(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508840
(P2025-508840A)
(43)公表日　令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　9/78　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	9/78		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/55　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/55		４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ａ６１Ｋ　39/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｋ　39/39　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/39		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全52頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-550216(P2024-550216)
(86)(22)出願日　令和5年2月23日(2023.2.23)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月18日(2024.10.18)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/054568
(87)国際公開番号　WO2023/161346
(87)国際公開日　令和5年8月31日(2023.8.31)
(31)優先権主張番号　2202547.2
(32)優先日　令和4年2月24日(2022.2.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2213372.2
(32)優先日　令和4年9月13日(2022.9.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　518289427
アイオー バイオテック エーピーエス
ＩＯ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＡｐＳ
デンマーク国 ２２００ コペンハーゲン エヌ オーレ マーロース ヴァイ ３
Ｏｌｅ Ｍａａｌｏｅｓ Ｖｅｊ ３， ２２００ Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ Ｎ， Ｄｅｎｍａｒｋ
(74)代理人　110002572
弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者　アンデルセン，マッズ ハルド
デンマーク国 ２８５０ ネールム，ヘグンスヴェイ ５４

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AC14 BB19
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アルギナーゼ２ワクチン

(57)【要約】
本発明は、アルギナーゼ２（ＡＲＧ２）に由来する新規のポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む組成物に関する。また、本発明は、前記ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は組成物の使用に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１９の９～１９個の連続したアミノ酸の配列を含む又はそれからなるヒトアルギナーゼ２（ＡＲＧ２；配列番号１９）の免疫原性断片であり、ただし、前記断片は配列番号１９のアミノ酸２～３４又は１８０～２２９を含まない、ポリペプチド。
【請求項２】
ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩ拘束性エピトープを含む又はそれからなる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
ＨＬＡ－Ｂ８拘束性エピトープを含む又はそれからなる、請求項１又は２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４】
ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を刺激することができ、場合により、前記ＣＤ８$^{+}$陽性Ｔ細胞は細胞傷害性Ｔ細胞であり、及び／又はＡＲＧ２特異的である、請求項１～３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５】
アミノ酸配列：ＮＬＩＶＮＰＲＳＶ（配列番号５）を含む又はそれからなる、請求項１～４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項６】
ＨＬＡクラスＩＩ拘束性エピトープを含む又はそれからなる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項７】
ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞を刺激することができる、請求項１又は６に記載のポリペプチド。
【請求項８】
アミノ酸配列：ＧＬＬＳＡＬＤＬＶ（配列番号１４）を含む又はそれからなる、請求項１、６又は７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９】
９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８又は１９アミノ酸の最大長を有し、及び／又はＣ末端アミノ酸が対応するアミドに置き換えられている、請求項１～８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
場合によりベクター内に含まれる、請求項１～９のいずれか一項に定義されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
【請求項１１】
請求項１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド及び／又は請求項１０に記載のポリヌクレオチド、及び場合によりアジュバントを含む、組成物。
【請求項１２】
ａ．少なくとも１つの請求項１～９のいずれか一項に記載の異なるポリペプチド、少なくとも１つの請求項１０に記載の異なるポリヌクレオチド；及び／又は少なくとも１つの薬学上許容可能な希釈剤、担体もしくは保存剤；ならびに／あるいは
ｂ．細菌ＤＮＡベースのアジュバント、油／界面活性剤ベースのアジュバント、ウイルスｄｓＲＮＡベースのアジュバント、イミダゾキノリン、及びモンタニドＩＳＡアジュバントからなる群から選択されるアジュバント
を含む、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
対象における疾患又は病態を治療又は予防する方法であって、請求項１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項１０に記載のポリヌクレオチド及び／又は請求項１１もしくは１２に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。
【請求項１４】
ａ．前記疾患又は病態が、ＡＲＧ２の不適当なもしくは過剰な免疫抑制機能を少なくと

も部分的に特徴とし、場合により、前記ＡＲＧ２の過剰な免疫抑制機能が、ＡＲＧ２を発現する活性化Ｔｒｅｇ細胞及び／又はＡＲＧ２を発現する癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）によって少なくとも部分的に媒介され；ならびに／あるいは
ｂ．前記疾患又は病態が癌であり、場合により、前記癌は、黒色腫（悪性転移性黒色腫など）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、又は膵臓癌である、
請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記疾患又は病態が癌であり、場合により、前記方法が、前記対象へのさらなる癌療法の同時投与又は逐次投与をさらに含み、場合により、前記さらなる癌療法が免疫系チェックポイント阻害剤、好ましくは、抗体、より好ましくは、抗ＰＤ１抗体である、請求項１３又は１４に記載の方法。
【請求項１６】
ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を刺激する方法であって、前記細胞を請求項１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項１１もしくは１２に記載の組成物と接触させることを含み、場合により、
ａ．前記細胞が健常対象又は癌患者から採取されたサンプル、場合により、腫瘍サンプル中に存在し；及び／又は
ｂ．ＡＲＧ－２特異的Ｔ細胞がＣＤ８$^+$陽性Ｔ細胞、好ましくは、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞である、
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、アルギナーゼ２（ＡＲＧ２）に由来する新規なポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び、前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む組成物に関する。また、本発明は、前記ポリペプチド、ポリヌクレオチド及び組成物の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
アルギナーゼは、アミノ酸Ｌ－アルギニンをＬ－オルニチン及び尿素に変換する反応を触媒する酵素である。これは、アルギニンの微小環境を枯渇させ、腫瘍特異的細胞傷害性Ｔ細胞応答の抑制をもたらす。アルギナーゼ活性の増大が、例えば、乳癌、肺癌、結腸癌又は前立腺癌を有する患者の癌細胞において検出されている。ラットアルギナーゼ遺伝子をトランスフェクトしたマウスマクロファージは、共培養された腫瘍細胞の増殖を促進することが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏの両方で示されている。さらに、マクロファージによるアルギナーゼ発現の誘導は、ポリアミン合成を介した腫瘍血管新生を増大させることが示されている。マウス肺癌モデルの結果から、高レベルのアルギナーゼを発現する成熟腫瘍関連骨髄性細胞の亜集団が存在したことが示された。これらの腫瘍関連骨髄性細胞は、細胞外Ｌ－アルギニンを枯渇させ、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の抗原特異的増殖を阻害した。アルギナーゼ阻害剤の注入により、マウスにおける肺癌の成長が遮断された。これは、腫瘍細胞及び腫瘍関連骨髄性細胞におけるアルギナーゼ発現の誘導が、ＴＩＬに対する負の効果を介した抗腫瘍免疫応答の抑制によって、どのように腫瘍成長を促進し得るかを示すものである。
【０００３】
ＭＤＳＣ（骨髄由来免疫抑制細胞）は、エフェクターＴ細胞及びナチュラルキラー細胞の活性化、増殖、及び細胞傷害性を阻害するとともに、Ｔｒｅｇの分化及び増殖を誘導する。癌細胞及びＭＤＳＣの両方とも、酵素の一酸化窒素合成酵素（ＮＯＳ）及びアルギナーゼを介したＬ－アルギニン代謝を操作することによって、Ｔ細胞を抑制し得る。多くの

腫瘍は、アルギナーゼ及び誘導性ＮＯＳ（ｉＮＯＳ）の発現の亢進を示し、腫瘍微小環境からのアルギニン枯渇をもたらす。いくつかの研究が、腫瘍特異的Ｔ細胞応答の抑制におけるこの変化した腫瘍アルギニン代謝の重要性を強調しており、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）芽球がＴ細胞増殖及び造血幹細胞を阻害するアルギナーゼ依存的能力を示すことが、最近実証された。さらに、アルギナーゼ及びｉＮＯＳ阻害剤は、ＡＭＬの抑制活性を低減させる。

【０００４】

哺乳動物において、２つのアルギナーゼアイソエンザイム：アルギナーゼ１及びアルギナーゼ２が存在する。この２つのアイソエンザイムは、同じ生化学的反応を触媒するが（よって、酵素アッセイにより区別することができない）、細胞発現、調節及び細胞内局在において異なっている。

【発明の概要】

【０００５】

本発明者らは、免疫原性に関する「ホットスポット」であるアルギナーゼ１（ＡＲＧ１）及びアルギナーゼ２（ＡＲＧ２）の５０アミノ酸領域を以前に同定した。この領域は、全長ヒトＡＲＧ１（配列番号２０）の１６１～２１０位もしくは全長ヒトＡＲＧ２（配列番号１９）の１８０～２２９位、又は又はマウスアルギナーゼの対応する位置に相当する。この領域及びそれに由来するペプチドは、ＷＯ２０１８／０６５５６３に記載されている。

【０００６】

本発明者らはまた、ＡＲＧ１の「ホットスポット」領域に由来するポリペプチドの特異的なサブセットが、免疫応答を刺激するのに特に有効であることを同定した。これらのペプチドは、全長ヒトＡＲＧ１の１６９～２０６位、全長ヒトＡＲＧ１の１６９～２００位又は全長ヒトＡＲＧ１の１６９～２１０位（又はヒトＡＲＧ２もしくはマウスＡＲＧ１の対応する位置）に相当する。ポリペプチドのこのサブセットは、ＷＯ　２０２０／０６４７４４において記載されている。

【０００７】

本発明者らはさらに、ヒトＡＲＧ２の全く異なる領域に由来するポリペプチドが免疫応答を刺激するのに特に有効であるということを同定した。この領域は、ヒトＡＲＧ２のトランジットペプチドのＣ末端（配列番号１９の２２位）にわたる。これらのペプチドは、ＷＯ　２０２０／０９９５８２に記載され、Ａ２Ｌ２と呼ばれる免疫原性ペプチドを含み、ヒトＡＲＧ２の２～３４位（配列番号１６）に相当する。

【０００８】

本発明者らは今回、ＡＲＧ２由来のさらなる免疫原性ポリペプチドを同定した。意外にも、本発明のポリペプチドは、「ホットスポット」領域（すなわち、ヒトＡＲＧ２のアミノ酸１８０～２２９）にもＡ２Ｌ２領域（すなわち、ＡＲＧ２のアミノ酸２～３４）にも位置しない。本発明のポリペプチドは、癌細胞（例えば、黒色腫細胞）を溶解することができる細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を含め、ＣＤ８$^{+}$又はＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞を刺激するために有利に使用することができる。

【０００９】

特に、これまでに観察された免疫原性ＡＲＧ２ポリペプチドに対する免疫原性応答は全てＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞応答であった。しかしながら、ＣＤ４$^{+}$エピトープ及びＣＤ８$^{+}$エピトープの同時活性化は、腫瘍に対して強力な相乗作用的保護をもたらすことが観察されている。したがって、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞などのＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を刺激することができる本発明のポリペプチドは、特に有利である。

