限らない。癌抗原ペプチドは癌抗原タンパク質が細胞内でプロセシングされることにより生成されるため、プロセシングにより生成されないペプチドは抗原ペプチドとはなり得ない。さらに、結合モチーフや推定結合配列を有するペプチドが実際に癌抗原ペプチドとして細胞内で生成されても、多くの癌抗原タンパク質は本来生体に存在する正常な物質であるため、CTLはこれら癌抗原に対してトレランスとなっている場合がある。以上のことから、CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを同定するためには、目的のHLAタイプの結合モチーフ・推定結合配列による予測のみでは不十分であり、イン・ビボでの免疫原性 (CTL誘導活性) の評価が重要となる。

Wilms癌の癌抑制遺伝子WT1 (WT1遺伝子) は、Wilms癌、無紅彩、泌尿生殖異常、精神発達遅延などを合併するWAGR症候群の解析からWilms癌の原因遺伝子の1つとして染色体11p13から単離され (Nature , 343 : 774 , 1990)、そのゲノムDNAは約50kbで10のエキソンから成り、そのcDNAは約3kbである。cDNAから推定されるアミノ酸配列は、配列番号：1に示す通りである (Cell . , 60 : 509 , 1990)。WT1遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平9 - 104627号公報) ことなどから、WT1遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特開平9 - 104627号公報、特開平11 - 35484号公報)、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であることが判明した (J . Immunol . , 164 : 1873 - 80 , 2000、J . Clin . Immunol . , 20 , 195 - 202 , 2000)。癌免疫療法剤 (癌ワクチン) は多くの癌患者に対して適用可能であることが好ましいことから、多くの癌種で高発現しているWT1における癌抗原ペプチドの同定、および当該癌抗原ペプチドを利用した癌ワクチンの開発は重要である。これに関してW000/06602号公報およびW000/18795号公報には、

10

20

30

40

50

WT1タンパクの部分から成る幾つかの天然型の癌抗原ペプチドが記載されている。前記癌ワクチンの開発においてイン・ピボにおける有用性を評価するには、実験動物として一般に使用されている純系マウスは使用できず、HLAを発現するヒトモデル動物を用いる必要がある。すなわち、癌ワクチンとして用いられるヒト抗原ペプチドは、HLAに提示されることにより特異的免疫応答を誘導することが可能となるものであるが、当該HLAはヒトに特異的なMHCクラスI分子であるため、HLAを有さない非ヒト動物をヒト治療用癌ワクチンのイン・ピボ評価に使用することは出来ない。従って、前記のように癌ワクチンの有用性の評価には、HLAを発現するヒトモデル動物が必要である。

発明の開示

本発明の目的は、イン・ピボにおいて免疫原性（CTL誘導活性）を有するWT1由来の癌抗原ペプチド、およびそれを含有する癌ワクチン、その癌ワクチンとしての使用およびそれを利用する癌の治療・予防方法を提供することにある。

最近、HLA-A24抗原を発現しイン・ピボでの評価に使用できるヒトモデル動物が作製され、特許出願されている（WO 02/47474、国際公開日：2002年6月20日、出願人：住友製薬株式会社）。

これにより、HLA-A24拘束性癌抗原タンパク、癌抗原ペプチドおよびそれらの遺伝子をイン・ピボで評価することができるようになった。

本発明者らは、前記ヒトモデルマウスを用いて、WT1に由来するHLA-A24拘束性の天然型ペプチドおよび改変型ペプチドの評価を行った。すなわち、BIMASソフト（http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/）により推定したWT1中のHLA-A24抗原への推定結合配列（結合モチーフ）を有するペプチドについて評価した結果、以下の天然型ペプチド：

ペプチドA：Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：8）

ペプチドB：Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu（配列番号：7）

ペプチドC：Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：9）

ペプチドD：Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe（配列番号：10）

ペプチドE：Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe（配列番号：11）

において、唯一ペプチドB（配列番号：7）のみが、イン・ピボにて免疫原性（CTL誘導活性）を有することを見出した。

さらに前記ペプチドA～Cの第2位のアミノ酸をチロシン（Tyr）に改変した以下の改変型ペプチド：

ペプチドF：Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：2）

ペプチドG：Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu（配列番号：3）

ペプチドH：Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：4）

を作製し同様の評価を行った。その結果、改変型ペプチドGは、もとの天然型ペプチドBよりも、より高い免疫原性を有することを見出した。また、天然型ペプチドAおよびCが免疫原性を有していなかったにもかかわらず、その改変型ペプチドFおよびHは、高い免疫原性（CTL誘導活性）を有することを見出した。

さらに、前記と同様、BIMASソフトにより検索されたWT1中のHLA-A24抗原への推定結合配列を有するヒトWT1由来の以下の天然型ペプチド（ペプチドK、L）、およびその第2位のアミノ酸をチロシンに改変した以下の改変型ペプチド（ペプチドI、J）：

10

20

30

40

ペプチドK : Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5 1)

ペプチドL : Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 5 2)

ペプチドI : Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5)

ペプチドJ : Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 6)

についても同様の評価を行った。その結果、天然型ペプチドKおよびLは免疫原性(C T L誘導活性)を有していなかったにもかかわらず、その改変型ペプチドIおよびJはイン・ビボで高い免疫原性(C T L誘導活性)を有することを見出した。

これらの知見から、本発明者らは、前記配列番号 : 2 ~ 6 で示された改変型ペプチド、および配列番号 : 7 で示された天然型ペプチドは、癌ワクチンとして種々の形態で利用可能であるとの確信を得た。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は :

(I) 以下のアミノ酸配列 :

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 2) 、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 3) 、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 4) 、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号 : 5) 、および

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号 : 6) 、

のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド ; または配列番号 : 2 、 3 、 4 、 5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド ; あるいは配列番号 : 2 、 3 、 4 、 5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み、かつ H L A - A 2 4 拘束性の C T L 誘導活性を有するペプチド (ただし、配列番号 7 のアミノ酸配列を有するペプチドは除く) 、好ましくは配列番号 : 2 、 3 、 5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列の第 9 位のロイシンをフェニルアラニン、トリプトファン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、本発明のペプチド ; 配列番号 : 4 のアミノ酸配列の第 9 位のフェニルアラニンをトリプトファン、ロイシン、イソロイシンまたはメチオニンに置換した改変アミノ酸配列を含む、本発明のペプチド ; または配列番号 : 4 のアミノ酸配列の第 5 位のシステインをアラニン、セリンまたは - アミノ酪酸に置換した改変アミノ酸配列 (配列番号 : 6 6 、 6 7 または 6 8) を含む、本発明のペプチド ; または配列番号 : 2 、 3 、 4 、 5 および 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列からなる、本発明のペプチド ;

(I I) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、好ましくは配列番号 : 2 ~ 6 および 6 6 ~ 6 8 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列をコードする、本発明のポリヌクレオチド ; あるいは、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター ; あるいは、本発明の発現ベクターを含有する形質転換細胞 ; あるいは、本発明の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することの特徴とする、本発明のペプチドの製造方法 ;

(I I I) 本発明のペプチドに特異的に結合する抗体 ;

(I V) 本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、好ましくは配列番号 : 2 ~ 6 および 6 6 ~ 6 8 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体が提示されている、本発明の抗原提示細胞 ;

(V) 本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体を認識する C T L 、好ましくは配列番号 : 2 ~ 6 および 6 6 ~ 6 8 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドと H L A - A 2 4 抗原との複合体を認識する、本発

10

20

30

40

50

明のCTL；および

(VI)本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の形質転換細胞、本発明の抗原提示細胞、あるいは本発明のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、具体的には癌ワクチン、ならびに本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換細胞、抗原提示細胞あるいはCTLにおける癌ワクチンを製造するための使用、およびそれら発明の治療または予防に有効な量をそれを必要としている癌患者に投与する癌を治療または予防するための方法に関する。

さらに、本発明は、

(VII)以下のa)~f)

a) Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：7)を含むペプチド、

b)上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c)上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

d)上記c)の発現ベクターを含有する細胞、

e)上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および

f)上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTL、

のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、具体的には癌ワクチン、ならびに上記ペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換細胞、抗原提示細胞あるいはCTLにおける癌ワクチンを製造するための使用、およびそれら発明の治療または予防に有効な量をそれを必要としている癌患者に投与する癌を治療または予防するための方法に関する。

発明を実施するための最良の形態

(I)本発明のペプチド

本発明のペプチドは、ヒトWT1(Cell., 60:509, 1990、NCBIデータベース Accession No. XP_034418、配列番号：1)に由来し、イン・ビボでHLA-A24拘束性のCTL誘導活性(免疫原性)を有する。

本発明のペプチドは、抗原提示細胞に提示されて、イン・ビボにてHLA-A24抗原拘束性にCTLを誘導するという特性を有する。当該特性は、後述の参考例に詳細に記述されるHLA-A24モデルマウスを用いることにより調べることができる。

配列番号：2、3、4、5および6のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含む本発明ペプチドは、本発明ペプチド由来の癌抗原ペプチドが抗原提示細胞に提示され、CTLを誘導するという特性を有する限り、何ら制限されないが、その長さは通常9~100個、好ましくは9~50個、より好ましくは9~30個、さらに好ましくは9~20個、そしてさらに好ましくは9~11個のアミノ酸残基である。ここに、癌抗原ペプチドとは、抗原提示細胞に提示される、CTL誘導活性を導くペプチドとして定義される。

本発明ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献(ペプチド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ(The Proteins), vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されている方法が挙げられる。

また本発明のペプチドは、本発明ペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。当該DNA合成や各種プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収などの操作は、当業者に周知の方法、文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983)、DNA Cloning, DM. Glover

10

20

30

40

50

、 I R L P R E S S (1 9 8 5))、あるいは後述の (I I) 項に記載の方法などに準じて行うことができる。

以下、本発明のペプチドについてより具体的に説明する。

(1) 配列番号： 2 ~ 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド
本発明は前述のように、配列番号： 2 ~ 6 に示される W T 1 由来の改変型ペプチドが、イン・ビボにて C T L 誘導活性を有するという新たな知見を得たことに基づく。配列番号： 2 ~ 6 に示される新規なペプチドがイン・ビボにおいて C T L 誘導活性を確かに示すという知見は、従来知られていなかった。これら改変型ペプチドのいずれかを含む本発明のペプチドは、癌免疫療法における C T L 誘導剤の有効成分として、また癌ワクチンの有効成分として有用である。

10

本発明のペプチドは、具体的には以下のアミノ酸配列：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号： 2)、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号： 3)、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号： 4)、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号： 5) または

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号： 6) のいずれかを含む。

このうち Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (20
配列番号： 4) を含むペプチドおよび Ala Tyr Leu Pro Ala Val
Pro Ser Leu (配列番号： 5) を含むペプチドが、好ましい。

本発明のペプチドとして、より具体的には以下の (1 - 1) ~ (1 - 4) に挙げるペプチドを例示することができる。

(1 - 1) 配列番号： 2 ~ 6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド

配列番号： 2 ~ 6 のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドの具体例として、以下に示す癌抗原ペプチドを例示することができる：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号： 2) からなる癌抗原ペプチド、

30

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号： 3) からなる癌抗原ペプチド、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号： 4) からなる癌抗原ペプチド、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号： 5) からなる癌抗原ペプチド、

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号： 6) からなる癌抗原ペプチド。

このうち Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (40
配列番号： 4) からなる癌抗原ペプチドおよび Ala Tyr Leu Pro Ala
Val Pro Ser Leu (配列番号： 5) からなる癌抗原ペプチドが、好ましい。これらのペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記載のヒトモデル動物に供することによりイン・ビボでの C T L 誘導活性を測定することができる。

(1 - 2) 配列番号： 2 ~ 6 のいずれかのアミノ酸配列を含み、モチーフ構造を保持するペプチド

H L A 分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性 (結合モチーフ) が存在することが知られている。H L A - A 2 4 の結合モチーフとしては、 8 ~ 1 1 アミノ酸からなるペプチドのうちの第 2 位のアミノ酸がチロシン (T y r)、フェニルアラニン (P h e)、メチオニン (M e t) またはトリプトファン (T r p) であり、C 末端のアミノ酸がフェニルアラニン (P h e)、ロイシン (L e u)、イソロイシン (I l e)、トリプトファン (T r p) またはメ

50

チオニン (Met) となることが知られている (J. Immunol., 152, p 3913, 1994、Immunogenetics, 41, p 178, 1995、J. Immunol., 155, p 4307, 1994)。

従ってこの規則性に基づいて、以下に示される9アミノ酸からなる本発明の癌抗原ペプチド:

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号: 2)、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号: 3)、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号: 4)、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号: 5)、または

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号: 6)、

のC末端に、Phe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した10アミノ酸からなるペプチド、あるいは当該10アミノ酸からなるペプチドのC末端にさらにPhe、Leu、Ile、TrpまたはMetを付加した11アミノ酸からなるペプチドであって、イン・ビボにてCTL誘導活性を有する当該ペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示できる。これらのペプチドも、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