【００１０】

本発明のポリペプチドを用いて生成されたＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は、ＡＲＧ２発現が高い活性化制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を特異的に認識し、それらと反応することができる。よって、本発明のポリペプチドは、免疫抑制腫瘍微小環境の調整に有用性を有する。

【００１１】

本発明は、配列番号１９の９～１９個の連続したアミノ酸の配列を含む又はそれからなるヒトアルギナーゼ２（ＡＲＧ２；配列番号１９）の免疫原性断片であるポリペプチドを提供し、ただし、前記断片は、以下のいずれか１つの配列を含まない。
配列番号１９のアミノ酸２～３４；
配列番号１９のアミノ酸１８０～２２９；
配列番号１９のアミノ酸１２９～１４１；
配列番号１９のアミノ酸１４４～１５６；又は
配列番号１９のアミノ酸２３７～２４９。

【００１２】

本ポリペプチドは、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩ拘束性エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。本ポリペプチドは、ＨＬＡ－Ｂ８拘束性エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。本ポリペプチドは、ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞を刺激することができる。ＣＤ８$^+$陽性Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞であり得る。ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞は、ＡＲＧ２特異的であり得る。ＣＤ８$^+$陽性Ｔ細胞は、ＡＲＧ２特異的細胞傷害性Ｔ細胞であり得る。本ポリペプチドは、アミノ酸配列：ＮＬＩＶＮＰＲＳＶ（配列番号５）を含み得る、又はそれからなり得る。

【００１３】

本ポリペプチドは、ＨＬＡクラスＩＩ拘束性エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。本ポリペプチドは、ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞を刺激することができる。本ポリペプチドは、アミノ酸配列：ＧＬＬＳＡＬＤＬＶ（配列番号１４）を含み得る、又はそれからなり得る。

【００１４】

本ポリペプチドは、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８又は１９アミノ酸の最大長を有し得る。本ポリペプチドのＣ末端アミノ酸は、対応するアミドに置き換えられていてもよい。

【００１５】

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、ベクター内に含まれてよい。

【００１６】

本発明はさらに、本発明のポリペプチド及び／又は本発明のポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。本組成物は、少なくとも１つの本発明の異なるポリペプチド及び／又は少なくとも１つの本発明の異なるポリヌクレオチドを含み得る。組成物は、少なくとも１つの薬学上許容可能な希釈剤、担体又は保存剤を含み得る。組成物は、アジュバントを含み得る。アジュバントは、細菌ＤＮＡベースのアジュバント、油／界面活性剤ベースのアジュバント、ウイルスｄｓＲＮＡベースのアジュバント、イミダゾキノリン、及びモンタニドＩＳＡアジュバントからなる群から選択され得る。

【００１７】

また、本発明により、対象における疾患又は病態を治療又は予防する方法であって、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。

【００１８】

本発明はまた、対象における疾患又は病態を治療又は予防する方法において使用するための本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物を提供する。

【００１９】

本発明はさらに、対象における疾患又は病態を治療又は予防するための薬剤の調製のための本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物の使用を提供する。

【００２０】

疾患又は病態は、ＡＲＧ２の不適当な又は過剰な免疫抑制機能を少なくとも部分的に特

徴とし得る。ＡＲＧ２の過剰な免疫抑制機能は、ＡＲＧ２を発現する活性化Ｔｒｅｇ細胞によって少なくとも部分的に媒介され得る。ＡＲＧ２の過剰な免疫抑制機能は、ＡＲＧ２を発現する癌関連線維芽細胞によって少なくとも部分的に媒介され得る。疾患又は病態は癌であり得る。癌は、黒色腫（悪性転移性黒色腫など）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、又は膵臓癌であり得る。

【００２１】

治療する疾患又は病態が癌である場合、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物は、さらなる癌療法と併用することができる。さらなる癌療法は、免疫系チェックポイント阻害剤であり得る。好ましくは、免疫系チェックポイント阻害剤は、抗体である。より好ましくは、免疫系チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体である。

【００２２】

よって、本発明は、対象における癌を治療又は予防する方法であって、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物を対象に投与することを含む方法を提供し、この方法は、対象へのさらなる癌療法の同時投与又は逐次投与をさらに含む。

【００２３】

本発明はまた、対象における癌を治療又は予防する方法において使用するための本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物を提供し、この方法は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物を対象に投与することを含み、この方法は、対象へのさらなる癌療法の同時投与又は逐次投与をさらに含む。

【００２４】

本発明はさらに、対象における癌の治療又は予防のための薬剤の調製のための本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明の組成物の使用を提供し、ポリペプチド、ポリヌクレオチド及び／又は組成物は、さらなる癌療法とともに対象に同時又は逐次に投与される。

【００２５】

さらに、本発明により、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を刺激する方法であって、細胞を本発明のポリペプチド又は本発明の組成物と接触させることを含む方法が提供される。接触させる細胞は、健常対象又は癌患者から採取されたサンプル中に存在してよい。接触させる細胞は、腫瘍サンプル中に存在してよい。ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は、$CD8^+$陽性Ｔ細胞であり得る。好ましくは、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は、細胞傷害性$CD8^+$　Ｔ細胞である。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１は、$CD4^+$又は$CD8^+$　Ｔ細胞応答を誘発するＡＲＧ２ペプチドの同定を示す。（Ａ、左）１５の異なるＨＬＡ－Ａ２の応答のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴスクリーニングにより、５人の健常$HLA-A2^+$ドナーにおいてＡＲＧ２由来ペプチドが推定された。ウェルあたり3×10^5細胞を播種した。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。ペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞は、ペプチドで刺激したウェルと対照ウェルの細胞間のスポットの差として示す。（Ａ、右）（Ａ）に示すＥＬＩＳＰＯＴ応答の代表例。（Ｂ及びＣ）対照もしくはペプチドＡ２Ｓ１４（Ｂ）又はペプチドＡ２Ｓ０５（Ｃ）で刺激された３人の健常ドナー由来のサンプルで分泌しているＩＦＮγ及びＴＮＦαに対する代表的な細胞内サイトカイン染色。ゲート設定戦略は図１０で得られる。ＨＤ＝健常ドナー。ＤＰ＝二重陽性（$TNF\alpha^+$　$IFN\gamma^+$）。

【図２】図２は、ペプチドＡ２Ｓ０５が$HLA-A2^+$ドナーと$HLA-A2^-$ドナーの両方で応答すること、ならびに応答はｅｘ　ｖｉｖｏでも検出可能なことを示す。（Ａ）１７人の健常ドナーにおけるＡ２Ｌ２及びＡ２Ｓ０５に対するＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり3.5×10^5の細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。ペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞は、ペプチドで刺激したウェルと対照ウェ

ルの細胞間のスポットの差として示す。各点は１人のドナーを表し、バーは平均を表す。（Ｂ）既知のＨＬＡ型を有する３０人の健常ドナーと１３人の癌患者（前立腺癌患者２人、黒色腫癌患者１１人）におけるＡ２Ｓ０５に対するＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。各点は１人のドナーを表し、バーは平均を表す。（Ｃ）２人のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$ドナーと２人のＨＬＡ－Ａ２$^{-}$ドナーに対するＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ＨＤ＝健常ドナー。（Ｄ）（Ｃ）に示されるＡ２Ｓ０５に対して強い応答を有する３人の健常ドナー及び１人の癌患者（ＡＡ０１、黒色腫）からのＨＬＡＨＬＡタイピングデータ。ドナー間で共有されるＨＬＡ型を黄色で強調している。（Ｅ、左）Ａ２Ｓ０５に対するｅｘ　ｖｉｖｏ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり９×１０^{5}の細胞を蒔き、対照及びペプチド刺激を三～六重反復で行った。*ｐ≦０．０５（分布によらないリサンプリング法に従った）（Ｅ、右）ｅｘ　ｖｉｖｏ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答の代表例。

【図３】図３は、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞は、ＨＬＡ－Ｂ８に関してＡ２Ｓ０５を認識することを示す。（Ａ）ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を、３人の健常ドナー（ＨＤ）及び１人の癌患者（ＡＡ０１、黒色腫）から増殖させた。特異的Ｔ細胞培養物の特異性を、ＴＮＦα及びＩＦＮγに対する細胞内サイトカイン染色により評価した。ＣＤ１０７ａを細胞傷害性のマーカーとして含めた。バーは、対照刺激又はＡ２Ｓ０５刺激に応答してＣＤ１０７ａを発現し、ＩＦＮγ、ＴＮＦα又は両方（ＤＰ、二重陽性）を産生するＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞のパーセンテージを示す。（Ｂ～Ｄ）ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞培養物のＨＬＡ拘束性を同定するために、２人のドナー（ＨＤ７８及びＨＤ９３）からのＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を、Ａ２Ｓ０５ペプチドでプレパルスした癌細胞株を用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴで評価した。ペプチド刺激なしの同じ癌細胞株を、対照として含めた。３×１０^{4}のＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を１×１０^{4}の癌細胞とともに蒔いた（エフェクター：標的比３：１）。細胞株はＨＬＡ－Ａ１$^{+}$（Ｂ）、ＨＬＡ－Ｃ７$^{+}$（Ｃ）又はＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$（Ｄ）のいずれかであった。Ｔ細胞を単独で蒔くか（－）、又はＴ細胞をＡ２Ｓ０５とともに蒔き（＋ｐｅｐ）、それぞれ陰性対照及び陽性対照とした。（Ｅ）^{5}ＦＭ６とアッセイ前２４時間、ＩＦＮγで刺激したＦＭ６の溶解を示す^{1}Ｃｒ放出アッセイ。

【図４】図４は、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は、刺激された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を認識し、それらと反応することを示す。（Ａ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏで活性化され、増殖した制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）又はエフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆｓ）に対するＡＲＧ２特異的Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり５×１０^{5}のＴ細胞を５×１０^{3}の標的細胞とともに蒔いた（エフェクター：標的比１０：１）。バーは平均±ＳＤを示す。バー内では、Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆからのバックグラウンドは補正されている。総ての条件を六重反復で蒔いた。*ｐ≦０．０５（分布によらないリサンプリング法に従った）。（Ｂ～Ｃ）（Ａ）でＥＬＩＳＰＯＴに使用したＴｒｅｇ及びＴｅｆｆにおけるＡＲＧ２発現（Ｂ）又はＦＯＸＰ３発現（Ｃ）のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。ＡＲＧ２又はＦＯＸＰ３発現をハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、Ｔｅｆｆに対する倍率変化として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｄ）Ｔｒｅｇ、Ｔｅｆｆ及びサブセットを単離した活性化細胞のバルク培養におけるＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。ＡＲＧ２発現をＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、相対発現（任意単位）として表した。バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。

【図５】図５は、ＡＲＧ２由来ペプチドに対するＥＬＩＳＰＯＴ応答を示す。Ａ２Ｓ１５（Ａ）、Ａ２Ｓ１４（Ｂ）又はＡ２Ｓ０５（Ｃ）に対する３人の健常ドナーのＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり３×１０^{5}の細胞を蒔いた。対照及びペプチド刺激は三重反復で行った。ＴＮＴＣ＝測定不能多数（＞５００）。

【図６】図６は、ＦＭ６細胞を特徴付けるための実験の結果を示す。（Ａ）転移性悪性黒色腫細胞株ＦＭ６におけるＨＬＡ－ＡＢＣ及びＨＬＡ－Ｂ８発現のフローサイトメトリー分析。バーは、生細胞集団からのＨＬＡ－ＡＢＣ$^{+}$又はＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$細胞のパーセンテージを示す。（Ｂ）ＩＦＮγ（１００Ｕ／ｍｌ）で２４時間刺激したＦＭ６細胞及びＦＭ６細胞のＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$集団におけるＨＬＡ－Ｂ８の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。（Ｃ）ＦＭ６におけるＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。データはハウスキーピング遺伝子ＰＯ

ＬＲＡに対する相対発現（任意単位）として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。

【図７】図７は、ＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$細胞株に対するＡＲＧ２Ｓ０５特異的Ｔ細胞のＥＬＩＳＰＯＴ応答を示す。（Ａ）２人のドナー（ＨＤ８１及びＡＡ０１）からのＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を、Ａ２Ｓ０５ペプチドでプレパルスした転移性悪性黒色腫細胞株ＦＭ６（ＦＭ６　ｐｅｐ）を用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴにより評価した。ペプチド刺激なしのＦＭ６（ＦおｐｌｋＭ６）を対照として含めた。３×１０^{4}のＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を１×１０^{4}の癌細胞とともに蒔いた（エフェクター：標的３：１）。総ての条件を三重反復で設定した。バーは平均±ＳＤを表す。ＴＮＴＣ＝測定不能多数（＞５００）。（Ｂ）ＨＤ９３由来のＡＲＧ２特異的Ｔ細胞を上記のようにＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴで評価した。ＦＭ６細胞をＡＲＧ１由来ペプチド（ＦＭ６　ｐｅｐ（ＡＲＧ１））又はＡ２Ｓ０５ペプチド（ＦＭ６　ｐｅｐ（ＡＲＧ２））でプレパルスした。＊ｐ≦０．０５（分布によらないリサンプリング法に従った）。（Ｃ）３つのさらなるＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$細胞株（２つの転移性悪性黒色腫細胞株（ＦＭ２８及びＦＭ８２）と１つのＡＭＬ細胞株（ＯＣＩ－Ｍ２））に対する４つのＡ２Ｓ０５特異的Ｔ細胞培養物のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴによるＡ２Ｓ０５のＨＬＡ－Ｂ８拘束性の検証。実験は（Ａ）に記載のように行った。

【図８】図８は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及びエフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）の選別及び特徴付けの結果を示す。（Ａ）３人のドナーにおけるＴｒｅｇ及びＴｅｆｆの選別戦略を示すフローサイトメトリープロット。ＴｒｅｇはＣＤ２５^{ｈｉｇｈ}ＣＤ１２７$^{－}$として選別し、ＴｅｆｆはＣＤ２５^{ｌｏｗ}ＣＤ１２７$^{+}$として選別した。選別の全ゲート設定戦略を図９に示す。（Ｂ）３人のドナーから選別したＴｒｅｇ及びＴｅｆｆにおけるＦＯＸＰ３－ＰＥの平均蛍光強度（ＭＦＩ）。（Ｃ～Ｄ）Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆにおけるＩＬ－１０発現（Ｃ）又はＣＴＬＡ４発現（Ｄ）のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。ＩＬ－１０又はＣＴＬＡ４発現をハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、Ｔｅｆｆに対する倍率変化として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｅ）ＨＤ９３から単離されたＴｒｅｇ及びＴｅｆｆにおけるＡＲＧ１及びＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析の代表例。データはハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対する相対発現（任意単位）として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。

【図９】図９は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）又はエフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）の選別のためのゲート設定戦略を示す。（Ａ）Ｔｒｅｇ又はＴｅｆｆの選別のためのゲート設定戦略。細胞のゲートをまずリンパ球＞シングレット＞生細胞＞ＣＤ３$^{+}$＞ＣＤ４$^{+}$として設定した。ＣＤ１２７$^{－}$細胞からＣＤ１２７$^{+}$細胞を識別するためのゲートを設定するために、ＣＤ１２７に対する蛍光マイナス１（ＦＭＯ）対照を使用した。これに基づき、ＴｒｅｇはＣＤ２５^{ｈｉｇｈ}ＣＤ１２７$^{－}$として選別し、ＴｅｆｆはＣＤ２５^{ｌｏｗ}ＣＤ１２７$^{+}$として選別した。Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆゲートは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の約５％の選別を目標とした。（Ｂ）ＣＤ１２７$^{+}$のゲートを設定するために使用したＣＤ１２７－ＦＩＴＣ　ＦＭＯ。（Ｃ）ＦＯＸＰ３$^{+}$のゲートを設定するために使用したＦＯＸＰ３－ＰＥ　ＦＭＯ。（Ｄ～Ｅ）Ｔｒｅｇ（Ｄ）及びＴｅｆｆ（Ｅ）の選別の質の純度評価の代表例。

【図１０】図１０は、ＩＦＮγ及びＴＮＦαに対する細胞内サイトカイン染色のゲート設定戦略を示す。ＩＦＮγ及びＴＮＦαに対する細胞内サイトカイン染色のゲート設定戦略。細胞のゲートをまずリンパ球＞シングレット＞生細胞＞ＣＤ３$^{+}$として設定し、次にＣＤ４$^{+}$又はＣＤ８$^{+}$として設定した。ＣＤ１０７ａ発現とＩＦＮγ及びＴＮＦα分泌をそれぞれＣＤ４$^{+}$（右）及びＣＤ８$^{+}$（左）Ｔ細胞に関して評価した。ＩＦＮγ^{+}、ＴＮＦα^{+}及びＣＤ１０７ａ$^{+}$に対するゲートを設定するために、ペプチド刺激なしのサンプル（対照）を使用した。

【図１１－１】図１１は、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞が刺激された制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を認識し、それらと反応することを示す。（Ａ～Ｃ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏで活性化され、増殖した制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）又は静止ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞（Ｔｒｅｓｔ）に対するＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり５×１０^{4}のＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を５×１０^{3}の標的細胞とともに蒔いた（エフェクタ

ー：標的比１０：１）。バーは、平均ＩＦＮγスポット数±ＳＤを示す。バー内では、Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔからのバックグラウンドは補正されている。総ての条件を六重反復で蒔いた。＊ｐ≦０．０５（分布によらないリサンプリング法に従った）。（Ｄ）活性化ＰＢＭＣと自己ＣＤ８＋　Ｔ細胞（対照Ｔ細胞）又はＡＲＧ２特異的Ｔ細胞との６時間の共培養後のＴｒｅｇ集団のフローサイトメトリー評価。共培養は、活性化ＰＢＭＣ：Ｔ細胞が３：２の比率で設定した。活性化したＰＢＭＣのみを用いてＴｒｅｇのゲートを設定したが、これは（Ｃ）のＥＬＩＳＰＯＴ実験でＴｒｅｇの選別に用いたゲートと同様である。バーは、対照Ｔ細胞又はＡＲＧ２特異的Ｔ細胞と共培養した場合のＴｒｅｇ集団の、三重技術的反復の平均減少±ＳＤをＰＢＭＣ単独培養と比較して示す（点として示す）。＊ｐ≦０．０１９４（独立ｔ検定）。（Ｅ）（Ａ～Ｃ）でＥＬＩＳＰＯＴに使用したＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔを単離した活性化ＰＢＭＣのバルク培養も含めた。ＡＲＧ２発現をハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、Ｔｒｅｓｔに対する倍率変化として表した。バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｆ）ＨＤ９３から選別されたＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現を評価するウエスタンブロット解析。細胞株Ｓｅｔ２及びＵＫＥ－１をそれぞれＡＲＧ２陽性対照及び陰性対照として含めた。（Ｇ～Ｈ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏで活性化され、増殖したＴｒｅｇ又はＴｒｅｓｔに対するＡＲＧ２特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答。ウェルあたり５×１０^{4}のＡＲＧ２特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞を５×１０^{3}の標的細胞とともに蒔いた（エフェクター：標的比１０：１）。バーは六重の技術的反復の平均ＩＦＮγスポット数±ＳＤを示す。バー内では、Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔからのバックグラウンドは補正されている。総ての条件を六重反復で蒔いた。＊ｐ≦０．０５（分布によらないリサンプリング法に従った）。

【図１１－２】図１１－１の続きである。

【図１２－１】図１２は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及び静止ＣＤ４＋　Ｔ細胞（Ｔｒｅｓｔ）の選別及び特徴付けの結果を示す。（Ａ）４人のドナーにおけるＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔの選別戦略を示すフローサイトメトリープロット。Ｔｒｅｇは、ＣＤ２５$^{\mathrm{high}}$ＣＤ１２７$^{-}$として選別し、ＴｒｅｓｔはＣＤ２５$^{\mathrm{low}}$ＣＤ１２７$^{+}$として選別した。選別の全ゲート設定戦略を図９に示す。（Ｂ）ＨＤ９３から単離されたＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ１及びＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析の代表例。データはハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対する相対発現（任意単位）として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｃ）選別精製されたＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＦＯＸＰ３発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。ＦＯＸＰ３発現をハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、Ｔｒｅｓｔに対する倍率変化として表した。バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｄ）図４Ｃでエフェクター細胞として使用した自己ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞とともに、ＨＤ９３から単離されたＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析の代表例。データはハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対する相対発現（任意単位）として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｅ）ＣＤ８$^{+}$濃縮画分の純度分析。ＣＤ８$^{+}$のＭＡＣＳ濃縮前（ｐｒｅ－ｓｏｒｔ）及び濃縮後の生ＣＤ３＋細胞のパーセンテージを示す。（Ｆ、左）ドナーＡＡ０１におけるＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔの選別戦略を示すフローサイトメトリープロット。（Ｆ、右）ＡＡ０１から選別されたＴｒｅｇ、ＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現のウエスタンブロット解析。細胞株Ｓｅｔ２及びＵＫＥ－１をそれぞれＡＲＧ２陽性対照及び陰性対照として含めた。