(1-3) 配列番号: 2~6のいずれかのアミノ酸配列を含むエピトープペプチド

近年、複数のCTLエピトープ(抗原ペプチド)を連結したペプチド(エピトープペプチド)が、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161:3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2、-A3、-A11、B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。

またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド(エピトープペプチド)により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでヘルパーエピトープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチドを指すものであり(Immunity., 1:751, 1994)、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが知られている。当該ヘルパーエピトープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このようなヘルパーエピトープとCTLエピトープとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162:3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープより構成されるペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ(メラノーマ抗原gp100の第280位~288位からなる癌抗原ペプチド)とヘルパーエピトープ(破傷風毒素由来Tヘルパーエピトープ)とを連結したペプチドが臨床試験に供されている(Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)。

従って、前記(1-1)や(1-2)に記述したような本発明の癌抗原ペプチドやペプチドを含む複数のエピトープを連結したペプチド(エピトープペプチド)であってイン・ビボでCTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがCTLエピトープの場合、用いるCTLエピトープとしては、WT1由来のHLA-A1、-A0201、-A0204、-A

10

20

30

40

50

0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性のCTLエピトープが挙げられる。これらCTLエピトープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエピトープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により(Immunogenetics, 41:178, 1995)、8~14アミノ酸程度を挙げることができる。

また本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがヘルパーエピトープの場合、用いるヘルパーエピトープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが挙げられる。また当該ヘルパーエピトープの長さとしては、13~30アミノ酸程度、好ましくは13~17アミノ酸程度を

10

挙げることができる。本発明のエピトープペプチドとして、より具体的には、例えば配列番号:2~6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーエピトープとを連結させたペプチドを挙げることができる。より具体的には、例えば配列番号:2~6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド(例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号:32)とを連結させたペプチドや、配列番号:2~6のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu(配列番号:50、

20

Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)とを連結させたペプチドなどが挙げられる。このような複数のエピトープを連結させたペプチド(エピトープペプチド)は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献記載の方法(Molecular Cloning, T.M

30

Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, D.M. Glover, IRL PRESS(1985))や後述の(II)項に記載の方法などに準じて行うことができる。

以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

(1-4)配列番号:2~6のいずれかのアミノ酸配列を含み、N末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチド

前記(1-1)~(1-3)に例示した本発明のペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾することも可能である。ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1~3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられる。アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

40

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロ

50

アルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数 1 から 6 のアルキル基の 1 つまたは 2 つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数 0 から 6 のアルキル基の 1 つまたは 2 つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで 5 から 7 員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

(2) 配列番号：2～6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含むペプチド(多重改変ペプチド)

前述のように本発明は、配列番号：2～6 に示される WT 1 由来の改変型ペプチドが、イン・ビボで CTL 誘導活性を有するという新たな知見を基礎とする。このようなイン・ビボでの CTL 誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列をさらに改変することにより、同等またはそれ以上の CTL 誘導活性を有するさらなる多重改変ペプチドを得ることができる。従って本発明においては、このような配列番号：2～6 のいずれかに示されるペプチドの改変アミノ酸配列を含むペプチド(以下、多重改変ペプチドと称することもある)を提供する。

10

すなわち本発明は、配列番号：2、3、4、5 および 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み、かつ CTL 誘導活性を有するペプチドを提供するものである。ただし、配列番号 7 のアミノ酸配列を有するペプチドは本発明のペプチドの範囲から除外される。

本発明におけるアミノ酸残基の「改変」とは、1 個または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加を意味し、好ましくは置換である。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の位置および種類は、イン・ビボでの CTL 誘導活性を保持する限り特に限定されない。このような改変アミノ酸配列を含むペプチドの具体例として、以下に挙げるペプチドが例示される。

20

前述のように、HLA-A24 の結合モチーフとして、8～11 アミノ酸からなるペプチドのうち第 2 位のアミノ酸がチロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)、メチオニン(Met)またはトリプトファン(Trp)であり、C 末端のアミノ酸がフェニルアラニン(Phe)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、トリプトファン(Trp)またはメチオニン(Met)となることが知られている(J. Immunol., 152, p3913, 1994; Immunogenetics, 41, p178, 1995; J. Immunol., 155, p4307, 1994)。よって、本発明における多重改変ペプチドでは、配列番号：2～6 のなかから選ばれるいずれかのアミノ酸配列の第 2 位および/または第 9 位のアミノ酸残基を、前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基に置換することが可能である。

30

具体的に第 2 位のアミノ酸の多重改変ペプチドとしては、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ビボで CTL 誘導活性を有するペプチドを挙げることができる：

Arg Phe Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：53)、

Arg Trp Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：54)、

Arg Phe Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：55)、

Arg Met Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：56)、

40

Arg Trp Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：57)、

Arg Phe Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：58)、

Arg Met Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：59)、

Ala Phe Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：60)、

Ala Met Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：61)、

Ala Trp Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：62)、
 Asn Phe Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：63)、
 Asn Met Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：64)、
 Asn Trp Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：65)。

ここには、前記配列番号：53～65のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン・ピボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが包含される。

本発明の配列番号：2～6に示されるペプチドは、いずれも、ヒトWT1由来の天然型ペプチドの第2位のアミノ酸をチロシンに改変することにより良好なCTL誘導活性を有するに至った改変型ペプチドである。よって、本発明の多重改変ペプチドは、当該第2位のアミノ酸がチロシンであることが望ましい。一方C末端のアミノ酸については、前記のモチーフ上とり得るアミノ酸に改変することが可能である。

この態様における本発明の多重改変ペプチドとして、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ピボでCTL誘導活性を有するペプチドを挙げることができる：

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Phe (配列番号：12)、
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Trp (配列番号：13)、
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile (配列番号：14)、
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met (配列番号：15)、
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Phe (配列番号：16)、
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Trp (配列番号：17)、
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Ile (配列番号：18)、
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Met (配列番号：19)、
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Trp (配列番号：20)、
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Leu (配列番号：21)、
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Ile (配列番号：22)、
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Met (配列番号：23)、
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Phe (配列番号：24)、
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Trp (配列番号：25)、
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Ile (配列番号：26)、
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Met (配列番号：27)、
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Phe (配列番号：28)、
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Trp (配列番号：29)、
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Ile (配列番号：30)、
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Met (配列番号：31)。

これには、前記配列番号：12～31のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン

10

20

30

40

50

・ピボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが包含される。

さらに、上記第2位のアミノ酸の多重改変ペプチドにおける第2位のアミノ酸の改変と、ここに記載のC末端のアミノ酸の改変とを併せ持つ癌抗原ペプチドも例示することができる。

また、配列番号：4に記載のアミノ酸配列中にはシステイン残基が存在し、それは溶液中にて酸化されてジスルフィド結合を生じる可能性がある。これを避けるには、当該システイン残基を他のアミノ酸残基、例えばアラニン残基やセリン残基などに置換したり、システイン残基と化学構造の類似する - アミノ酪酸に置換し、多重改変ペプチドとすることが考えられる。

この態様における本発明の多重改変ペプチドとして、以下に列挙するアミノ酸配列を含みかつイン・ピボでCTL誘導活性を有するペプチドを挙げることができる：

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：66)、

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：67)、

Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：68) [ここに、Abuは α -アミノ酪酸である]。

これには、前記配列番号：66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなりかつイン・ピボでCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドが包含される。

これらのペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。また、本発明の参考例に記載のヒトモデル動物に供することによりイン・ピボでのCTL誘導活性を測定することができる。

以上述べた本発明の多重改変ペプチドに関しても、前記(1-2)と同様のモチーフ構造を保持するペプチド、前記(1-3)と同様の複数のエピトープを連結させたペプチド、あるいは前記(1-4)と同様のアミノ基もしくはカルボキシル基を修飾したペプチドとすることができる。

以上のような本発明のペプチドは、例えば、後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、また後述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

(II) 本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、および形質転換細胞

本発明はまた、前記本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

このような本発明のポリヌクレオチドとしては、以下に示すポリヌクレオチドが例示される：

10

20

30

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：2) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：3) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：4) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：5) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：6) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：66) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：67) を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド、

Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：68) [ここに、Abuは α -アミノ酪酸である] を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド。

具体的には、例えば前記(1-3)に記述したような配列番号：2~6および66~68のいずれかのアミノ酸配列を含むエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。より具体的には、例えば配列番号：2~6および66~68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とヘルパーペプチドとを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができ、例えば配列番号：2~6および66~68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上と破傷風毒素由来のヘルパーペプチド(例えば Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu; 配列番号：32)とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドや、配列番号：2~6および66~68のいずれかのアミノ酸配列の1種または2種以上とAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu(配列番号：50、Clinical Cancer Res., 2001, 7: 3012-3024)とを連結させたペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。

前記で作製された本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、ZAPII、gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベク

10

20

30

40

50

ター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター(lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど)を有するGST融合タンパク質を発現するベクター(pGEX4Tなど)や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター(pcdNA3.1/Myc-Hisなど)、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター(pET32a)などを用いることができる。

10

以上のような本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターを本発明の参考例に記述のヒトモデル動物に供することにより、イン・ビボでのCTL誘導活性を測定することができる。

本発明のポリヌクレオチドまたはそれを含有する発現ベクターは、例えば、後述する本発明のペプチドの製造において、後述する遺伝子治療において、また後述する抗原提示細胞の作製において、有効に用いることができる。

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

20

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E.coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Verocell細胞、Hela細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

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

30

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養することにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたポリペプチドは一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のポリペプチドを、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

(III) 本発明の抗体

40

本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。

これらの抗体の製造方法はすでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13

50

、Antibodies ; A Laboratory Manual , Lane , H , D .ら編 , Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989) 。

具体的には、本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を免疫原として用い、家兎等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）をマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4～11.11）。

本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメット-ゲラン桿菌）やコリネバクテリウム-バルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノプロット法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、WT1遺伝子が発現している癌、すなわち胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の診断において有効である。

（IV）本発明の抗原提示細胞

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められたが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された癌細胞を特異的に傷害するCTLが誘導されたことを示している。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、後述する細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

本発明の抗原提示細胞は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が提示された抗原提示細胞であれば良いが、好ましくは、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体が樹状細胞の細胞表面に提示された抗原提示細胞を挙げることができる。

細胞療法において用いられる抗原提示細胞は、癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でパルスするか、または本発明のポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターを細胞内に導入して、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示可能なHLA-A24抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にパルスされるものとしては、本発明のペプチドであっても良いし、また本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターであっても良い。

10

20

30

40

50

本発明の抗原提示細胞は、例えば癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を体外でパルスし、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を作製することにより得られる（Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999）。樹状細胞を用いる場合は、例えば、癌患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

10

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載の配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド）あるいはそれを含有する発現ベクターを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該ポリヌクレオチドがDNAの場合は、Cancer Res., 56:p5672, 1996やJ. Immunol., 161:p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、DNAのみならずRNAの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができ、この場合は、J. Exp. Med., 184:p465, 1996などを参考にして行うことができる。

以上のようにして作製された本発明の抗原提示細胞は、後述するCTLの誘導剤、癌ワクチンの有効成分として、あるいは細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

20

（V）本発明のCTL

本発明は、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識するCTLを提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド投与によりCTL誘導活性が認められたが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この複合体の提示された癌細胞を特異的に傷害するCTLが誘導されたことを示している。このような、HLA-A24抗原と本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLは、後述する養子免疫療法において有効に用いられる。

本発明のCTLは、本発明のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するものであれば良いが、具体的には、例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識するCTLを挙げることができる。

30

養子免疫療法において用いられるCTLは、患者の末梢血リンパ球を単離し、これを本発明のペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）、あるいは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載の配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチド）やそれを含有する発現ベクターでイン・ビトロで刺激する等により作製される（Journal of Experimental Medicine 1999, 190:1669）。

40

以上のようにして作製された本発明のCTLは、癌ワクチンの有効成分として、あるいは養子免疫療法において有効に用いられる。

（VI）癌ワクチンとしての医薬組成物、使用および方法

以上に記載した本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の抗原提示細胞、および本発明のCTLは、それぞれの物質に応じた適切な形態とすることにより、CTLの誘導剤、すなわち癌ワクチンの有効成分とすることができる。以下、具体的に説明する。

（6-1）本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチン

本発明のペプチドは、CTLの誘導活性を有しており、誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮することができる。従って本発明のペ

50

プチドは、癌の治療または予防のための癌ワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。本発明の癌ワクチンをHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A24抗原にペプチド（例えば配列番号：2～6および66～68のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）が提示され、提示されたHLA-A24抗原複合体特異的CTLが増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

10

よって、本発明は別の態様として、本発明の癌ワクチン製造のための使用、および本発明の癌ワクチンの有効量をHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、単一のCTLEピトープを有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLEピトープやヘルパーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。すなわち近年、複数のCTLEピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161:3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLEピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLEピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLEピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。このようにして癌の治療または予防が達成される。

20

また本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献(Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、水酸化アルミニウム如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオール如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。

30

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

40

(6-2) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または発現ベクターを有効成分とするDNAワクチン