【図１２－２】図１２－１の続きである。

【図１３－１】図１３は、選別精製されたＴｒｅｇの特徴付けを示す。（Ａ）３人のドナーから選別したＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔを細胞内染色した後のＦＯＸＰ３－ＰＥの平均蛍光強度（ＭＦＩ）。（Ｂ～Ｆ）Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＩＬ２ＲＡ（Ｂ）、ＴＮＦＲＳＦ１８（Ｃ）、ＩＫＺＦ２（Ｄ）、ＣＴＬＡ４（Ｅ）、又はＩＬ１０（Ｆ）の発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。各Ｔｒｅｇシグネチャー遺伝子の発現をハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対して正規化し、Ｔｒｅｓｔに対する倍率変化として表し、バーは技術的

三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｇ）Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＰＤＣＤ１発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析。データはハウスキーピング遺伝子ＰＯＬ２ＲＡに対する相対発現（任意単位）として表し、バーは技術的三重反復の平均±ＳＤを示す。（Ｈ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　Ｔｒｅｇ抑制アッセイ。（左）選別精製されたＴｒｅｇ（＋Ｔｒｅｇ）又はＴｒｅｓｔ（＋Ｔｒｅｓｔ）との５日の共培養の後の未分裂のＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞のパーセンテージ。バーは３回の技術的三重反復の平均を示す（点として示す）。＊＊ｐ＝０．００６９（独立ｔ検定）。（中央）Ｔｒｅｇ又はＴｒｅｓｔとの５日の共培養の後のＣＤ８　Ｔ細胞の増殖指数。バーは３回の技術的三重反復の平均を示す（点として示す）。＊＊ｐ＝０．００２２（独立ｔ検定）。（右）Ｔｒｅｇ又はＴｒｅｓｔと５日間共培養したＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のＣＦＳＥ染色。濃い灰色のバー（一番右）は、未分裂の集団を表す。

【図１３－２】図１３－１の続きである。

【図１４－１】図１４は、腫瘍成長、ＡＲＧ２特異的ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の活性化ならびに炎症誘発性腫瘍微小環境に対するＡＲＧ２ベースの免疫調整ワクチンの効果を示す。（Ａ）（Ａ）実験タイムラインの概要。（Ｂ）対照（Ｃｔｒｌ）又はＡＲＧ２－ペプチド免疫調整ワクチンを受けたマウスの平均Ｐａｎ０２腫瘍成長。Ａの実験概要に従い、マウス（各群ｎ＝１０）に腫瘍接種及びワクチン接種を行った。データは平均±ＳＥＭとして表す。＊＊＊＊ｐ＜０．０００１（２元配置ＡＮＯＶＡ検定）。（Ｃ）Ｂに示す実験の対照ワクチン（ｎ＝３）又はＡＲＧ２ベースワクチン（ｎ＝６）を受けたマウスから単離された脾細胞に対するＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ。簡単に述べれば、ウェルあたり８×１０^{5}の脾細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。ペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞を、ペプチド刺激ウェルと対照ウェル間の計数スポット数の差として定量した。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＝０．０２３８（マン・ホイットニー検定）。（Ｄ）ＡＲＧ２ベースのペプチドワクチンを受けたＰａｎ０２担癌マウス由来の脾細胞の中のＡＲＧ１及びＡＲＧ２特異的ＩＦＮγ分泌細胞をＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴでアッセイした。このアッセイでは、ウェルあたり８×１０^{5}の脾細胞を、ＡＲＧ１ペプチド又はＡＲＧ２ペプチドのいずれかとともに蒔いた。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。＊ｐ＝０．００２２（マン・ホイットニー検定）。（Ｅ）ＡＲＧ２ベースのペプチドワクチンで処置したＰａｎ０２担癌マウスの脾細胞から単離されたＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$選別Ｔ細胞中に存在するＡＲＧ２特異的ＩＦＮγ分泌細胞を、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイでアッセイした。このアッセイでは、２．８×１０^{5}のＴ細胞を、ＡＲＧ２ペプチドを伴って、又は伴わずに、６×１０^{5}の抗原提示細胞（ナイーブマウス由来脾細胞）とともに蒔いた。各点は１サンプルを表し（２匹のマウスからプール）、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｆ）Ｂの実験のＰａｎ０２担癌マウスから無作為に選択した腫瘍を３１日目に採取した（各群＝４～６）。腫瘍ＲＮＡを抽出し、バルクＲＮＡｓｅｑを行った。対照接種マウスと比較してＡＲＧ２接種マウス由来のＰａｎ０２腫瘍で差次的に発現される遺伝子（ＦＤＲ＜０．０５及び絶対ｌｏｇ２倍率変化＞０）を同定し、ボルカノプロットで表した。ｎ＝２８２のアップレギュレートされた遺伝子及びｎ＝３３のダウンレギュレートされた遺伝子（図１８も参照）。（Ｇ）Ｆに記載のＲＮＡｓｅｑデータで有意にアップレギュレートされた遺伝子に関連する免疫関連の生物学的プロセス（遺伝子オントロジー解析）（図１９も参照）。（Ｈ～Ｊ）総ての免疫集団の絶対免疫浸潤スコア（任意単位）（Ｈ）、又はＭ１マクロファージとＭ２マクロファージの免疫スコア比（Ｉ）及びＣＤ８　Ｔ細胞とＴｒｅｇの免疫スコア比（Ｊ）を示す棒グラフ。免疫集団スコアは、Ｆに記載されるようにバルク腫瘍ＲＮＡｓｅｑを用い、ＩｍｍｕＣＣアルゴリズムで作成した。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均値±ＳＥＭを表す。

【図１４－２】図１４－１の続きである。

【図１５－１】図１５は、マウス腫瘍モデルにおける免疫調整ＡＲＧ２ベースのペプチドワクチンの効果を示す。（Ａ）図６Ｂに示すＰａｎ０２担癌マウスの個々の腫瘍成長。各処置群の平均腫瘍成長もプロットした。１マウスは完全な腫瘍退縮（ＣＲ）を示し、矢印で示す。（Ｂ）ＡＲＧ２－ペプチド免疫調整ワクチンを受けたマウス又は未処置マウスの

平均Ｐａｎ０２腫瘍成長。図６Ａの実験概要と同様に、マウス（各群ｎ＝８～９）に腫瘍接種及びワクチン接種を行った。データは平均±ＳＥＭとして示す。＊＊ｐ＝０．００１０（２元配置ＡＮＯＶＡ検定）。（Ｃ）未処置又はＡＲＧ２ベースの免疫調整ペプチドワクチンを受けたＰａｎ０２担癌マウスにおける０日目と比べた体重のパーセント変化の代表例。図６Ａの実験概要に従い、マウス（各群ｎ＝８～９）を処置した。（Ｄ）タンパク質配列アラインメントＡＲＧ１（ａａ１６２～１９０）及びＡＲＧ２（ａａ１８１～２０９）。試験に使用したＡＲＧ２ペプチド（ａａ１８８～１９６）を青色で強調し、ＡＲＧ１の対応する配列（ａａ１６９～１７７）を茶色で強調した。図６Ｄで特異的認識に対する対照としたＡＲＧ１＿１６９－１７７。（Ｅ）Ｃ５７ＢＬ／６に5×10^5のＭＣ３８細胞を投与し、腫瘍接種後０日目及び７日目にＡＲＧ２ベースのワクチン又は対照ワクチンを施した。１８日目に、マウスを犠死させ、脾臓及び腫瘍を回収した。（Ｅ、左）対照ワクチン（ｎ＝２）及びＡＲＧ２ワクチン（ｎ＝６）を接種したＭＣ３８腫瘍担持マウス由来の脾細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴにより同定されたペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞（左）。ウェルあたり8×10^5の脾細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。ペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞は、ペプチドで刺激したウェルと対照ウェルの細胞間のスポットの差として示す。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｅ、右）対照ワクチン（ｎ＝２）又はＡＲＧ２ワクチン（ｎ＝２）で処置したマウスのＭＣ３８腫瘍由来の$CD45^+$濃縮細胞におけるペプチド特異的Ｔ細胞応答。ウェルあたり5×10^5の$CD45^+$細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｆ）Ｃ５７ＢＬ／６　マウスに5×10^5のＬＬ２細胞を投与し、腫瘍接種後０日目及び５日目に対照ワクチン又はＡＲＧ２－ワクチンを接種した。１２日目に試験を終了し、腫瘍を回収した。（Ｆ、左）対照（ｎ＝８）及びＡＲＧ２（ｎ＝８）を接種したＬＬ２腫瘍担持マウス由来の脾細胞においてＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴにより同定されたペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞。ウェルあたり8×10^5の脾細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｆ、右）対照ワクチン（ｎ＝４）又はＡＲＧ２ワクチン（ｎ＝３）で処置したマウスのＬＬ２腫瘍由来の$CD45^+$濃縮細胞におけるペプチド特異的Ｔ細胞応答。ウェルあたり5×10^5の$CD45^+$細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｇ）Ｃ５７ＢＬ／６マウスに5×10^5のＢ１６－Ｆ１０細胞を投与し、腫瘍接種後０日目及び５日目に対照又はＡＲＧ２－ワクチンを施した。１２日目に試験を終了し、腫瘍を回収した。（Ｇ、左）対照ワクチン（ｎ＝３）及びＡＲＧ２ワクチン（ｎ＝３）を接種したＢ１６－Ｆ１０腫瘍担持マウス由来の脾細胞に対するＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴにより同定したペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞。ウェルあたり8×10^5の脾細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｇ、右）対照ワクチン（ｎ＝３）又はＡＲＧ２ワクチン（ｎ＝３）で処置したマウスのＢ１６－Ｆ１０腫瘍由来の$CD45^+$濃縮細胞におけるペプチド特異的Ｔ細胞応答。ウェルあたり5×10^5の$CD45^+$細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激を三重反復で行った。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。各点は１匹のマウスを表し、バーは平均±ＳＥＭを表す。（Ｈ）Ｇｅｎｅ　Ｏｎｔｏｌｏｇｙ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅソフトウエア(http://gebeontology.org/)を用い、ＡＲＧ２処置マウスにおいて有意にアップレギュレートされた遺伝子を入力して、生物学的プロセスに関する遺伝子オントロジー（ＧＯ）解析を行った。濃縮された生物学的プロセスは、最初に免疫関連又は非免疫関連の生物学的プロセスに分類され、濃縮された生物学的プロセスの総数に対するパーセンテージで表されている（図１９も参照）。（Ｉ）対照ワクチンを受けたマウスと比較して、ＡＲＧ２ベースのワクチンを受けたマウスで濃縮された、陽性抗腫瘍応答、陰性抗腫瘍応答、又は細菌に対する免疫応答に関連する免疫関連の生物学的プロセスのパーセンテージ（図１９も参照）。

【図１５－２】図１５－１の続きである。

【図１６】図１６は、対照ワクチン又はＡＲＧ２ベースの免疫調整ワクチンを受けたＰａｎ０２担癌マウスにおいてＩｍｍｕＣＣアルゴリズムにより計算された免疫集団を示す。図６Ｆに記載されるような対照ワクチン又はＡＲＧ２ベースの免疫調整ワクチンを受けたＰａｎ０２担癌マウスのバルク腫瘍ＲＮＡからのＲＮＡｓｅｑデータの解析による免疫集団のＩｍｍｕＣＣ解析。箱ひげ図は、対照ワクチン又はＡＲＧ２ベースのワクチンを受けたＰａｎ０２担癌マウスにおけるＣＤ８＋　Ｔ細胞（Ａ）、ＣＤ４＋　Ｔ細胞（Ｂ）、制御性Ｔ細胞（Ｃ）、ナチュラルキラー細胞（Ｄ）、樹状細胞（Ｅ）、Ｂ細胞（Ｆ）、マクロファージ（Ｇ）、単球（Ｈ）及び顆粒球（Ｉ）の絶対免疫スコアを示す。異なる免疫集団内のサブグループを表５及び６に挙げる。

【図１７－１】図１７は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及び静止Ｔ細胞（Ｔｒｅｓｔ）の選別及び特徴付けの結果を示す。（Ａ）Ｔｒｅｇ又はＴｒｅｓｔの選別のためのゲート設定戦略。細胞のゲートをまずリンパ球＞シングレット＞生細胞＞ＣＤ３$^{+}$＞ＣＤ４$^{+}$として設定した。。ＣＤ１２７$^{-}$細胞からＣＤ１２７$^{+}$細胞を識別するためのゲートを設定するために、ＣＤ１２７に対する蛍光マイナス１（ＦＭＯ）対照を使用した。これに基づき、ＴｒｅｇはＣＤ２５^{ｈｉｇｈ}ＣＤ１２７$^{-}$として選別し、ＴｅｆｆはＣＤ２５^{ｌｏｗ}ＣＤ１２７$^{+}$として選別した。Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆゲートは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の約５％の選別を目標とした。Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆゲートは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の約５％の選別を目標とした。（Ｂ）ＣＤ１２７$^{+}$のゲートを設定するために使用したＣＤ１２７－ＦＩＴＣ　ＦＭＯ。（Ｃ）ＦＯＸＰ３$^{+}$のゲートを設定するために使用したＦＯＸＰ３－ＰＥ　ＦＭＯ。（Ｄ～Ｅ）Ｔｒｅｇ（Ｄ）及びＴｅｆｆ（Ｅ）の選別の質の純度評価の代表例。（Ｆ～Ｇ）ＨＤ９３のＴｒｅｇ（Ｆ）及びＴｒｅｓｔ（Ｇ）中のＦＯＸＰ３$^{+}$細胞の代表例。

【図１７－２】図１７－１の続きである。

【図１８－１】図１８は、図１４Ｆに示されるような遺伝子発現情報に関する捕捉データを示す。

【図１８－２】図１８－１の続きである。

【図１８－３】図１８－２の続きである。

【図１８－４】図１８－３の続きである。

【図１８－５】図１８－４の続きである。

【図１９－１】図１９は、図１４Ｇ、１５Ｈ及び１５Ｉに示されるようなジーンオントロジー解析に関する捕捉データを示す。

【図１９－２】図１９－１の続きである。

【図１９－３】図１９－２の続きである。

【図１９－４】図１９－３の続きである。

【００２７】

配列の簡単な説明

配列番号：１～１５は、ヒトＡＲＧ２に由来するポリペプチドの各アミノ酸配列である。

配列番号：１６は、ヒトＡＲＧ２の「ホットスポット」領域のアミノ酸配列である。

配列番号１７は、Ａ２Ｌ２と呼ばれるＡＲＧ２ペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号１８は、ＡＲＧ１＿６５－７３と呼ばれるＡＲＧ１ペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号１９は、全長ヒトＡＲＧ２のアミノ酸配列である。

配列番号２０は、全長ヒトＡＲＧ１のアミノ酸配列である。

配列番号２１及び２２はそれぞれ、免疫原性マウスＡＲＧ２由来及びマウスＡＲＧ１由来エピトープのアミノ酸配列である。

配列番号２３は、配列番号２２を含むマウスＡＲＧ１アミノ酸配列である。

配列番号２４は、配列番号２１を含むマウスＡＲＧ２アミノ酸配列である。

【００２８】

発明の詳細な説明

開示される製品及び方法の異なる適用が、当技術分野における特定のニーズに合わせら

れ得ると理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、本発明の特定の実施形態のみを説明することを目的としており、限定を意図するものではないと理解されるべきである。

【００２９】

さらに、本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、内容によって別途明確に規定されない限り、複数の指示対象を含む。よって、例えば、「ポリペプチド(a polypeptide)」に対する言及は、「複数のポリペプチド(polypeptides)」などを含む。

【００３０】

本明細書において、「ポリペプチド」は、その最も広い意味で、２つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、又は他のペプチド疑似の化合物を指すように使用される。よって、用語「ポリペプチド」は、短いペプチド配列と、より長いポリペプチド及びタンパク質も包含する。本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、Ｄ光学異性体又はＬ光学異性体の両方を含む、天然及び／もしくは非天然アミノ酸又は合成アミノ酸のいずれか、ならびにアミノ酸類似体及びペプチド疑似を指す。

【００３１】

用語「患者」及び「対象」は、互換的に使用され、通常はヒトを指す。

【００３２】

上記又は下記を問わず、本明細書に引用されるすべての刊行物、特許及び特許出願は、引用することによりその全体が本明細書の一部とされる。

【００３３】

本発明者らは、特に免疫原性が高いヒトＡＲＧ２由来のさらなるポリペプチドを特定した。意外にも、これらのポリペプチドは、これまで免疫原性があると示されたヒトＡＲＧ２の領域内には存在しない。特に、本発明のポリペプチドは、ヒトＡＲＧ２の「ホットスポット」領域にもＡ２Ｌ２領域にも存在しない。

【００３４】

本明細書における「免疫原性」とは、好ましくは、ＡＲＧ２タンパク質が、ＡＲＧ２タンパク質を発現する細胞内又は細胞上に存在する場合に、ポリペプチドがＡＲＧ２タンパク質に対する免疫応答を誘発できることを意味する。言い換えれば、ポリペプチドは、ＡＲＧ２に対して免疫原性であると説明され得る。あるいは、ポリペプチドは、ＡＲＧ２の免疫原性断片として説明され得る。免疫応答は、好ましくは、Ｔ細胞応答であり、ポリペプチドはＴ細胞エピトープを含むＡＲＧ２の免疫原性断片として説明され得る。免疫応答は、個体（又は個体から採取したサンプル）に対するポリペプチドの投与後、少なくとも１つの個体（又は前記サンプル）において検出され得る。

【００３５】

ポリペプチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法を含む任意の適切な方法を用いて、免疫原性であると同定することができる。例えば、ペプチドは、以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）の特徴のうち少なくとも１つを有する場合、免疫原性であると同定することができる：

（ｉ）ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって決定された場合、健常対象及び／又は癌患者のＰＢＬ集団においてＩＦＮ－γ産生細胞を誘発することができる；及び／又は

（ｉｉ）アルギナーゼ２と反応性であるＣＴＬの腫瘍組織のサンプルにおいてｉｎ　ｓｉｔｕで検出することができる；及び／又は

（ｉｉｉ）特異的Ｔ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの成長を誘導することができる。

ポリペプチドが免疫原性であるかどうかを決定するのに適切な方法も、以下の実施例の項で説明される。

【００３６】

本発明のポリペプチドは、配列番号１９の９～１９個の連続アミノ酸の配列を含むか、又は該配列からなるヒトアルギナーゼ２（ＡＲＧ２；配列番号１９）の免疫原性断片であるが、前記フラグメントは配列番号１９のアミノ酸２～３４又は１８０～２２９を含まない。ポリペプチドは、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８又は

１９個のアミノ酸の最大長を有し得る、かつ／又はＣ末端アミノ酸が対応するアミドで置換され得る。ポリペプチドは単離され得る。

【００３７】

ポリペプチドは、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩ制限エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。ポリペプチドは、ＨＬＡ－Ｂ８制限エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。ポリペプチドは、ＣＤ８＋Ｔ細胞を刺激することができる。ＣＤ８＋　Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞であってもよい。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＡＲＧ２特異的であってもよい。このタイプの例示的なポリペプチドは、アミノ酸配列ＮＬＩＶＮＰＲＳＶ（配列番号５；Ａ２Ｓ０５）を含む、又はそれからなる。ペプチドＡ２Ｓ０５は、ＨＬＡ－Ｂ８制限であり、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することができる。

【００３８】

ポリペプチドは、ＨＬＡクラスＩＩ制限エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。ポリペプチドは、ＣＤ４＋Ｔ細胞を刺激することができる。このタイプの例示的なポリペプチドは、アミノ酸配列ＧＬＬＳＡＬＤＬＶ（配列番号１４）を含むみ得る、又はそれからなり得る。

【００３９】

本明細書に記載の任意のポリペプチドにおいて、修飾配列を有するポリペプチドが、非修飾配列を有するポリペプチドと比較して、ＡＲＧ２に対して同等又は増大した免疫原性を示す限りにおいて、アミノ酸配列は、１個、２個、３個、４個、又は５個（すなわち、最大５個）の付加、欠失又は置換によって修飾されてもよい。「同等」とは、修飾配列のポリペプチドが、非修飾配列のポリペプチドと比較して、ＡＲＧ２に対する有意に低減した免疫原性を示さないことであると理解されるべきである。配列間の免疫原性のいずれの比較も、同じアッセイを使用して実施すべきである。特に断りのない限り、ポリペプチド配列に対する修飾は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。保存的置換では、アミノ酸が、類似の化学構造、類似の化学的特性又は類似の側鎖体積の他のアミノ酸と置き換えられる。導入されたアミノ酸は、置き換わるアミノ酸と、類似の極性、親水性、疎水性、塩基性度、酸性度、中性度又は電荷を有し得る。あるいは、保存的置換では、既存の芳香族又は脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族又は脂肪族である別のアミノ酸を導入し得る。保存的アミノ酸変化は、当技術分野で周知であり、下記の表Ａ１に定義される２０個の主要アミノ酸の特性に従って選択してもよい。アミノ酸が類似の極性を有する場合、これは、表Ａ２におけるアミノ酸側鎖に関する疎水性親水性指標を参照することによって、決定することができる。