前記本発明のペプチドのみならず、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそれを含有する発現ベクターもまた、癌の治療または予防のためのDNAワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド、または当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。また、本発明は別の態様とし

50

て、本発明のDNAワクチンの有効量をHLA-A24陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915 - 3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、イン・ビボでそれぞれ

10

のエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。従って、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、癌ワクチンの有効成分とすることができる。

本発明のポリヌクレオチドを癌ワクチン（DNAワクチン）の有効成分として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、月刊薬事，36（1），23 - 48（1994）、実験医学増刊，12（15），（1994）、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

20

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

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

本発明のポリヌクレオチドを実際に医薬として作用させるには、当該ポリヌクレオチドを直接体内に導入する*in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す*ex vivo*法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、月刊薬事，36（1），23 - 48（1994）、実験医学増刊，12（15），（1994）、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

30

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のポリヌクレオチドを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のポリヌクレオチドを含有するリポ

40

ソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明のポリヌクレオチドの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg ~ 100mg、好ましくは0.001mg ~ 10mgの本発明のポリヌクレオチドを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

以上のような本発明のポリヌクレオチドの癌患者への投与により、抗原提示細胞内で当該ポリヌクレオチドに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた個々の癌抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示

50

細胞表面に高密度に提示され、この複合体特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。以上のようにして、癌の治療または予防が達成される。本発明のポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

(6-3) 本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンを提供する。

近年、癌患者の末梢血からリンパ球を分離し、その中から樹状細胞を誘導し、イン・ビトロでペプチド等をパルスして調製した抗原提示細胞を皮下投与などにより患者に戻す細胞療法(DC療法)が報告されている(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999、Cancer Res., 56:p5672, 1996、J. Immunol., 161:p5607, 1998、J. Exp. Med., 184:p465, 1996)。従って前記本発明の抗原提示細胞を、細胞療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量は、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつWT1陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、癌を治療または予防することができる。本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

(6-4) 本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン(癌ワクチンとしての医薬組成物)を提供する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

メラノーマにおいて、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養し、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer Inst., 86:1159, 1994)。またマウスのメラノーマでは、脾細胞をイン・ビトロで癌抗原ペプチドTRP-2で刺激し、癌抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドあるいは本発明のポリヌクレオチドや発現ベクターを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して癌特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。従って前記本発明のCTLを、養子免疫療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量としては、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつWT1陽性の患者の体内でCTLによる癌細胞の傷害作用が促進され、癌細胞を破壊することにより、癌を治療することができる。本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱

10

20

30

40

50

癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の治療または予防のために使用することができる。

(VII) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列を含むペプチドに基づく癌ワクチン
 本発明において、アミノ酸配列：Arg Val Pro Gly Val Ala P
 ro Thr Leu (配列番号：7)を有するペプチドが、イン・ビボでCTL誘導活
 性を有することが見出された。当該配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペ
 プチドは、WO00/18795号公報においてHLA-A24抗原への推定結合配列を
 有するペプチドとして開示されている。しかしながらイン・ビボでCTL誘導活性を有し
 、癌ワクチンとして利用可能であることは本発明において初めて見出された知見である。
 従って本発明は、以下のa)~f)：

- a) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列を含むペプチド、
- b) 上記a)のペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 上記b)のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
- d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、
- e) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体の提示され
 抗原提示細胞、および
- f) 上記a)のペプチド由来の癌抗原ペプチドとHLA-A24抗原との複合体を認識す
 るCTL、

のなかから選ばれるいずれかを有効成分とする医薬組成物および癌ワクチンを提供する。
 また、本発明は、上記ペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換細胞、抗原
 提示細胞あるいはCTLにおける癌ワクチンを製造するための使用、およびそれら発明の
 治療または予防に有効な量をそれを必要としている癌患者に投与する癌を治療または予防
 するための方法に関する。

当該a)~f)に記載の各物質の作製法、およびこれらの物質の癌ワクチンとしての用途
 については、全て、前記本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、抗原提示
 細胞およびCTLの項に記載のとおりである。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら
 限定されるものではない。

以下の参考例は、HLA-A24抗原を発現するトランスジェニックマウスの作製に関す
 るものであり、その詳細はWO 02/47474 (国際公開日：2002年6月20日
 、PCT/JPO1/10885 (国際出願日：2001年12月12日 (優先日：20
 00年12月13日))に記載されている。

参考例1

HLA-A2402ゲノムDNA断片のクローニング

(1) HLA-A2402ゲノムDNA断片のクローニング
 ヒトHLA-A2402ゲノムDNAをPCRクローニングするため、ヒト腫瘍細胞株R
 ERF-LC-AI細胞 (理研細胞バンクRCB0444)を培養し、Genomic
 Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham社製)を用い、添付のプロトコルに従い、ヒトゲノムDNAを精製し
 た。次に、キメラHLA遺伝子の構築に必要なHLA-A2402ゲノムDNA配列につ
 いてGenBankデータベースにより調べたところ、Accession番号、Z72
 422が該当するものであったが、プロモーター領域(270bp)が登録されていない
 ことが判明した。当該トランスジェニックマウスの作製には、プロモーター、エキソン1
 ~3、およびイントロン1~3を必要とする。そこで、プロモーターを含むHLA-A2
 402ゲノムDNAのPCRクローニングにあたり、日本人に多いHLA-A2601の
 プロモーターの塩基配列(Accession番号、AB005048)を参考にHLA
 26-1F(5'-CCC AAG CTT ACT CTC TGG CAC CAA
 ACT CCA TGG GAT-3', 36mer、配列番号：36)を上流プライ
 マーとし、またイントロン3に含まれる塩基配列の一部を改変したもの、すなわちAcc

10

20

30

40

50

ession 番号 . Z 7 2 4 2 2 の 5 ' 末より 1 2 8 2 番目を G から A に改変した A 2 4 - B g l I I 3 0 (5 ' - C G G G A G A T C T A C A G G C G A T C A G G T A G G C G C - 3 ' , 3 0 m e r , 配列番号 : 3 7) を下流プライマーとして用いた。

ここで、当該塩基改変の理由は以下の通りである。すなわち、トランスジェニックマウスにおいて発現するキメラ H L A が、エキソン 1 から 3 までを H L A - A 2 4 0 2、エキソン 4 から 8 までを H - 2 K^b によって構成されることを目的としており、このようなキメラ H L A を作製するために、H L A - A 2 4 0 2 ゲノム D N A 上流よりイントロン 3 にコードされる制限酵素 B a m H I 部位までと H - 2 K^b ゲノム D N A のイントロン 3 より下流とを連結するため、H L A - A 2 4 0 2 のイントロン 3 に人為的に制限酵素 B g l I I 部位を構築する必要があったからである。

10

次に、3 ' 5 ' のエキソヌクレアーゼ活性の高い N a t i v e P f u D N A P o l y m e r a s e (S t r a t a g e n e 社製) を用い、添付のプロトコールに従い、上記プライマーペアを用いて H L A - A 2 4 0 2 ゲノム D N A 断片の P C R クローニングを行った。P C R は 9 5 4 5 秒で熱処理した後、9 5 4 5 秒、6 6 1 分、および 7 2 4 分を 3 5 サイクル繰り返したのち、7 2 で 1 0 分反応させ、その後 4 に冷却した。増幅遺伝子断片をファージミドベクター p B l u e s c r i p t の制限酵素 H i n d I I I および B a m H I 切断部位にライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを 4 2 のヒートショック法により大腸菌 J M 1 0 9 (東洋紡社製) に導入し、X - G a l および I P T G を塗布したアンピシリン (5 0 μ g / m l) 含有 L B 寒天培地 (1 % バクトトリプトン、0 . 5 % イーストエキストラクト、1 % N a C l 、2 % 寒天) で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。

20

(2) H L A - A 2 4 0 2 プロモーター領域の塩基配列の決定

上記で得られた形質転換体の 4 個について、3 m l のアンピシリン含有 L B 培地に overnight 培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンをアルカリ溶解法 (F . M . A u s u b e l ら編、C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y , J o h n W i l e y & S o n s , I n c .) により精製した。次に、A B I P R I S M^{T M} 3 7 7 D N A シークエンシングシステム (P E バイオシステムズ社製) により塩基配列を解析した。シーケンス解析用サンプルは、A B I P R I S M^{T M} D y e T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g R e a d y R e a c t i o n キット (P E バイオシステムズ社製) を用いて、添付プロトコールに従い、各クローンのシーケンスを解析した。その結果、すべてのクローンについてプロモーター領域を比較すると完全に一致していたことより、G e n B a n k データベースに登録されていない H L A - A 2 4 0 2 のプロモーター領域の塩基配列が決定された。また、A c c e s s i o n 番号 . Z 7 2 4 2 2 の塩基配列と各クローンを比較したところ、P C R 変異はみられない正常な 1 個のクローンが存在していた。

30

参考例 2

H - 2 K^b ゲノム D N A 断片のクローニング

(1) H - 2 K^b ゲノム D N A 断片のクローニング

40

マウス腫瘍細胞株 E L 4 細胞 (A T C C T 1 B - 3 9) を培養してマウスゲノム D N A を精製し、P C R クローニングに用いた。D N A の精製方法は、長鎖 D N A の増幅に適する T a K a R a L A T a q^{T M} (宝酒造株式会社製) を用い、添付のプロトコールに従い実施した。次に、キメラ H L A 遺伝子の構築に必要な H - 2 K^b 遺伝子配列について G e n B a n k データベースにより調べたところ、2 つに分断されて登録されていた。すなわち、A c c e s s i o n 番号 . v 0 0 7 4 6 および v 0 0 7 4 7 である。v 0 0 7 4 6 ではイントロン 3 の一部迄の H - 2 K^b 上流をコードする 1 5 9 4 b p 領域が、一方、v 0 0 7 4 7 ではイントロン 7 の一部迄の H - 2 K^b 下流をコードする 1 8 3 7 b p 領域が登録されていた。v 0 0 7 4 6 および v 0 0 7 4 7 により 2 つに分断されて登録されているイントロン 3 には制限酵素 B a m H I 部位が存在していなかったことにより、デ

50

ータベースに登録されているH-2K^b遺伝子は不完全長と推測された。

H-2K^b遺伝子には相異なる偽遺伝子や相同性の高い遺伝子が存在している(Ce111, 25:683, 1981)。そこで、当該相同遺伝子と相同性が低く且つv00746のエキソン3にコードされるH-2KB F3(5'-CGC AGG CTC TCA CAC TAT TCA GGT GAT CTC-3', 30mer、配列番号: 38)を上流プライマーとし、またv00747の末端に制限酵素EcoRI部位を付加したH-2KB 3R(5'-CGG AAT TCC GAG TCT CTG ATC TTT AGC CCT GGG GGC TC-3', 38mer、配列番号: 39)を下流プライマーとして、TaKaRa LA TaqTM(宝酒造株式会社製)を用いて添付のプロトコールに従い、上記精製マウスゲノムDNAを鋳型にPCR反応を実施した。当該PCRは、98 10秒および66 4分25サイクル繰り返したのち、68 で10分反応させ、その後4 に冷却した。

増幅遺伝子断片をファージミドベクターpBluescriptの制限酵素KpnIおよびEcoRI切断部位にライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42 のヒートショック法により大腸菌JM109(東洋紡社製)に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。この形質転換体3個を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含する組み換えプラスミドクローンを精製し、シーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。3つの当該クローンの塩基配列と比較したところ、2クローンでそれぞれ別々に1ヶ所のPCR変異が、他方1クローンで3ヶ所のPCR変異がみられた。また、3クローン間では共通しているがv00747と異なる塩基が5ヶ所みられた。これら塩基はイントロン6と3'非翻訳領域に相当する領域にあった。更に、未登録のイントロン3領域においては、3クローン間で異なるPCR変異した塩基が1ヶ所みられた。これより、未登録領域の塩基配列部分を決定することができなかつたため、3' 5'のエキソヌクレアーゼ活性の高いポリメラーゼを用いて未登録のイントロン3領域について再度クローニングを行い、塩基配列の決定を行った。

(2) H-2K^bイントロン3の塩基配列の決定

未登録領域の塩基配列を決定するため、Native Pfu DNA Polymerase(Stratagene社製)を用い、添付のプロトコールに従い、上記精製マウスゲノムDNAを鋳型に未登録のイントロン3を含む領域についてPCRクローニングした。ここでは、v00746に登録されているH-2kb F5(5'-AGG ACT TGG ACT CTG AGA GGC AGG GTC TT-3', 29mer、配列番号: 40)を上流プライマーとして用い、またv00747に登録されているH-2kb 5R(5'-CAT AGT CCC CTC CTT TTC CAC CTG TGA GAA-3', 30mer、配列番号: 41)を下流プライマーとして用いた。PCRは95 45秒で熱処理した後、95 45秒、68 1分、および72 4分を25サイクル繰り返したのち、72 で10分反応させ、その後4 に冷却した。