【００４０】

【表１－１】

表 A1 - アミノ酸の化学的特性

Ala (A)	脂肪族、疎水性、中性	Met (M)	疎水性、中性
Cys (C)	極性、疎水性、中性	Asn (N)	極性、親水性、中性
Asp (D)	極性、親水性、帯電 (-)	Pro (P)	疎水性、中性
Glu (E)	極性、親水性、帯電 (-)	Gln (Q)	極性、親水性、中性
Phe (F)	芳香族、疎水性、中性	Arg (R)	極性、親水性、帯電 (+)
Gly (G)	脂肪族、中性	Ser (S)	極性、親水性、中性
His (H)	芳香族、極性、親水性、帯電 (+)	Thr (T)	極性、親水性、中性
Ile (I)	脂肪族、疎水性、中性	Val (V)	脂肪族、疎水性、中性
Lys (K)	極性、親水性、帯電 (+)	Trp (W)	芳香族、疎水性、中性
Leu (L)	脂肪族、疎水性、中性	Tyr (Y)	芳香族、極性、疎水性

【００４１】

【表１－２】

表 A2 - 疎水性指標

側鎖	疎水性
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

【００４２】

本明細書に開示される任意のポリペプチドにおいて、ポリペプチドが、非修飾配列を有するポリペプチドと比較して、ＡＲＧ２に対する同等又は増大した免疫原性を示すならば、生理化学的特性（例えば、安定性）を改善するために、以下の修飾のうちいずれか１つ以上を行ってもよい：

ａ）Ｃ末端アミノ酸の対応するアミドとの置換（カルボキシペプチダーゼに対する抵抗性を増大させることができる）；

ｂ）Ｎ末端アミノ酸の対応するアシル化アミノ酸との置換（アミノペプチダーゼに対する抵抗性を増大させることができる）；

ｃ）１つ以上のアミノ酸の対応するメチル化アミノ酸との置換（タンパク質分解抵抗性を改善することができる）；

ｄ）１つ以上のアミノ酸のＤ－立体配置の対応するアミノ酸との置換（タンパク質分解抵抗性を改善することができる）。

【００４３】

本明細書に開示される任意のポリペプチドは、前記ポリペプチドが、さらなる部分を欠くポリペプチドと比較して、ＡＲＧ２に対して同等又は増大した免疫原性を示す限りにおいて、溶解性、安定性を改善するため、及び／又は製造／単離の一助となるために、少なくとも１つの付加的な部分をＮ及び／又はＣ末端に付着させてもよい。適切な部分としては、親水性アミノ酸が挙げられる。例えば、アミノ酸配列ＫＫ、ＫＲ又はＲＲを、Ｎ末端及び／又はＣ末端に付加させてもよい。他の適切な部分としては、アルブミン又はＰＥＧ（ポリエチレングリコール）が挙げられる。

【００４４】

本明細書に開示されるポリペプチドは、任意の適切な手段によって製造することができる。例えば、ポリペプチドは、当技術分野で公知の標準的な技法、例えば、Ｆｍｏｃ固相化学、Ｂｏｃ固相化学又は液相ペプチド合成を使用して、直接合成してもよい。あるいは、ポリペプチドは、細胞、通常は細菌細胞を、前記ポリペプチドをコードする核酸分子又はベクターで形質転換することによって、製造してもよい。

【００４５】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子及びベクターを提供する。本発明はまた、このような核酸又はベクターを含む宿主細胞を提供する。

【００４６】

用語「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマー型、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、又はそれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドの限定されない例としては、遺伝子、遺伝子断片、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたＤＮＡ、任意の配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。

【００４７】

本発明のポリヌクレオチドがｍＲＮＡである場合、それはｍＲＮＡワクチンとして提供され得る。前記ｍＲＮＡワクチンは、脂質ナノ粒子組成物、例えば、本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡ及びイオン化可能な脂質を含む脂質ナノ粒子組成物として処方され得る。

【００４８】

本発明のポリヌクレオチドは、単離された形態又は実質的に単離された形態で提供され得る。実質的に単離されたとは、任意の周囲の培地からのポリペプチドの実質的な、しかし完全ではない単離があり得ることを意味する。ポリヌクレオチドは、それらの使用目的を妨げない担体又は希釈剤と混合してもよく、その場合でも、実質的に単離されたとみなされ得る。選択されたポリペプチドを「コードする」核酸配列は、例えば、発現ベクターにおける適切な調節配列の制御下に置かれた場合に、ｉｎ　ｖｉｖｏでポリペプチドに転写（ＤＮＡの場合）及び翻訳（ｍＲＮＡの場合）される核酸分子である。コード配列の境界は、５’（アミノ）末端の開始コドン及び３’（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。本発明の目的で、このような核酸配列としては、限定されるものではないが、ウイルス由来のｃＤＮＡ、原核生物又は真核生物のｍＲＮＡ、ウイルス又は原核生物のＤＮＡ又はＲＮＡ由来のゲノム配列、及びさらには合成ＤＮＡ配列を挙げることができる。転写終結配列は、コード配列に対して３’に位置し得る。

【００４９】

ポリヌクレオチドは、Ｓａｍｂｒｏｏｋら(1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)における例により説明されるように、当技術分野で周知の方法に従って合成することができる。本発明の核酸分子は、挿入配列に動作可能に連結された調節配列を含み、それにより、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける本発明のポリペプチドの発現を可能とする発現カセットの形態で提供され得る。次に、これらの発現カセットは、通常は、ベクター（例えば、プラスミド又は組換えウイルスベクター）内で提供される。このような発現カセットは、宿主対象に直接投与してもよい。あるいは、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを、宿主対象に投与してもよい。好ましくは、ポリヌクレオチドは、遺伝子ベクターを用いて調製及び／又は投与される。適切なベクターは、十分な量の遺伝情報を運び、本発明のポリペプチドの発現を可能とすることができる任意のベクターであり得る。

【００５０】

したがって、本発明は、このようなポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。このような発現ベクターは、分子生物学の技術分野で慣例的に構築され、例えば、プラスミドＤＮＡ及び適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー及び他の要素、例えば、本発明のペプチドの発現を可能とするために、必要であり得る、及び正確な方向で位

置するポリアデニル化シグナルの使用が関与し得る。他の適切なベクターは、当業者に明らかであろう。この点に関するさらなる例については、Ｓａｍｂｒｏｏｋら(1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)を参照する。

【００５１】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを発現するように改変されている細胞を含む。このような細胞は、通常は、細菌細胞、例えば大腸菌などの原核細胞を含む。このような細胞は、本発明のポリペプチドを製造するために、慣用的な方法を用いて培養してもよい。

【００５２】

本発明のポリペプチドは、実質的に単離された形態であり得る。本発明のポリペプチドは、使用目的を妨げない担体、保存剤、もしくは希釈剤（以下で考察する）、及び／又はアジュバント（これも以下で考察する）と混合してもよく、その場合でも、実質的に単離されたとみなされ得る。本発明のポリペプチドはまた、実質的に精製された形態であってもよく、その場合、本発明のポリペプチドは、一般に、製剤中に少なくとも９０％、例えば、少なくとも９５％、９８％又は９９％のタンパク質を含む。

【００５３】

ポリペプチドを含む組成物

別の側面において、本発明は、本発明のポリペプチド及び／又は本発明のポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。例えば、本発明は、本発明の１つ以上のポリペプチド及び／又は本発明の1つ以上のポリヌクレオチドと、任意で少なくとも１つのアジュバント、薬学上許容可能な担体、保存剤及び／又は賦形剤とを含む組成物を提供する。

【００５４】

組成物は、本発明の少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つの異なるポリペプチド、及び任意で少なくとも１つのアジュバント、薬学的に許容される担体、保存料及び／又は賦形剤を含み得る。

【００５５】

組成物は、本発明の少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つの異なるポリヌクレオチド、及び任意で少なくとも１つのアジュバント、薬学的に許容される担体、保存料及び／又は賦形剤を含み得る。

【００５６】

担体、保存剤及び賦形剤は、組成物の他の成分と適合する、及び組成物が投与される対象にとって有害ではないという意味で、「許容可能」でなければならない。通常は、すべての成分及び最終組成物は、無菌かつパイロジェンフリーである。組成物は、医薬組成物であり得る。組成物は、好ましくは、アジュバントを含み得る。

【００５７】

アジュバントは、組成物へのその混合が、組成物により誘発される免疫応答を増大又はそうでなければ修飾する、任意の物質である。広く定義されるアジュバントは、免疫応答を促進する物質である。アジュバントはまた、投与部位からの有効薬剤の緩徐かつ持続した放出ももたらすという点で、好ましくは、デポ効果を有し得る。アジュバントに関する一般的な考察は、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (第2版, 1986) 61-63頁において提供されている。

【００５８】

アジュバントは、ＡｌＫ（ＳＯ４）２、ＡｌＮａ（ＳＯ４）２、ＡｌＮＨ４（ＳＯ４）、シリカ、ミョウバン、Ａｌ（ＯＨ）３、Ｃａ３（ＰＯ４）２、カオリン、炭素、水酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＤＭＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ＣＧＰ１１６８７、ノル－ＭＤＰともいう）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＣＧＰ１９８３５Ａ

、ＭＴＰ－ＰＥともいう）、２％スクアレン／ツイーン－８０．ＲＴＭ．エマルション中のＲＩＢＩ（ＭＰＬ＋ＴＤＭ＋ＣＷＳ）、リピドＡを含むリポ多糖及びその種々の誘導体、フロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）、フロイント不完全アジュバント、メルクアジュバント６５、ポリヌクレオチド（例えば、ポリＩＣ及びポリＡＵ酸）、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)由来のワックスＤ、コリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、及びブルセラ属のメンバーに認められる物質、Ｔｉｔｅｒｍａｘ、ＩＳＣＯＭＳ、Ｑｕｉｌ　Ａ、ＡＬＵＮ（ＵＳ５８７６７及び５，５５４，３７２を参照のこと）、リピドＡ誘導体、コレラ毒素誘導体、ＨＳＰ誘導体、ＬＰＳ誘導体、合成ペプチドマトリックス又はＧＭＤＰ、インターロイキン１、インターロイキン２、モンタニドＩＳＡ－５１及びＱＳ－２１からなる群から選択され得る。種々のサポニン抽出物も、免疫原性組成物におけるアジュバントとして有用であることが示唆されている。顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）も、アジュバントとして使用してもよい。

【００５９】

本発明とともに使用される好ましいアジュバントとしては、油／界面活性剤ベースのアジュバント、例えば、モンタニドアジュバント（Ｓｅｐｐｉｃ社、ベルギーから入手可能）、好ましくは、モンタニドＩＳＡ－５１が挙げられる。他の好ましいアジュバントは、細菌ＤＮＡベースのアジュバント、例えば、ＣｐＧオリゴヌクレオチド配列を含むアジュバントである。さらに他の好ましいアジュバントは、ウイルスｄｓＲＮＡベースのアジュバント、例えば、ポリＩ：Ｃである。ＧＭ－ＣＳＦ及びイミダゾキノリンも、好ましいアジュバントの例である。

【００６０】

アジュバントは、最も好ましくは、モンタニドＩＳＡアジュバントである。モンタニドＩＳＡアジュバントは、好ましくは、モンタニドＩＳＡ５１又はモンタニドＩＳＡ７２０である。

【００６１】

Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (第2版, 1986)61-63頁において、目的の抗原が低分子量であるか、又は免疫原性が不十分な場合、免疫原性担体へのカップリングが推奨されることも記載されている。したがって、本発明のポリペプチドを、担体にカップリングしてもよい。担体は、アジュバントと独立して存在し得る。担体の機能は、例えば、活性もしくは免疫原性を増大させるため、安定性を付与するため、生物活性を増大させるため、又は血清中半減期を増大させるために、ポリペプチド断片の分子量を増加させることであり得る。さらに、担体は、ポリペプチド又はその断片をＴ細胞に提示する助けとなり得る。したがって、組成物において、ポリペプチドは、以下に記載するような担体と会合し得る。

【００６２】

担体は、当業者に公知の任意の適切な担体、例えば、タンパク質又は抗原提示細胞、例えば樹状細胞（ＤＣ）であり得る。担体タンパク質としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清タンパク質（トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、サイログロブリンもしくはオボアルブミン、免疫グロブリン等）、又はホルモン（インスリン等）又はパルミチン酸が挙げられる。あるいは、担体タンパク質は、破傷風トキソイド又はジフテリアトキソイドであり得る。あるいは、担体は、デキストラン、例えばセファロースであり得る。担体は、ヒトに対して生理学的上許容可能であり、安全でなければならない。

【００６３】

組成物が賦形剤を含む場合、賦形剤は、組成物の他の成分と適合する、及びそのレシピエントにとって有害ではないという意味で、「薬学上許容可能」でなければならない。補助物質、例えば、湿潤剤又は乳化剤、ｐＨ緩衝物質などが、賦形剤中に存在してもよい。これらの賦形剤及び補助物質は、一般に、組成物を投与される個体において免疫応答を誘導せず、過度の毒性を伴わずに投与することができる医薬品である。薬学上許容可能な賦

形剤としては、限定されるものではないが、水、生理食塩水、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロール及びエタノール等の液体が挙げられる。薬学上許容可能な塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩も含まれ得る。薬学上許容可能な賦形剤、ビヒクル及び補助物質の完全な考察は、Remington’s Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)において入手可能である。

【００６４】

適切な組成物の処方は、標準的な医薬処方化学及び方法（これらはすべて、当業者にとって容易に入手可能である）を用いて、実施することができる。このような組成物は、ボーラス投与又は連続投与にとって適切な形態で、調製、包装、又は販売され得る。注射用組成物は、単位投与形、例えば、アンプル又は場合により保存剤を含有する多回投与容器で、調製、包装、又は販売され得る。組成物としては、限定されるものではないが、懸濁液、溶液、油性又は水性ビヒクル中のエマルション、ペースト、及び埋込み型徐放性製剤又は生分解性製剤が挙げられる。組成物の一つの実施形態において、有効成分は、再構成された組成物の投与前に、適切なビヒクル（例えば、無菌パイロジェンフリー水）で再構成するために、乾燥（例えば、粉末又は顆粒）形態で提供される。組成物は、無菌注射用の水性又は油性の懸濁液又は溶液の形態で、調製、包装、又は販売され得る。この懸濁液又は溶液は、公知の技術に従って処方され得、有効成分に加えて、本明細書に記載のアジュバント、賦形剤及び補助物質等の追加の成分を含み得る。このような無菌注射用製剤は、例えば、水又は１，３－ブタンジオールなどの無毒の非経口的に許容可能な希釈剤又は溶媒を用いて調製され得る。他の許容可能な希釈剤及び溶媒としては、限定されるものではないが、リンゲル液、等張食塩水、及び、合成モノ又はジグリセリド等の固定油が挙げられる。有用な他の組成物としては、微結晶形で、リポソーム調製物中に、又は生分解性ポリマー系の成分として、有効成分を含む組成物が挙げられる。徐放又は埋込みのための組成物は、薬学上許容可能なポリマー性又は疎水性材料、例えば、エマルション、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、又は難溶性塩を含み得る。あるいは、組成物の有効成分は、カプセル化され得る、粒子状担体に吸着され得る、又は粒子状担体と会合し得る。適切な粒子状担体としては、ポリメチルメタクリレートポリマーに由来する担体、ならびにポリ（ラクチド）及びポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）に由来するＰＬＧ微粒子が挙げられる。例えば、Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368を参照されたい。他の微粒子系及びポリマー、例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジンなどのポリマー、及びこれらの分子のコンジュゲートも使用することができる。

【００６５】

使用方法

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド又は組成物は、対象における疾患又は病態を治療又は予防する方法において使用され得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド又は組成物は、対象における疾患又は病態を治療又は予防する方法における使用のための薬剤の製造において使用され得る。方法は、前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド又は前記組成物を前記対象に投与することを含む。投与は、治療上又は予防上有効な量の前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド又は前記組成物を、それを必要とする対象に投与するものであり得る。

【００６６】

疾患又は病態は、ＡＲＧ２の不適切な又は過剰な免疫抑制機能を少なくとも部分的に特徴とし得る。疾患又は病態は、癌、好ましくは、ＡＲＧ２を発現する、及び／又はＡＲＧ２の不適切なもしくは過剰な免疫抑制機能と関連する癌であり得る。癌は、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、脳癌、膵臓癌、頭頸部癌、もしくは小腸癌であってもよく、又は、結腸直腸癌もしくは胃癌であってもよく、又は黒色腫であってもよく、又は急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、もしくは慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）などの白血病であってもよい。好ましくは、癌は黒色腫（悪性黒色腫など）、ＣＭＬ、又は膵臓癌

である。癌は、ＡＲＧ２の不適切なもしくは過剰な免疫抑制機能によって特徴付けられるＣＭＬであってもよい。癌は、ＡＲＧ２の不適切なもしくは過剰な免疫抑制機能によって特徴付けられる黒色腫であってもよい。癌は、ＡＲＧ２の不適切もしくは過剰な免疫抑制機能によって特徴付けられる悪性黒色腫であってもよい。癌は、膵臓癌であってもよい。ＡＲＧ２の過剰な免疫抑制機能は、少なくとも部分的には、ＡＲＧ２の発現を特徴とする活性化Ｔｒｅｇ細胞によって媒介され得る。ＡＲＧ２の過剰な免疫抑制機能は、少なくとも部分的には、ＡＲＧ２の発現を特徴とする癌関連線維芽細胞（ＣＡＦ）によって媒介され得る。癌は、他の癌治療に耐性を有し得る、特に抗ＰＤ１療法などの免疫系チェックポイント阻害剤に耐性を有し得る。

【００６７】

方法は、併用する癌療法との同時投与又は逐次投与を含み得る。併用する癌療法は、サイトカイン療法、Ｔ細胞療法、ＮＫ療法、免疫系チェックポイント阻害剤、化学療法、放射線療法、免疫刺激物質（追加のワクチンなど）、遺伝子療法、又は抗体から選択され得る。

【００６８】

免疫系チェックポイント阻害剤は、特に追加の癌療法とすることが好ましい。ＡＲＧ２に対するワクチン療法は、免疫系チェックポンと阻害剤との併用で相乗効果を奏し得る。免疫系チェックポイントの例としては下記が挙げられる：

ａ）インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ１）とその基質の相互作用
ｂ）ＰＤ１とＰＤＬ１及び／又はＰＤ１とＰＤＬ２の相互作用
ｃ）ＣＴＬＡ４とＣＤ８６及び／又はＣＴＬＡ４とＣＤ８０の相互作用
ｄ）Ｂ７－Ｈ３及び／又はＢ７－Ｈ４と、それぞれのリガンドの相互作用
ｅ）ＨＶＥＭとＢＴＬＡの相互作用
ｆ）ＧＡＬ９とＴＩＭ３の相互作用
ｇ）ＭＨＣクラスＩ又はＩＩとＬＡＧ３の相互作用
ｈ）ＭＨＣクラスＩ又はＩＩとＫＩＲの相互作用

チェックポイント（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）の阻害は、追加の癌療法として特に好ましい。

【００６９】

チェックポイント阻害剤は、免疫系チェックポイントを遮断又は阻害する任意の免疫調節剤（抗体など）であってもよく、又は、免疫系チェックポイントの成分もしくは前記成分の免疫原性断片を含む免疫療法組成物であって、免疫系におけるチェックポイントの標的化を刺激する免疫療法組成物であってもよい。

【００７０】

追加の癌療法は、抗体であってもよい。

【００７１】

抗体は、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アクトクスマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アフェリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブペゴール、ＡＬＤ５１８、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、アナツモマブマフェナトクス、アンルキンズマブ、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アチヌマブ、アトリズマブ（＝トシリズマブ）、アトロリムマブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、ベバシズマブ、ベズロトクスマブ、ビシロマブ、ビマグルマブ、ビバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブロソズマブ、ブレンツキシマブベドチン、ブリアキヌマブ、ブロダルマブ、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カプラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、ＣＣ４９、セデリズマブ、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ、Ｃｈ．１４．１８、シタツズマブボガトクス、シクスツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、コナツムマブ、コンシズマブ、クレネズマブ、ＣＲ６２６１、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダラツムマブ、デムシズマブ、デノスマブ、デ