増幅遺伝子断片をファージミドベクターpBluescriptの制限酵素BamHIおよびBglII切断部位にライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42 のヒートショック法により大腸菌JM109(東洋紡社製)に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。この形質転換体の5個について3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンを精製し、塩基配列を解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、解析したクローン間のイントロン3領域について比較すると、すべてのクローンで完全に一致していた。これよりイントロン3領域の塩基配列を決定することができた。未登録領域の制限酵素BamHI部位よりv00747までは、463bpであることも判明した。

(3) H-2K^bゲノムDNAの構築

10

20

30

40

50

前記(2)で未登録領域の塩基配列が決定されたことにより、目的とするキメラHLA遺伝子の構築に必要なH-2K^bゲノムDNAの全塩基配列が決定された。その結果、前記(1)で得られた2種類のクローン、すなわち5'末端側にPCR変異の無い1つのクローン(H-2K^b#26)、および3'末端側にPCR変異の無い1つクローン(H-2K^b#20)を組み合わせることにより、目的とするH-2K^bゲノムDNAが構築できることが明らかとなった。そこで、これらクローンを制限酵素消化で切断したのち、PCR変異の無いそれぞれの領域を互いに組み合わせることにより、PCR変異の無いH-2K^bゲノムDNAを構築した。構築方法の模式図を図1に示す。

両クローンを制限酵素Bgl I I部位およびEco R I部位で切断し、ライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。この組み換えプラスミドを42のヒートショック法により大腸菌JM109(東洋紡社製)に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。3個の形質転換体を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンをアルカリ溶解法により精製し、シーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、すべての形質転換体がPCR変異の無いH-2K^bゲノムDNAをコードするプラスミドを含有することが明らかとなった。

なお、ここで得られたH-2K^bゲノムDNAの塩基配列は、後述する配列番号:33に記載の塩基配列の第1551位以降の配列に相当するものである。

参考例3

キメラゲノムDNA(HLA-A2402/K^bDNA)の構築

上記実施例1で得られたHLA-A2402ゲノムDNAを含有するプラスミド(HLA-A2402#1)を制限酵素Bgl I I部位で切断し、また上記実施例2で得られたH-2K^bのゲノムDNAを含有するプラスミド(H-2K^b#20/26)を制限酵素Bam H I部位で切断し、ライゲーションにより連結して組み換えプラスミドを得た。構築方法の模式図を図2に示す。この組み換えプラスミドを42のヒートショック法により大腸菌JM109(東洋紡社製)に導入し、X-GalおよびIPTGを塗布したアンピシリン含有LB寒天培地で組み換えプラスミドが導入されている白色の大腸菌コロニーを判別し、形質転換体を選択した。10個の形質転換体を3mlのアンピシリン含有LB培地にて一晚培養したのち、各形質転換体が包含するプラスミドクローンを精製してシーケンスを解析した。方法は上記と同様にして行った。その結果、3個の形質転換体が目的のキメラ遺伝子(HLA-A2402/K^bDNA、単にA2402/K^bDNAと略することもある)を有するプラスミドを含有することが明らかとなった。構築されたHLA-A2402/K^bのゲノム配列を配列番号:33に記載する。

参考例4

キメラゲノムDNAのスプライシング解析

マウス腫瘍細胞株EL4細胞へ、遺伝子導入装置(島津製作所製)を用い、添付プロトコールに従い、構築したキメラHLA遺伝子(HLA-A2402/K^b遺伝子)をトランスフェクトした。2日後、トランスフェクトしたEL4細胞およびコントロールとして遺伝子導入していないEL4細胞より、ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いて添付のプロトコールに従って、トータルRNAを精製した。次に、スーパースク립トチョイスシステム(GIBCO BRL社製)を用いて、添付プロトコールに従い、当該RNAの一部を鋳型にOligo(dT)₁₂₋₁₈により逆転写反応を行いcDNAを合成した。更に、当該cDNAの一部を鋳型にNative Pfu DNA Polymerase(Stratagene社製)を用い、添付のプロトコールに従い、キメラ遺伝子の特異的にPCR増幅した。

このとき、上流プライマーとしてHLA-A2402遺伝子のエキソン1にコードされ且つH-2K^b遺伝子と相同性の低いChimera-F2(5'-CGA ACC CTC GTC CTG CTA CTC TC-3', 23mer、配列番号:42)を、一方の下流プライマーとしてH-2K^b遺伝子のエキソン8にコードされ且つHLA-A

10

20

30

40

50

2402 遺伝子と相同性が低い Chimer a - R2 (5' - AGC ATA GTC CCC TCC TTT TCC AC - 3', 23mer、配列番号: 43) を用い、PCR は 95 45 秒を熱処理した後、95 45 秒、53 1分、および 72 2分を 40 サイクル繰り返したのち、72 で 10 分反応させ、その後 4 に冷却した。

その結果、トランスフェクトした EL4 細胞においてのみ特異的に約 1.1 kbp 遺伝子断片が増幅したことより、導入したキメラゲノム DNA はマウス細胞内で転写されたこと、すなわち HLA プロモーターが機能し、予想した部位でスプライシングされた mRNA が発現していることが予想された。次に、前記 PCR の増幅断片をシークエンス解析した結果、予想通りの HLA - A2402 / K^b をコードする cDNA の塩基配列が決定された。当該 HLA - A2402 / K^b の cDNA の塩基配列を配列番号: 34 に、またそのアミノ酸配列を配列番号: 35 に記載する。さらに、配列番号: 33 に記載の HLA - A2402 / K^b のゲノム配列と配列番号: 34 に記載の cDNA 配列との位置関係を示したものを、図 3 ~ 図 5 に示す。

10

参考例 5

マイクロインジェクション用 DNA 溶液の製造

構築したキメラ HLA 遺伝子をコードするプラスミド 1 μg を制限酵素 Hind III と Eco RI、更にベクターのみを切断する制限酵素 Dra I で消化した。1% SeaKem GTG (ニッポンジーン社製) ゲルで電気泳動したのち、キメラゲノム DNA を含有するゲル片を回収した。その後、Prep - A - Gene purification キット (バイオ・ラッド社製) を用い、添付プロトコールに従い、導入遺伝子を精製し、1/10 TE バッファー (10 mM Tris pH 8、0.1 mM EDTA pH 8) に溶解することにより、マイクロインジェクション用 DNA 溶液を製造した。

20

参考例 6

マウス受精卵への導入とトランスジェニックマウスの同定

C57BL/6 系統マウス由来の受精卵を対象に構築したキメラ遺伝子のインジェクションを施行した。

C57BL/6 系統マウス由来の受精卵を用いた理由は、C57BL/6 系統マウスはクラス I 分子として H-2b 系統を発現しており、HLA - A2402 と同様な結合モチーフを有する H-2K^d を発現していないことによるものである。すなわち、当該 C57BL/6 系統のトランスジェニックマウスに HLA - A24 拘束性の抗原ペプチドを投与しても、内因性のマウスクラス I によって当該ペプチドが細胞表面に提示されず、交差反応が起こらないという利点を有する。

30

第 1 回目のインジェクションでは、81 個の受精卵を対象に施行し、4 匹のレシピエントマウスに移植したが産出されなかった。第 2 回目のインジェクションでは、50 個の受精卵を対象に施行し、2 匹のレシピエントマウスに移植することにより 4 匹が産出されたが離乳前にすべて死亡した。第 3 回目のインジェクションでは 101 個の受精卵を対象に施行し、4 匹のレシピエントマウスに移植することにより 11 匹が産出されたが離乳前にすべて死亡した。

第 4 回目のインジェクションでは、168 個の受精卵を対象に施行し、6 匹のレシピエントマウスに移植することにより 22 匹が産出され、19 匹が離乳した。その中の 4 匹、すなわち 01 - 4、04 - 2、05 - 1、および 05 - 6 がトランスジェニックマウスとして同定されたが、01 - 4 は奇形のため交配不可能で、05 - 6 は離乳後まもなく死亡した。第 5 回目のインジェクションでは、221 個の受精卵を対象に施行し、8 匹のレシピエントマウスに移植することにより 14 匹が産出され、6 匹が離乳した。その中の 3 匹、すなわち 04 - 1、04 - 5、および 04 - 6 がトランスジェニックマウスとして同定された。第 6 回目のインジェクションでは、225 個の受精卵を対象に施行し、8 匹のレシピエントマウスに移植することにより 13 匹が産出され、9 匹が離乳した。その中の 3 匹、すなわち 10 - 5、14 - 1、および 15 - 2 がトランスジェニックマウスとして同定された。

40

ここでトランスジェニックマウスの同定は、HLA - A2402 遺伝子のクローニングで

50

使用したプライマー、すなわちHLA 26 - 1 F (配列番号: 36) およびA 24 - B g 1 I I 30 (配列番号: 37) を用いて尾DNA調整物を鋳型にT a K a R a L A T a q^{T M} (宝酒造社株式会社製) を用い、添付のプロトコールに従ってPCRを行い、1%アガロースゲル電気泳動を行い、1.5 k b p の大きさのDNAバンドがみられるマウスを選別することにより行った。

参考例 7

トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子産物の発現

実施例6で作出された8ライン、すなわち04 - 2、05 - 1、04 - 1、04 - 5、04 - 6、10 - 5、14 - 1、および15 - 2由来のトランスジェニックマウスより、J . E . C o l i g a n l ら編、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. の記載に従い脾臓を摘出し、脾細胞を回収した。トランスジェニックマウス脾細胞における導入遺伝子由来のタンパク質であるHLA - A 2402 / K^b の細胞表面発現は、フローサイトメトリー法により解析した。このとき、C 57 B L / 6 系統マウスより調整した脾細胞をコントロールとして用いた。具体的には、 5×10^6 個の脾細胞をモノクローナルなFITC標識抗HLA抗体B 9 . 1 2 . 1 (Immunotech社製) で染色した。また、モノクローナルなFITC標識抗H - 2 K^b 抗体A F 6 - 8 8 . 5 (Pharmingen社製) で内因性のマウスクラスIを染色した。

その結果、5ライン、すなわち04 - 1、04 - 5、10 - 5、14 - 1、および15 - 2でHLAクラスI特異的な発現がみられ、このうち04 - 1ラインのみが、繁殖能を有するラインであることが明らかとなった。一方、他の3ライン、すなわち04 - 6、04 - 2、および05 - 1ラインではHLAクラスI特異的な発現はみられなかった。以上により、8ラインのトランスジェニックマウスが作出されたが、クラスIの発現様式であり且つホモ化を達成したのは04 - 1ラインのみであった。

参考例 8

HLA - A 2402 を発現する形質転換細胞の樹立

前記で作製されたトランスジェニックマウスにおけるCTL誘導活性の評価のために、HLA - A 2402 / K^b を安定に発現する形質転換細胞、Jurkat - A 2402 / K^b 細胞を樹立した。

(1) 発現ベクターの構築

Tgマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用い、添付のプロトコールに従って、トータルRNAを精製した。次に、スーパースクリプトチョイスシステム (GIBCO BRL社製) を用いて、添付プロトコールに従い、当該RNAの一部を鋳型にOligo (dT)₁₂₋₁₈ により逆転写反応を行いcDNAを合成した。更に、当該cDNAの一部を鋳型にLA-PCRキット (宝酒造社製) を用い、添付のプロトコールに従った。このとき、上流プライマーとしてchi . PF 1 (5' - CCC AAG CTT CGC CGA GGA TGG CCG TCA TGG CGC CCC GAA - 3'、配列番号: 44) を、一方の下流プライマーとしてchi . PR 1 (5' - CCG GAA TTC TGT CTT CAC GCT AGA GAA TGA GGG TCA TGA AC - 3'、配列番号: 45) を用いた。PCRは95 45秒で熱処理した後、95 45秒、60 1分、および68 2分を25サイクル繰り返したのち、72 10分反応させ、その後4 に冷却した。PCR増幅遺伝子を発現ベクターpcDNA3.1 (+) (Invitrogen社製) に導入することにより、HLA - A 2402 / K^b をコードする発現ベクターを構築した。

(2) Jurkat細胞への導入

10ugの上記ベクターを制限酵素Pvu Iで消化することにより、直線化した。次に、Jurkat細胞(ATCC T1B - 152) 5×10^6 個について、遺伝子導入装置 (GIBCO BRL社製) を用い、添付プロトコールに従い、構築したキメラHLA遺伝子をトランスフェクトした。96穴プレートに0.5 cell / wellで播種し、

0.6 mg/ml の Geneticin 含有培地で培養した。その結果、6 穴中 (6 クローン) にて細胞の増殖が確認された (A-2、A-4、A-6、A-9、A-10、A-11)。これらの中で、A-10 において導入遺伝子の発現が最も高かったことより、当クローンを Jurkat-A2402/K^b 細胞として樹立した。

参考例 9

トランスジェニックマウスにおける CTL 誘導活性試験

ヒト癌抗原 HER-2/neu は乳癌、卵巣癌、および肺癌で過剰発現していることで知られ、当該抗原由来ペプチドによって HLA-A24 陽性健常人末梢血から特異的 CTL を誘導できることが、イン・ビトロ試験により明らかにされている (Int. J. Cancer, 87:553, 2000)。

10

そこで、当該ヒト癌抗原由来の HLA-A24 拘束性ペプチド HER-2/neu₇₈₀₋₇₈₈ (配列番号: 46) を、破傷風毒素由来のマウス MHC クラス II の I-A^b 拘束性ヘルパーペプチド (Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu; 配列番号: 32) と共に当該トランスジェニックマウスに免疫し、ヒトの場合と同様に特異的 CTL を誘導し得るか調べた。すなわち、DMSO により HER-2/neu₇₈₀₋₇₈₈ を 40 mg/ml に、またヘルパーペプチドを 20 mg/ml に調整し、生理食塩水で 2 mg/ml および 1 mg/ml に希釈した。次に、ガラスシリンジを用いて、等量の不完全フロイントアジュバント (和光純薬株式会社製) と混合することにより water-in-oil エマルジョンを作製した。200 μl の当該薬剤をトランスジェニックマウス (04-1 ライン) の尾の皮下に免疫した。実験開始 7 日後に脾臓を摘出し、スライドガラスのフロスト部分にて擦り破壊し、脾細胞を回収・調製した。ACK バッファー (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.2-7.4) にて溶血処理した脾細胞の一部を X 線照射 (2,000 rad) した後、前記ペプチドを 100 μg/ml で 1 時間パルスして 0.7 × 10⁶ 個/well で 24 穴プレートに播種した。このとき、非照射・非ペプチドパルスの 7 × 10⁶ 個/well の脾細胞を同時に加えて 37 °C で再刺激を施行した (ペプチド終濃度 1 μg/ml)。培養液には、RPMI 1640 培地に 10% FCS、10 mM HEPES、20 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、1 mM MEM 非必須アミノ酸、1% MEM ビタミン、55 μM 2-メルカプトエタノールを含む培養液 (CTM 培養液) を 10 ml 用い、6 日間イン・ビトロ刺激した。

20

30

他方、実施例 8 で作製した Jurkat-A2402/K^b 細胞を 3.7 MBq/10⁶ 個で ⁵¹Cr ラベル後、前記ペプチドを 100 μg/ml で 1 時間パルスした。(ラベル時間 2 時間、ラベル開始 1 時間後にペプチドを終濃度 100 μg/ml 添加)。また、ペプチド非パルスの細胞をコントロール標的細胞として調製した。

当該 Jurkat-A2402/K^b を標的細胞とし、先に調製されたトランスジェニックマウス脾細胞調製物を添加して、CTL の誘導活性を ⁵¹Cr リリースアッセイ (J. Immunol., 159:4753, 1997) により測定した。結果を図 6 に示す。結果として、HER-2/neu₇₈₀₋₇₈₈ で刺激することにより、特異的な CTL の誘導が認められた。

40

さらに、前記 HER-2/neu₇₈₀₋₇₈₈ と同様に HLA-A24 拘束性癌抗原ペプチドであることが知られている MAGE-3₁₉₅₋₂₀₃ (配列番号: 47)、CEA₆₅₂₋₆₆₀ (配列番号: 48)、および CEA₂₆₈₋₂₇₇ (配列番号: 49) を用いて、前記と同様の CTL 誘導活性試験を行った。結果を図 7~図 9 に示す。結果として、これら既知の HLA-A24 拘束性癌抗原ペプチドで刺激することにより、特異的な CTL の誘導が認められた。

以上の結果から、本発明の HLA-A24 トランスジェニックマウスは、HLA-A24 拘束性の癌抗原タンパクや癌抗原ペプチドを in vivo で評価することのできるヒトモデル動物であることが明らかとなった。

実施例 1

50

ヒトWT1由来の天然型および改変型ペプチドによるCTL誘導活性

H L A 抗原に結合可能な配列を検索するためのB I M A Sソフト(http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/)を用いて、ヒトWT1アミノ酸配列中のH L A - A 2 4 抗原への推定結合配列を検索した。検索により同定されたペプチドの例を以下に示す。

ペプチドA : Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 8)

ペプチドB : Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 7)

ペプチドC : Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 9)

ペプチドD : Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe (配列番号 : 10)

ペプチドE : Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe (配列番号 : 11)

ここでペプチドAはヒトWT1のアミノ酸配列の第126 - 134位に、ペプチドBは第302 - 310位に、ペプチドCは417 - 425位に、ペプチドDは第285 - 294位に、またペプチドEは第326位 - 335位に、それぞれ該当する配列である。これらのペプチドをFmoc法により合成した。

また、前記天然型ペプチドA ~ Cの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドについてもFmoc法により合成した。

ペプチドF : Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号 : 2)

ペプチドG : Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号 : 3)

ペプチドH : Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号 : 4)

各抗原ペプチドの免疫原性について、先の参考例にて作製したH L A - A 2 4 0 2 / K^bトランスジェニックマウスを利用することにより評価した。1ペプチドにつき3匹のトランスジェニックマウスに免疫することにより、それぞれのペプチドの免疫原性を評価した。

マウスMHCクラスIIのI - A^b拘束性ヘルパーペプチドである破傷風毒素由来ペプチド(Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu ; 配列番号 : 32)と共に各合成ペプチドをトランスジェニックマウスに免疫した。すなわち、DMSOに各抗原ペプチドをそれぞれ40mg/ml、ヘルパーペプチドを20mg/mlに調整し、さらに生理食塩水で2mg/mlおよび1mg/mlにそれぞれ希釈した。次に、ガラスシリンジを用いて、等量のフロイントの不完全アジュバント(IFA)と混合することによりwater - in - oilエマルジョンを作製し、200μlの当該エマルジョンをH L A - A 2 4 0 2 / K^bトランスジェニックマウスの尾底部の皮下に免疫した。実験開始7日後に脾臓を摘出し、スライドガラスのフロスト部分にて擦り破壊し、脾細胞を回収・調製した。ACKバッファー(0.15M NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM EDTA, pH7.2 - 7.4)にて溶血処理した脾細胞の一部をX線照射(2,000rad)した後、前記抗原ペプチドを100μg/mlで1時間パルスして7 × 10⁶個/wellで24穴プレートに播種した。このとき、非照射・非ペプチドパルスの7 × 10⁵個/wellの脾細胞を同時に加えて37°Cで6日間イン・ビトロ刺激培養した。この際の培地として、RPMI - 1640培地に10% FCS、10mM HEPES、20mM L - グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1% MEMビタミン、55μM 2 -メルカプトエタノールを用いた。

次に、常法に従って細胞傷害性試験を行った。標的細胞(T)として、Jurkat - A 2 4 0 2 / K^b細胞(参考例8)、およびペプチドパルスしたJurkat - A 2 4 0 2 / K^b細胞を用いた。これらの細胞は3.7MBq/10⁶個で⁵¹Crラベルし、ペプ

10

20

30

40

50

チドパルスは100 µg/mlで1時間実施された(ラベル時間2時間、ラベル開始1時間後にペプチドを添加)。イン・ビトロ刺激培養した脾細胞をエフェクター細胞(E)とし、E/T比80において作用させ、傷害活性を⁵¹Crリリースアッセイ(J. Immunol., 159:4753, 1997)により測定した。結果を図10~図17に示す。Y軸は傷害活性を示し、X軸の1、2、および3は、3匹のマウスの個体番号を示す。

これらの図から明らかな通り、試験したWT1天然型ペプチド5種類の中では、ペプチドBのみが免疫原性を有していた。また、天然型ペプチドBの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドGは、ペプチドBより高い免疫原性を示した。さらに、天然型ペプチドAおよびCの第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチドFおよびHは、もとのペプチドAおよびCが免疫原性を有していなかったにもかかわらず、高い免疫原性を有していた。

以上の結果から、WT1天然型ペプチドB、改変型ペプチドF、G、およびHは、イン・ビボでCTL誘導活性を有する抗原ペプチドとして機能を有することが明らかとなった。

実施例2

ヒトWT1由来の改変型ペプチドによるCTL誘導活性(II)

実施例1と同様、BIMASソフトにより検索された、HLA-A24抗原への推定結合配列を有するヒトWT1由来の以下の天然型ペプチド(ペプチドK、L)、およびその第2位のアミノ酸をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドI、J)を、Fmoc法により合成した。

ペプチドK: Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号: 51)

ペプチドL: Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号: 52)

ペプチドI: Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号: 5)

ペプチドJ: Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号: 6)

ここでペプチドKはヒトWT1のアミノ酸配列の第10-18位に、またペプチドLは第239位-247位にそれぞれ該当するペプチドであり、さらにペプチドIおよびJはそれぞれペプチドKおよびLの配列中第2位のアミノ酸残基をチロシンに改変した改変型ペプチドである。これらの天然型および改変型ペプチドについて、実施例1と同様にして免疫原性を評価した。結果を図18、19、21および22に示す。Y軸は傷害活性を示し、X軸の1、2、および3は、3匹のマウスの個体番号を示す。

これらの図から明らかな通り、天然型ペプチドKおよびLが免疫原性を有していないにもかかわらず、改変型ペプチドIおよびJは、いずれも高い免疫原性を有することが示された。

以上の結果から、WT1改変型ペプチドIおよびJは、イン・ビボで細胞傷害性T細胞を誘導する抗原ペプチドとして機能を有することが明らかとなった。

実施例3

ヒトWT1由来の改変型ペプチドによる細胞傷害活性

改変型ペプチドによって誘導されたエフェクター細胞の天然型ペプチドに対する交差反応性を試験した。前記改変型ペプチドHをマウスに免疫することにより誘導されたエフェクター細胞(E)と、標的細胞(T)として天然型ペプチドCをパルスしたJurkat-A2402/K^b細胞とを、E/T比80において作用させ、傷害活性を⁵¹Crリリースアッセイにより測定した。結果を図20に示す。この図から明らかな通り、WT1改変型ペプチドで誘導したエフェクター細胞は変異型および天然型をパルスしたいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示した。

実施例4

ヒトWT1由来の改変型ペプチドによるヒト末梢血単核球からのCTL誘導

HLA-A2402陽性の健常人から末梢血単核球を分離し、24ウェルプレートに4 ×

10

20

30

40

50

10⁶細胞/ウェルの量で分配し、これに配列番号7の天然型ペプチドまたは配列番号3の改変型ペプチドを10 μ Mの濃度になるように添加し、1週間培養した。この際の培地として、45%RPMI1640、45%AIV、10%非働化ヒトAB血清、1 \times 非必須アミノ酸、25ng/ml 2-メルカプトエタノール、50mg/mlストレプトマイシン、50U/mlペニシリンを用いた。上記の培養の後、細胞を2 \times 10⁶細胞/ウェルに調製し、レスポンドー(responder)細胞とした。他方、上記と同じ健康人から分離した末梢血単核球に、前記いずれかのペプチド10 μ Mと共に4時間培養してペプチドパルスし、次に30Gyの放射線照射した後、細胞を4 \times 10⁶細胞/ウェルに調製し、スティミュレーター(stimulator)細胞とした。

上記のようにして調製したレスポンドー細胞とスティミュレーター細胞を混合し、更にIL-2を30U/mlの濃度で加えて培養した。同様なレスポンドー細胞に対するスティミュレーター細胞による刺激を1週間ごとに3回実施した。このようにして得られた細胞の細胞傷害性を⁵¹Crリリースアッセイにより測定した。標的細胞(T)として⁵¹Crで標識したHLA-A24陽性のC1R-A*2402細胞(Int. J. Cancer, 81, p387, 1999)に配列番号7の天然型ペプチドをパルスした細胞を用い、上記の通りに配列番号7の天然型ペプチドまたは配列番号3の改変型ペプチドにより刺激した細胞(エフェクター細胞)(E)をE:T比10、20または40において作用させ、細胞傷害活性を測定した。結果を図23に示す。この図から明らかな通り、改変型ペプチドは天然型ペプチドを認識するCTLを誘導することができ、そして天然型よりも優れたCTL誘導活性を示した。また、標的細胞をWT1陽性でHLA-A24陽性の肺癌細胞株REF-LC-AI細胞、WT陽性でHLA-A2402陰性の肺癌細胞株11-18細胞、またはWT1陰性でHLA-A24陽性の肺癌細胞株11-18細胞を用いて、同様に上記のエフェクター細胞の細胞傷害活性を⁵¹Crリリースアッセイにより測定した。結果を図24に示す。改変型ペプチドおよび天然型ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞は、WT1とHLA-A2402が共に陽性のREF-LC-AI細胞のみを特異的に傷害することから、ペプチド刺激によりHLA-A2402拘束性のWT1特異的CTLが誘導されていることが示された。また、改変型ペプチドの方が天然型ペプチドよりも優れたCTL誘導活性を示した。

実施例5

システイン残基置換型ペプチドによるCTL誘導活性

ペプチドH(Arg-Tyr-Pro-Ser-Cys-Gln-Lys-Lys-Phe; 配列番号: 4)は第5位にシステイン残基を有する。当該システイン残基は溶液中で酸化されジスルフィド結合を生じる可能性がある。そこで、第5位のシステイン残基をセリン残基、アラニン残基、または - アミノ酪酸に置換した置換型ペプチド(ペプチドM、N、O)を合成し、それぞれのイン・ピボでの免疫原性を検討した。

ペプチドM: Arg-Tyr-Pro-Ser-Ser-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号: 66)

ペプチドN: Arg-Tyr-Pro-Ser-Ala-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号: 67)

ペプチドO: Arg-Tyr-Pro-Ser-Abu-Gln-Lys-Lys-Phe (配列番号: 68)

これら置換型ペプチドM、NおよびOをFmoc法により合成し、実施例1と同様にして免疫原性を評価した。なお細胞傷害性試験は、イン・ピボロで刺激培養した脾細胞をエフェクター細胞(E)として標的細胞と各種の比率で混合することにより⁵¹Crリリースアッセイ(J. Immunol. 1997; 159: 4753)を実施し、エフェクター細胞の傷害活性を測定することにより行った。結果を図25~28に示す。縦軸は傷害活性を示し、横軸の値はE/T比を示す。

これらの図から明らかな通り、ペプチドHの第5位のシステイン残基を、セリン残基、アラニン残基、あるいは - アミノ酪酸に置換したペプチドM、NおよびOは、置換前のペプチド(ペプチドH)と同等の免疫原性を有していることが示された。

実施例6

システイン残基置換型ペプチドによる細胞傷害活性

置換型ペプチドによって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチドに対する交差反応性を試験した。ペプチドMまたはNをマウスに免疫することにより誘導されたエフェクター細胞（E）に対して、ペプチドMまたはNをパルス、ペプチドHをパルス、あるいはペプチド非パルスのJurkat-A2402/K^b細胞を標的細胞（T）として作用させ、エフェクター細胞の細胞傷害活性を⁵¹Crリリースアッセイにより測定した。結果を図29および30に示す。

この図から明らかな通り、置換型ペプチドで誘導したエフェクター細胞は、置換型ペプチド（ペプチドM、ペプチドN；図中免疫ペプチド）および非置換型ペプチド（ペプチドH）をパルスしたいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示した。

10

産業上の利用の可能性

本発明により、イン・ビボにおいてCTL誘導活性を有するWT1由来のHLA-A24拘束性ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはこれらペプチドやポリヌクレオチドを含む癌ワクチンなどが提供される。本発明の癌ワクチンは多くの癌患者を処置することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama
 Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited

<120> HLA-A24 restricted tumor antigen peptide

<130> 663830

<150> JP 2002-171518
 <151> 2002-6-12

<150> JP 2002-275572
 <151> 2002-9-20

<160> 68

<210> 1
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile	
130 135 140	
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr	
145 150 155 160	
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe	
165 170 175	
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln	10
180 185 190	
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser	
195 200 205	
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp	
210 215 220	
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln	
225 230 235 240	20
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser	
245 250 255	
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu	
260 265 270	
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile	
275 280 285	
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro	30
290 295 300	
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys	
305 310 315 320	
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys	
325 330 335	
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro	
340 345 350	40
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp	
355 360 365	
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln	
370 375 380	

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala 10
 435 440 445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 2

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 3

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

40

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

40

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

 <400> 8
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
10

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

 <400> 9
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
 1 5
20

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide
30

<400> 10
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
40

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

 <400> 11
 Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe
 1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 12
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Phe 10
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide 20

<400> 13
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Trp
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile
1 5

<210> 15
<211> 9 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 15
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 16
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Phe
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 17
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Trp
1 5 30

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 18
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Ile 40
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 19

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Met

1 5

<210> 20

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 20

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Trp

1 5

20

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 21

30

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 22

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Ile

1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 23
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Met 10
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide 20

<400> 24
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Phe
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 25
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Trp
1 5

<210> 26
<211> 9 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 26

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Ile
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

10

<400> 27
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Met
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 28
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Phe
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 29
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Trp
1 5

40

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 30

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Ile

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 31

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Met

1 5

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 32

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

30

<210> 33

<211> 3857

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: The DNA region from position 1 to position 1550 is derived from human, and the DNA region from position 1551 to position 3857 is derived from mouse.

40

<400> 33

aagcttactc tctggcacca aactccatgg gatgattttt cttctagaag agtccaggtg 60
gacaggtaag gaggggagt cagggagtcc agttcagggg cagagattac gggatgaaaa 120
gtgaaaggag agggacgggg cccatgccga gggtttctcc cttgtttctc agacagctct 180
tgggccaaga ttcagggaga cattgagaca gagcgcttgg cacagaagca gaggggtcag 240
ggcgaagtcc cagggcccca ggcgtggctc tcagggctc aggcccccga ggcggtgat 300
ggattgggga gtcccagcct tggggattec ccaactccgc agtttctttt ctccctctcc 360
caacctatgt agggctcttc ttctggata ctacagacgc ggaccagtt ctactccca 420
ttgggtgctg ggtttccaga gaagccaate agtgtcgtcg cggtcgtgt tctaaagtcc 480
gcacgacccc accgggactc agattctccc cagacgccga ggatggccgt catgggcccc 540
cgaaccctcg tctgctact ctcgggggcc ctggccctga ccagacctg ggcaggtgag 600
tgcgggctg ggagggaaac ggcctctgcg gggagaagca aggggcccgc ctggcggggg 660
cgcaagacct gggaagccgc gccgggagga gggtcgggcg ggtctcagcc actcctcgtc 720
cccagctcc cactccatga ggtatttctc cacatccgtg tcccggcccg gccgcgggga 780
gcccccttc atcgccgtgg gctacgtgga cgacacgcag ttcgtgcggt tcgacagcga 840
cgccgcgagc cagaggatgg agccgcgggc gccgtggata gagcaggagg ggccggagta 900
ttgggacgag gagacagggg aagtgaagcc caactcacag actgaccgag agaacctgcg 960
gatcgcgctc cgctactaca accagagcga ggccgggtgag tgaccccggc ccggggcgca 1020
ggtcacgacc cctcatcccc caaggacggg ccgggtcgcc cacagtctcc gggctccgaga 1080
tccaccccga agccgcggga ccccgagacc ctggccccgg gagaggccca ggcgccttaa 1140
cccggtttca ttttcagttt aggccaaaaa tcccccggg ttggtcgggg ccgggcgggg 1200
ctcgggggac tgggctgacc gcggggctcg gcccaggttc tcacaccctc cagatgatgt 1260
ttggctgcca cgtgggctcg gacgggctc tctcccgcg gtaccaccag tacgcctacg 1320
acggcaagga ttacatcgcc ctgaaagagg acctgcgctc ttggaccgcg gcggacatgg 1380
cggctcagat caccaagcgc aagtgggagg cggccatgt ggcggagcag cagagagcct 1440
acctggaggg cacgtgctg gacgggctcc gcagatacct ggagaacggg aaggagacgc 1500
tgcagcgcac gggatccagg ggccacgggg cgccacctg atcgctgta gatcctgtgt 1560
gacacacctg tacctgttcc cccagagtca ggggctggga gtcattttct ctggtacac 1620
acttagtgat ggctgttcc ttggactgac agttaatgtt ggtcagcaag gtgactaaa 1680
tggttgagtc tcaatgggtg caccttcag gatcatacag ccctaatttt aatatgaact 1740
caaacacata ttaattagt tattttccat tccctctcc attctttgac tacctctctc 1800
atgctattga acatcacata aggatggcca tgtttacca atggctcatg tggattccct 1860
cttagcttct gagtcccaaa agaaaatgtg cagtccgtg ctgaggggac cagctctgct 1920
tttggtcact agtgcgatga cagttgaagt gtcaaacaga cacatagttc actgtcatea 1980
ttgatttaac tgagtcttgg gtagatttca gttgtcttg ttaattgtgt gatttcttaa 2040
atcttccaca cagattcccc aaaggccat gtgaccate acagcagacc tgaagataaa 2100
gtcacctga ggtgctgggc cctgggcttc tacctgctg acatcacct gacctggcag 2160
ttgaatgggg aggagctgat ccaggacatg gagcttggg agaccaggcc tgcaggggat 2220
ggaaccttc agaagtgggc atctgtggg gtgcctcttg ggaaggagca gtattacaca 2280
tgccatgtgt accatcaggg gctgcctgag cccctcacc tgagatgggg taaggagagt 2340
gtgggtgcag agctggggctc agggaaagct ggagcttct gcagacctg agctgctcag 2400
ggctgagagc tggggtcatg accctcact ctatttctg tacctgtcct tcccagagcc 2460
tctccatcc actgtctcca acatggcgac cgttgctgtt ctggttctcc ttggagctgc 2520
aatagtcact ggagctgtgg tggctttgt gatgaagatg agaaggagaa acacaggtag 2580
gaaagggcag agtctgagtt ttctctcagc ctctttaga gtgtgctctg ctcatcaatg 2640
gggaacacag gcacacccca cattgctact gtctetaact gggctctgctg tcagttctgg 2700
gaacttcta gtgtcaagat cttctggaa ctctcagac ttttctctc acaggtggaa 2760
aaggagggga ctatgctctg gctccaggtt agtgtgggga cagagttgtc ctggggacat 2820
tggagtgaag ttggagatga tgggagctct gggaatccat aatagctcct ccagagaaat 2880

10

20

30

40

```

cttctagggtg cctgagttgt gccatgaaat gaatatgtac atgtacatat gcatatacat 2940
ttgttttgtt ttaccetagg ctcccagacc tctgatctgt ctctcccaga ttgtaaaggt 3000
gacactctag ggtctgattg gggaggggca atgtggacat gattgggttt caggaactcc 3060
cagaatcccc tgtgagttag tgatgggttg ttcgaatgtt gtcttcacag tgatggttca 3120
tgacctcat tctctagcgt gaagacagct gcttgaggag gacttgggtga cagacaatgt 3180
cttctcatat ctctgtgac atccagagcc ctctcagttctc tttagtcaag tgtctgatgt 3240
tccctgtgag cctatggact caatgtgaag aactgtggag cccagtccac ccctctacac 3300
caggaccctg tccctgcact gctctgtctt cccttcaca gccaaccttg ctggttcage 3360
caaacactga gggacatctg tagcctgtca gctccatgct accctgacct gcaactctc 3420
acttccacac tgagaataat aatttgaatg taaccttgat tgttatcacc ttgacctagg 3480
gctgatttct tgtaatttc atggattgag aatgctttaga ggttttggtt gtttggttga 3540
ttgatttgtt tttttgaaga aataaatgat agatgaataa acttccagaa tctgggtcac 3600
tatgctgigt gtatctgttg ggacaggatg agactgttagc agctgagtgt gaacagggtc 3660
gtgccagggt gggtcagtt tgctttgatc tgtgatgggg ccacacctcc actgtgtcac 3720
ctctgggctc tgttccctct atcactatga ggcacatgct gagagtttgt ggtcacaaag 3780
acacagggaa ggctgagcc ttgcctgtc cccaggatta tgagcccca gggctaaaga 3840
tcagagactc ggaattc 3857

```

10

<210> 34

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: The DNA region from position 1 to position 618 is derived from human, and the DNA region from position 619 to position 1119 is derived from mouse.

<400> 34

```

atg gcc gtc atg gcg ccc cga acc ctc gtc ctg cta ctc tcg ggg gcc 48
Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
          5                10                15

```

```

ctg gcc ctg acc cag acc tgg gca ggc tcc cac tcc atg agg tat ttc 96
Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
          20                25                30

```

30

```

tcc aca tcc gtg tcc cgg ecc ggc cgc ggg gag ecc cgc ttc atc gcc 144
Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
          35                40                45

```

```

gtg ggc tac gtg gac gac acg cag ttc gtg cgg ttc gac agc gac gcc 192
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
          50                55                60

```

40

```

gcg agc cag agg atg gag ccg cgg gcg ccg tgg ata gag cag gag ggg 240
Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly

```

65	70	75	80		
ccg gag tat tgg gac gag gag aca ggg aaa gtg aag gcc cac tca cag				288	
Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln					
	85	90	95		
act gac cga gag aac ctg cgg atc gcg ctc cgc tac tac aac cag agc				336	
Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser					
	100	105	110		
gag gcc ggt tct cac acc ctc cag atg atg ttt ggc tgc gac gtg ggg				384	10
Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly					
	115	120	125		
tcg gac ggg cgc ttc ctc cgc ggg tac cac cag tac gcc tac gac ggc				432	
Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly					
	130	135	140		
aag gat tac atc gcc ctg aaa gag gac ctg cgc tet tgg acc gcg gcg				480	
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala					20
	145	150	155	160	
gac atg gcg gct cag atc acc aag cgc aag tgg gag gcg gcc cat gtg				528	
Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val					
	165	170	175		
gcg gag cag cag aga gcc tac ctg gag ggc acg tgc gtg gac ggg ctc				576	
Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu					
	180	185	190		
cgc aga tac ctg gag aac ggg aag gag acg ctg cag cgc acg gat tcc				624	30
Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ser					
	195	200	205		
cca aag gcc cat gtg acc cat cac agc aga cct gaa gat aaa gtc acc				672	
Pro Lys Ala His Val Thr His His Ser Arg Pro Glu Asp Lys Val Thr					
	210	215	220		
ctg agg tgc tgg gcc ctg ggc ttc tac cct gct gac atc acc ctg acc				720	
Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr					40
	225	230	235	240	
tgg cag ttg aat ggg gag gag ctg atc cag gac atg gag ctt gtg gag				768	
Trp Gln Leu Asn Gly Glu Glu Leu Ile Gln Asp Met Glu Leu Val Glu					
	245	250	255		
acc agg cct gca ggg gat gga acc ttc cag aag tgg gca tct gtg gtg				816	
Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val					

260	265	270		
gtg cct ctt ggg aag gag cag tat tac aca tgc cat gtg tac cat cag			864	
Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Tyr Tyr Thr Cys His Val Tyr His Gln				
275	280	285		
ggg ctg cct gag ccc ctc acc ctg aga tgg gag cct cct cca tcc act			912	
Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Thr				
290	295	300		
gtc tcc aac atg gcg acc gtt gct gtt ctg gtt gtc ctt gga gct gca			960	10
Val Ser Asn Met Ala Thr Val Ala Val Leu Val Val Leu Gly Ala Ala				
305	310	315	320	
ata gtc act gga gct gtg gtg gct ttt gtg atg aag atg aga agg aga			1008	
Ile Val Thr Gly Ala Val Val Ala Phe Val Met Lys Met Arg Arg Arg				
325	330	335		
aac aca ggt gga aaa gga ggg gac tat gct ctg gct cca ggc tcc cag			1056	
Asn Thr Gly Gly Lys Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Ala Pro Gly Ser Gln				
340	345	350		
acc tct gat ctg tct ctc cca gat tgt aaa gtg atg gtt cat gac cct			1104	20
Thr Ser Asp Leu Ser Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro				
355	360	365		
cat tct cta gcg tga			1119	
His Ser Leu Ala				
370				
<210> 35				
<211> 372				
<212> PRT				30
<213> Artificial Sequence				
<220>				
<223> Description of Artificial Sequence: The polypeptide region from position 1 to position 206 is derived from human, and the polypeptide region from position 207 to position 372 is derived from mouse.				
<400> 35				
Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala				
5	10	15		
Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe				40
20	25	30		

Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Thr
 290 295 300

Val Ser Asn Met Ala Thr Val Ala Val Leu Val Val Leu Gly Ala Ala
 305 310 315 320

Ile Val Thr Gly Ala Val Val Ala Phe Val Met Lys Met Arg Arg Arg
 325 330 335

Asn Thr Gly Gly Lys Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Ala Pro Gly Ser Gln 10
 340 345 350

Thr Ser Asp Leu Ser Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro
 355 360 365

His Ser Leu Ala
 370

<210> 36 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 36 36
 cccaagctta ctctctggca ccaaactcca tgggat
 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 37 30 40
 cgggagatct acaggcgatc aggtaggcgc

<210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 38

cgcaggctct cacactattc aggtgatctc

30

<210> 39

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 39

cggaattccg agtctctgat ctttagccct gggggctc

38

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 40

aggacttgga ctctgagagg cagggtctt

29

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 41

catagtcccc tccttttcca cctgtgagaa

30

40

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 42
 cgaaccctcg tctgetact etc 23

<210> 43
 <211> 23
 <212> DNA 10
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 43
 agcatagtcc cctccttttc cac 23

<210> 44
 <211> 39 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 44
 cccaagcttc gccgaggatg gccgtcatgg cgccccgaa 39

<210> 45
 <211> 41 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 45
 ccggaattct gtcttcacgc tagagaatga gggcatgaa c 41 40

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 46

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 47

Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile
5

20

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 48

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
5

30

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

40

<400> 49

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe
5 10

<210> 50

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 50

Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

10

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 51

Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

20

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 52

Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
 1 5

30

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 53

40

Arg Phe Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide 10

<400> 54
Arg Trp Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 55
Arg Phe Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 56
Arg Met Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
1 5 40

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 57

Arg Trp Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1 5

<210> 58

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 58

Arg Phe Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1 5

20

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 59

Arg Met Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1 5

30

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

40

<400> 60

Ala Phe Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1 5

<210> 61

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 61
Ala Met Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 62
Ala Trp Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

20

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

30

<400> 63
Asn Phe Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 64
Asn Met Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide 10

<400> 65
Asn Trp Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 66
Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe
1 5

<210> 67
<211> 9 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 67
Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe
1 5 40

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<223> Xaa at position 5 stands for Abu.

<400> 68

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe

1

5

【図面の簡単な説明】

- 図1は、本発明のキメラ遺伝子（HLA-A2402/K^b遺伝子）の作製に用いたH-2K^bゲノムDNAの構築方法を示す模式図である。 10
- 図2は、本発明のキメラ遺伝子であるHLA-A2402/K^b遺伝子の構築方法を示す模式図である。
- 図3は、配列番号：33に記載のHLA-A2402/K^bゲノム配列の第1位～第1300位までと、配列番号：34に記載のHLA-A2402/K^bcDNA配列の第1位～第407位までの位置関係を示したものである。
- 図4は、配列番号：33に記載のHLA-A2402/K^bゲノム配列の第1301位～第2600位までと、配列番号：34に記載のHLA-A2402/K^bcDNA配列の第408位～第1015位までの位置関係を示したものである。
- 図5は、配列番号：33に記載のHLA-A2402/K^bゲノム配列の第2601位～第3857位までと、配列番号：34に記載のHLA-A2402/K^bcDNA配列の第1016位～第1119位までの位置関係を示したものである。 20
- 図6は、HER-2/neu由来抗原ペプチド（HER2/neu₇₈₀₋₇₈₈）で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害性活性（% Specific Lysis）を、また横軸は各トランスジェニックマウスの名称を示す。また図中、pep+はペプチドパルスした標的細胞を用いた結果を、pep-はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。
- 図7は、MAGE-3由来抗原ペプチド（MAGE-3₁₉₅₋₂₀₃）で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。 30
- 図8は、CEA由来抗原ペプチド（CEA₆₅₂₋₆₆₀）で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。
- 図9は、CEA由来抗原ペプチド（CEA₂₆₈₋₂₇₇）で本発明のHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。
- 図10は、ヒトWT1由来抗原ペプチドA（WT1₁₂₆₋₁₃₄）でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。
- 図11は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB（WT1₃₀₂₋₃₁₀）でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。 40
- 図12は、ヒトWT1由来抗原ペプチドC（WT1₄₁₇₋₄₂₅）でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。
- 図13は、ヒトWT1由来抗原ペプチドD（WT1₂₈₅₋₂₉₄）でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。
- 図14は、ヒトWT1由来抗原ペプチドE（WT1₃₂₆₋₃₃₅）でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフ 50

である。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図15は、ヒトWT1由来抗原ペプチドA (WT1₁₂₆₋₁₃₄)の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドF)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図16は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1₃₀₂₋₃₁₀)の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドG)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図17は、ヒトWT1由来抗原ペプチドC (WT1₄₁₇₋₄₂₅)の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドH)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図18は、ヒトWT1由来抗原ペプチドK (WT1₁₀₋₁₈)の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドI)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図19は、ヒトWT1由来抗原ペプチドL (WT1₂₃₉₋₂₄₇)の第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドJ)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図20は、改変型ペプチドHによって誘導されたエフェクター細胞の天然型ペプチドに対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸はCTL誘導活性(% Specific Lysis)を、また横軸は各トランスジェニックマウスの名称を示す。また図中、白棒は改変型ペプチド(ペプチドH)をパルスした標的細胞を用いた結果を、点線棒は天然型ペプチド(ペプチドC)をパルスした標的細胞を用いた結果を、また黒棒はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図21は、ヒトWT1由来抗原ペプチドK (WT1₁₀₋₁₈)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図22は、ヒトWT1由来抗原ペプチドL (WT1₂₃₉₋₂₄₇)でHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されないことを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、白棒および黒棒は、図6におけると同義である。

図23は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1₃₀₂₋₃₁₀)、またはそのペプチドの第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドG)でHLA-A2402陽性の健常人末梢血単核球を*in vitro*で刺激してCTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害活性を、また横軸はエフェクター細胞(E)とターゲット細胞(T)の比率E/Tを示す。黒丸は多重改変ペプチド、黒三角は天然型ペプチドで刺激したエフェクター細胞による細胞傷害活性を示す。

図24は、ヒトWT1由来抗原ペプチドB (WT1₃₀₂₋₃₁₀)、またはそのペプチドの第2位をチロシンに改変した改変型ペプチド(ペプチドG)でHLA-A2402陽性の健常人末梢血単核球を*in vitro*で刺激してCTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は細胞傷害活性を、また横軸はエフェクター細胞(E)とターゲット細胞(T)の比率E/Tを示す。多重改変ペプチドで誘導されたエフェクター細胞のRERF-LC-AI細胞に対する傷害性を黒丸、LK87細胞に対する傷害性を黒三角、11-18細胞に対する傷害性を黒四角で示す。天然型ペプチドで誘導されたエフェクター細胞のRERF-LC-AI細胞に対する傷害性を中空丸、LK87細胞に対する傷害性を中空三角、11-18細胞に対する傷害性を中空四角で示す。

図25は、ペプチドHでHLA-A24発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的CTLが誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸は傷害活性(% Specific

10

20

30

40

50

f i c L y s i s) を示し、横軸は E / T 比を示す。また黒丸はペプチド H (免疫ペプチド) をパルスした標的細胞を用いた結果を、白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図 26 は、ペプチド M で H L A - A 24 発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的 C T L が誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 25 におけると同義である。

図 27 は、ペプチド N で H L A - A 24 発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的 C T L が誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 25 におけると同義である。

図 28 は、ペプチド O で H L A - A 24 発現トランスジェニックマウスを免疫し、特異的 C T L が誘導されることを示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸および白丸は図 25 におけると同義である。

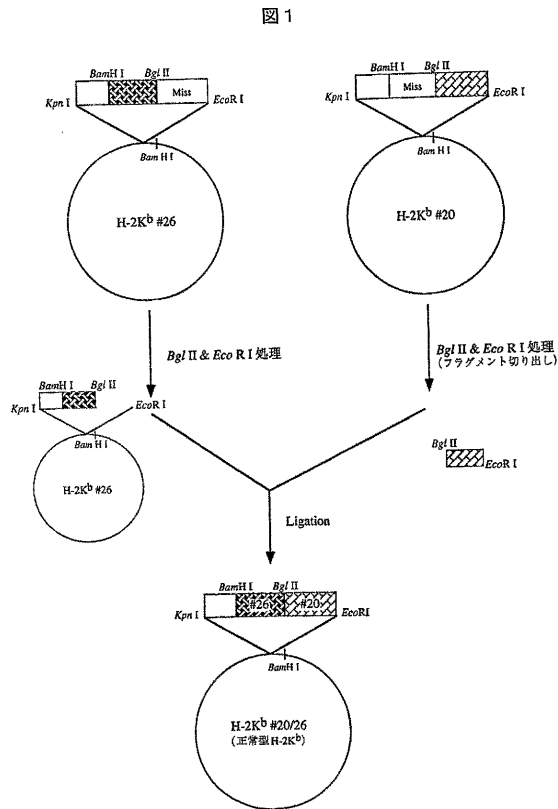
図 29 は、置換型ペプチド M によって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチド H に対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸は C T L 誘導活性 (% S p e c i f i c L y s i s) を、また横軸は E / T 比を示す。また図中、黒丸はペプチド M (免疫ペプチド) をパルスした標的細胞を用いた結果を、黒四角はペプチド H をパルスした標的細胞を用いた結果を、また白丸はペプチド非パルス細胞を用いた結果を示す。

図 30 は、置換型ペプチド N によって誘導されたエフェクター細胞の非置換型ペプチド H に対する交差反応性を試験した結果を示したグラフである。図中、縦軸、横軸、黒丸、黒四角および白丸は図 29 におけると同義である。

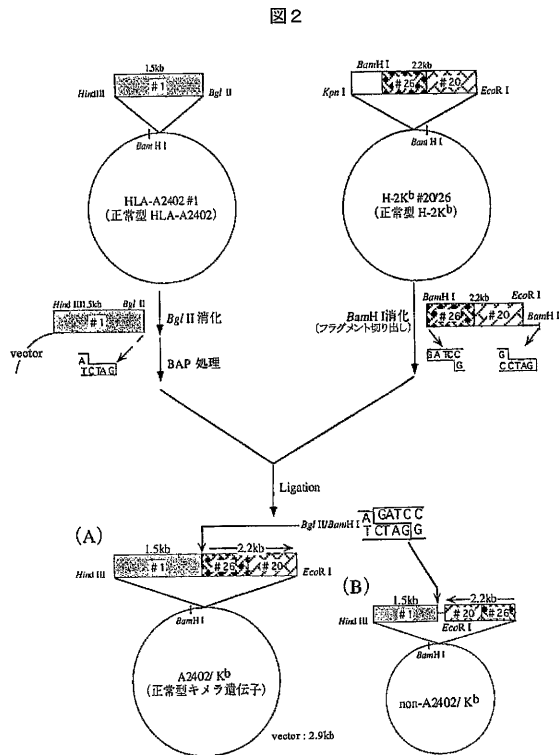
10

20

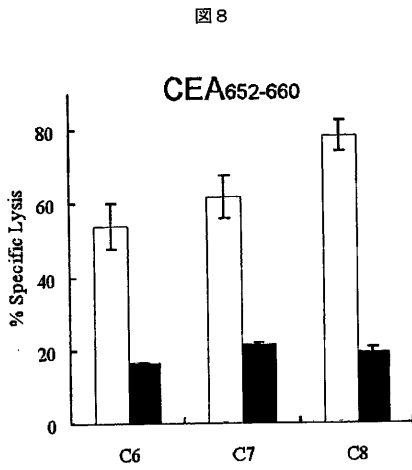
【 図 1 】



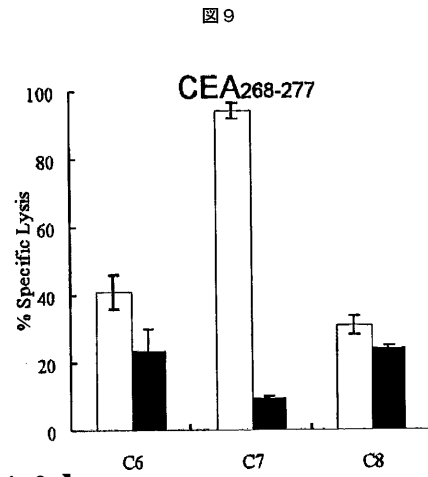
【 図 2 】



【 図 8 】

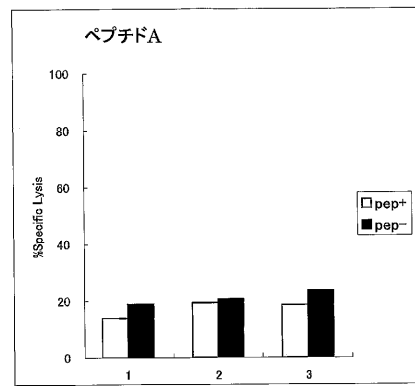


【 図 9 】



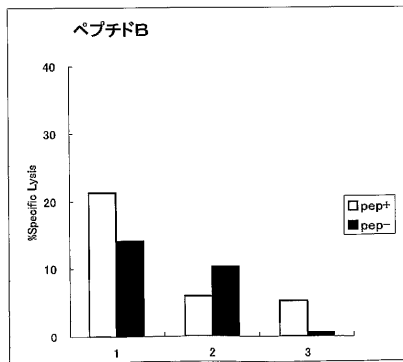
【 図 10 】

図 10



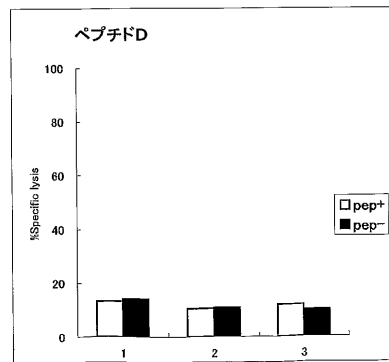
【 図 11 】

図 11



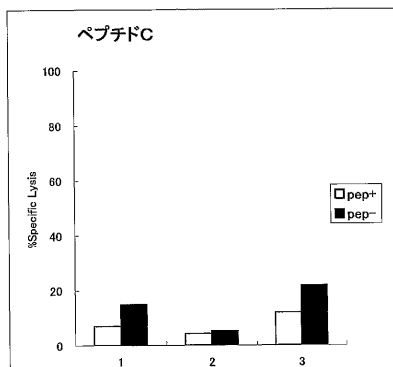
【 図 13 】

図 13



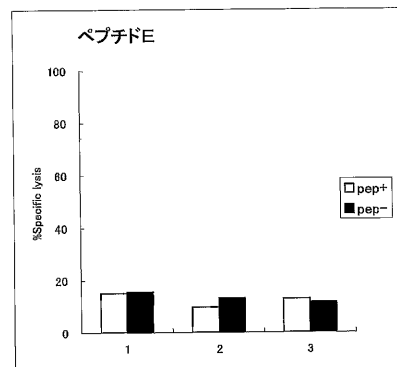
【 図 12 】

図 12



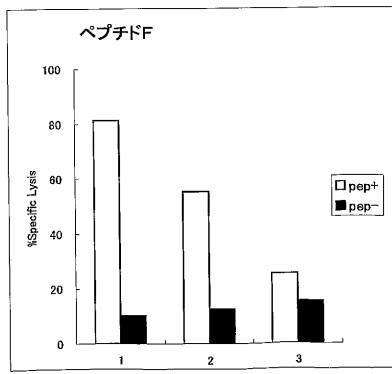
【 図 14 】

図 14



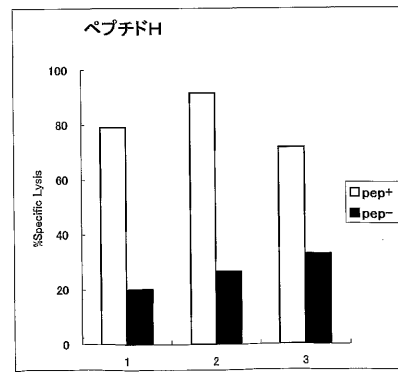
【 図 15 】

図 15



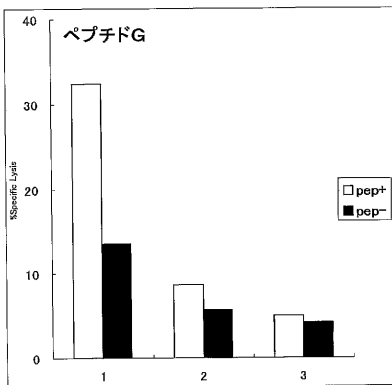
【 図 17 】

図 17



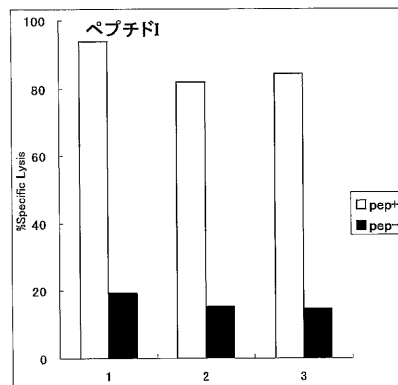
【 図 16 】

図 16



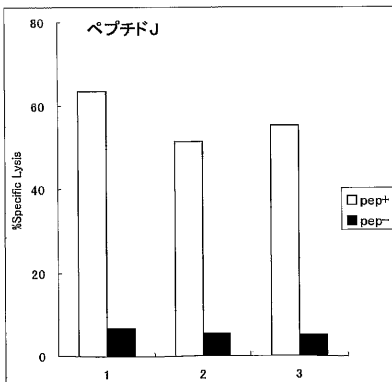
【 図 18 】

図 18



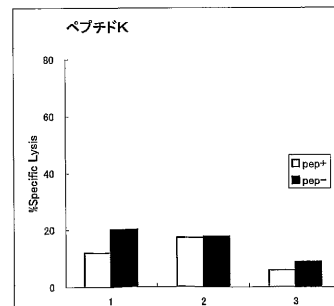
【 図 19 】

図 19



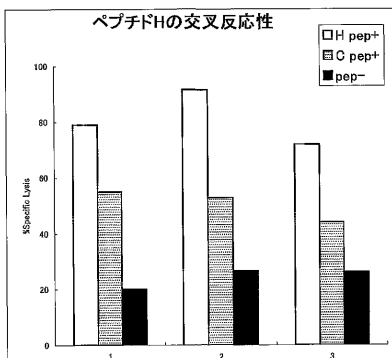
【 図 21 】

図 21



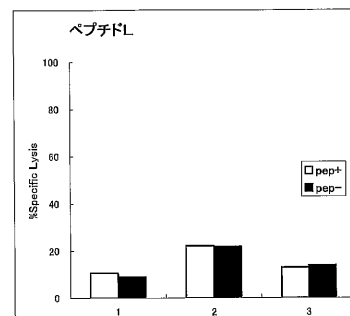
【 図 20 】

図 20



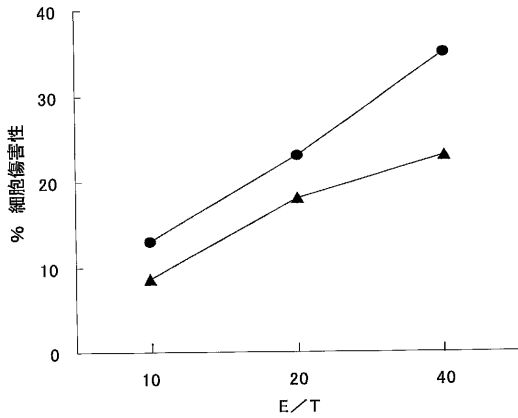
【 図 22 】

図 22



【 図 2 3 】

図 2 3

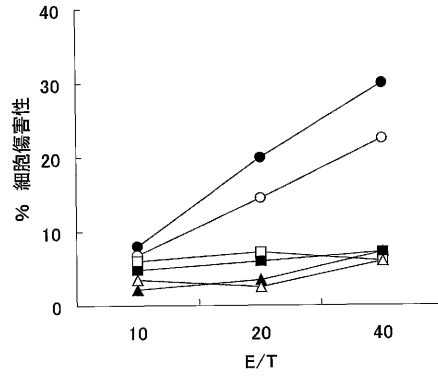


● 多重改変型ペプチド刺激エフェクター細胞
天然型ペプチドパルスC1R-A*2402標的細胞

▲ 天然型ペプチド刺激エフェクター細胞
天然型ペプチドパルスC1R-A*2402標的細胞

【 図 2 4 】

図 2 4



● エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激
標的細胞: RERF-LC-AI細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陽性)

▲ エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激
標的細胞: LK87細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陰性)

■ エフェクター細胞: 多重改変型ペプチド刺激
標的細胞: 11-18細胞 (WT1陰性、HLA-A2402陽性)

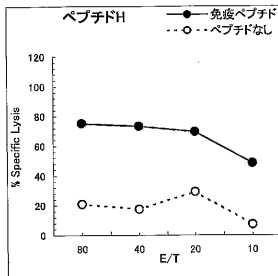
○ エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激
標的細胞: RERF-LC-AI細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陽性)

△ エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激
標的細胞: LK87細胞 (WT1陽性、HLA-A2402陰性)

□ エフェクター細胞: 天然型ペプチド刺激
標的細胞: 11-18細胞 (WT1陰性、HLA-A2402陽性)

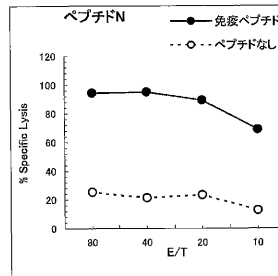
【 図 2 5 】

図 2 5



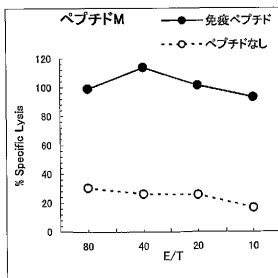
【 図 2 7 】

図 2 7



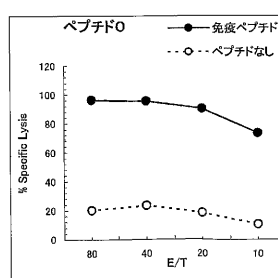
【 図 2 6 】

図 2 6



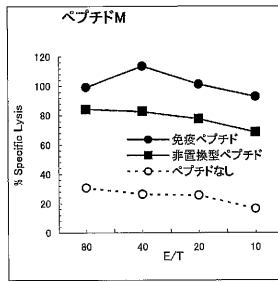
【 図 2 8 】

図 2 8



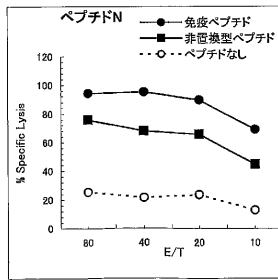
【 図 2 9 】

図 2 9



【 図 3 0 】

図 3 0



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	14/82 (2006.01)	C 0 7 K	14/82
C 0 7 K	16/32 (2006.01)	C 0 7 K	16/32
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 B
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
		C 1 2 P	21/02 C

(74)代理人 100103230

弁理士 高山 裕貢

(74)代理人 100087114

弁理士 齋藤 みの里

(72)発明者 杉山 治夫

大阪府箕面市船場西2-19-30

(72)発明者 後藤 正志

大阪府高槻市宮野町9-12-505

(72)発明者 高須 秀夫

兵庫県西宮市樋之池町15-17-502

審査官 富士 良宏

(56)参考文献 国際公開第00/018795(WO, A1)

AZUMA T., BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, 2002年 3月, V116 N3, P601-603

OHMINAMI H., BLOOD, 2000年 1月, V95 N1, P286-292

OKA Y. et al., Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene(WT1) product, Immunogenetics, 2000年, Vol.51, No.2, pages 99-107

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-90

C07K

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

REGISTRY(STN)