ツモマブ、ドルリモマブアリトクス、ドロジツマブ、ドゥリゴツマブ、デュピルマブ、ドゥシギツマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エナバツズマブ、エンリモマブペゴール、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エトロリズマブ、エボロクマブ、エクスビビルマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、ファシヌマブ、ＦＢＴＡ０５、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フランボツマブ、フォントリズマブ、フォラルマブ、フォラビルマブ、フレソリムマブ、フルラヌマブ、フツキシマブ、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブベドチン、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、ＧＳ６６２４、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イゴボマブ、イムシロマブ、イムガツズマブ、インクラクマブ、インダツキシマブラブタンシン、インフリキシマブ、インテツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、ランパリズマブ、レブリキズマブ、レマレソマブ、レルデリムマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リゲリズマブ、リンツズマブ、リリルマブ、ロデルシズマブ、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マスリモマブ、マブリリムマブ、マツズマブ、メポリズマブ、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、モガムリズマブ、モロリムマブ、モタビズマブ、モキセツモマブパスドトクス、ムロモナブ－ＣＤ３、ナコロマブタフェナトクス、ナミルマブ、ナプツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペンタン、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、オズリモマブ、オファツムマブ、オララツマブ、オロキズマブ、オマリズマブ、オナルツズマブ、オポルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、オルチクマブ、オテリキシズマブ、オキセルマブ、オザネズマブ、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パノバクマブ、パルサツズマブ、パスコリズマブ、パテクリズマブ、パトリツマブ、ペムツモマブ、ペラキズマブ、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、ピジリズマブ、ピナツズマブベドチン、ピンツモマブ、プラクルマブ、ポラツズマブベドチン、ポネズマブ、プリリキシマブ、プリトキサキシマブ、プリツムマブ、ＰＲＯ１４０、キリズマブ、ラコツモマブ、ラドレツマブ、ラフィビルマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レガビルマブ、レスリズマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、ロレズマブ、ロモソズマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルピリズマブ、サマリズマブ、サリルマブ、サツモマブペンデチド、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セビルマブ、シブロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、シプリズマブ、シルクマブ、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネプシズマブ、ソンツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スビズマブ、タバルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タプリツモマブパプトクス、テフィバズマブ、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロツムマブ、ＴＧＮ１４１２、チシリムマブ（＝トレメリムマブ）、チルドラキズマブ、チガツズマブ、ＴＮＸ－６５０、トシリズマブ（＝アトリズマブ）、トラリズマブ、トシツモマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、ＴＲＢＳ０７、トレガリズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、ウブリツキシマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バパリキシマブ、バテリズマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ又はゾリモマブアリトクスであり得る。

【００７２】

好ましい抗体としては、ナタリズマブ、ベドリズマブ、ベリムマブ、アタシセプト、アレファセプト、オテリキシズマブ、テプリズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、オク

レリズマブ、エプラツズマブ、アレムツズマブ、アバタセプト、エクリズマブ、オマリズマブ、カナキヌマブ、メポリズマブ、レスリズマブ、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ブリアキヌマブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴール、ゴリムマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、イブリツモマブ、チウキセタン、トシツモマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、パニツムマブ、デノスマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ及びベドチンが挙げられる。

【００７３】

本発明の方法において使用され得る特に好ましい抗体としては、ダラツムマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、アベルマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、トシツモマブ及びオファツムマブが挙げられる。ニボルマブ等の抗ＰＤ１抗体も特に好ましい。ペムブロリズマブが最も好ましい。

【００７４】

併用する癌療法は、アクチミド、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イリノテカン、レナリドミド、ロイコボリン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、レブラミド、テモゾロミド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビンからなる群から選択され得る。

【００７５】

本発明の組成物のポリペプチドは、細胞を前記ポリペプチド又は組成物に接触させることを含む、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞、例えば、ＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞を刺激する方法においても使用され得る。方法は、ｅｘ　ｖｉｖｏで行ってもよい。方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏで行ってもよい。細胞は、健常対象又は癌患者から採取されたサンプル、例えば、腫瘍サンプル中に存在し得る。細胞は、健康対象から採取されたサンプル又は癌患者から採取されたサンプル、例えば腫瘍サンプル中に存在してもよい。方法は、ＣＤ８＋Ｔ細胞を刺激する方法であってもよい。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞であってもよい。ＣＤ８＋Ｔ細胞を刺激する方法で使用されるポリペプチドは、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩ制限エピトープ、任意にＨＬＡ－Ｂ８制限エピトープを含み得る、又はそれからなり得る。例えば、ＮＬＩＶＮＰＲＳＶ（配列番号５）のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなってもよいポリペプチドは、ＣＤ８＋Ｔ細胞、特に細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞を刺激する方法で使用されてもよい。

【００７６】

本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、これらの実施例は、保護の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。前述の説明及び以下の実施例に開示される特徴は、両方とも別々に、またその任意の組合せにおいて、その多様な形態で本発明を実現するための材料であり得る。

【実施例】

【００７７】

実施例１－材料及び方法

ドナー材料

健常ドナーのＰＢＭＣは、Ｌｙｍｐｈｏｏｐｒｅｐ（商標）（Ａｌｅｒｅ社）上での密度勾配分離を用いて単離し、１０％硫化ジメチル（ＤＭＳＯ）を添加したウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）中、－１５０℃で低温保存した。固形腫瘍を有する癌患者由来のＰＢＭＣは、療法の投与から最低４週間後に血液サンプルから得た。ＰＢＭＣは、５％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ社）を添加したＸ－Ｖｉｖｏ（ＢｉｏＮｏｒｄｉｋａ社）中で維持した。総ての患者プロトコールは、デンマーク

首都圏科学倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言の規定に従って実施された。試験登録前に患者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。

【００７８】

ペプチド

ペプチド配列は、www.syfpeithi.de_and cbs.dtu.dk.で利用可能なアルゴリズムを用いて予測した。スコアが２４を超えるペプチド（ＳＹＦＰＥＩＴＨＩ）又はランクが１．５未満であるペプチド（ＮｅｔＭＨＣ）のみを含めるために短いペプチドのリストを選択した。ペプチドは総てＳｃｈａｅｆｅｒにより合成され、９０％を超える純度であった。ペプチドは、保存濃度が１０ｍＭとなるように１００％ＤＭＳＯに溶解させるか、又は２ｍＭの濃度になるように無菌水に溶解させた。水に溶解させたペプチドは、使用前に濾過除菌した。本試験で使用した総てのペプチドを表１に示す。

【００７９】

ｉｎ ｖｉｔｒｏ刺激及びＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ

健常ドナー又は癌患者由来のＰＢＭＣは、細胞を１０μＭペプチドとともに蒔くことにより、ＡＲＧ２由来ペプチドによるｉｎ ｖｉｔｒｏ刺激に供した。翌日、これらの細胞に低用量ＩＬ－２（１２０Ｕ／ｍｌ）処理を施した。ペプチド刺激後１０～１４日後、細胞をＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴに使用した。ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、７．５μｇ／μｌのＩＦＮγ捕捉抗体（ＭａｂＴｅｃｈ社）で一晩コーティングした。翌日、これらのプレートを洗浄し、Ｘ－ｖｉｖｏ培地でブロッキングした後、ＥＬＩＳＰＯＴのために、５μＭのペプチドでの再刺激を伴って、及び伴わずに、２．５～３．５×10^5のＰＢＭＣを蒔いた。各条件につき最低三重反復のウェルを設定した。これらの細胞を１４～１６時間インキュベートした後に洗浄し、ビオチン結合二次抗体（Ｍａｂｔｅｃｈ社）を添加し、次いで２時間インキュベートした。

【００８０】

次に、これらの細胞を再び洗浄し、次いでストレプトアビジン結合アルカリ性ホスファターゼ（Ｍａｂｔｅｃｈ社）とともに１時間インキュベートした。最後に、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質（Ｍａｂｔｅｃｈ社）を添加してスポットを現像した。水道水を用いて反応を停止させた。ＩＦＮγ分泌に相当するスポットを、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔソフトウエアバージョン５．１を用い、ＣＴＬ ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ Ｓ６ Ｕｌｔｉｍａｔｅ－Ｖアナライザーで可視化することにより定量した。

【００８１】

ペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞は、ペプチドで刺激したウェルの平均スポット数から対照ウェルの平均スポット数を差し引くことで計算した。ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞（エフェクター細胞）及び種々の免疫細胞又は癌細胞を標的細胞とするＥＬＩＳＰＯＴアッセイは、ＥＬＩＳＰＯＴウェルに３×10^4～５×10^4のエフェクター細胞を添加し、その後５×10^3～10^4の標的細胞を添加することにより設定した。ペプチドの播種は、標的細胞を２０μＭのペプチドとともに１時間インキュベートした後に２回洗浄して結合していないペプチドを除去することにより行った。ペプチドを添加したエフェクター細胞を陽性対照とし、標的細胞を伴わずに蒔いた標的細胞を陰性対照とした。免疫細胞を標的細胞とするＥＬＩＳＰＯＴアッセイでは、エフェクター細胞のみを含むウェルも対照として含めた。複製ウェルからの平均スポット数を、それぞれの標的細胞とともに蒔いたエフェクター細胞のスポット数から差し引いた。

【００８２】

ｅｘ ｖｉｖｏ ＥＬＩＳＰＯＴ

ＰＢＭＣを解凍し、一晩静止させた。翌日、ウェルあたり９×10^5の細胞を蒔いた。対照刺激及びペプチド刺激は、少なくとも三重反復で行った。残りのプロトコールは上記のように行った。

【００８３】

細胞株

Ｋ５６２、Ｋ５６２－Ａ１、ＦＭ６、ＦＭ２８、及びＦＭ８２細胞株は、１０％ＦＢＳ

を添加したＲＭＰＩ－１６４０（Ｇｉｂｃｏ社）中で維持した。ＯＣＩ－Ｍ２は、２０％ＦＢＳを含むＩｓｃｏｖｅ‘ｓ　ＭＤＭ（Ｇｉｂｃｏ社）中で維持した。細胞は２～３日ごとに継代培養した。接着細胞（ＦＭ６、ＦＭ２８、及びＦＭ８２）は、０．２５％トリプシン（Ｇｉｂｃｏ社）でフラスコから解離した後に継代培養した。総ての細胞株は、マイコプラズマ陰性であることを確認した。

【００８４】

細胞内サイトカイン染色

ＰＢＭＣを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで上記のようにペプチドで刺激した。刺激後１０～１４日目に、これらの細胞を細胞内サイトカイン染色に使用した。細胞をペプチド又は無ペプチド対照及びＣＤ１０７ａ－ＰＥ（ＢＤ社）とともに１時間インキュベートした後、ＧｏｌｇｉＰｌｕｇ（ＢＤ社）を添加した。４時間のインキュベーション期間の後、細胞を洗浄し、細胞外マーカーＣＤ３－ＡＰＣ／Ｈ７、ＣＤ４－ＦＩＴＣ、及びＣＤ８－ＰｅｒＣＰに関して染色し、死細胞をＦＶＳ－５１０で染色した。次に、Ｆｉｘａｔｉｏｎ／Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎバッファー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて細胞に透過処理を施した後、ＩＦＮγ－ＡＰＣ及びＴＮＦα－ＢＶ４２１で染色した。データはＢＤ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメーターを用いて取得し、ＦｌｏｗＪｏを用いて解析した。ゲート設定戦略を図１０に示し、本試験に使用した抗体を表２に挙げる。

【００８５】

【表２】

表２－ 本試験に使用した抗体の一覧

標的	蛍光色素	クローン，カタログ番号，製造者	用途
CD3	APC-H7	SK7, 641415, BD	ICS
CD4	FITC	SK3, 345768, BD	ICS
CD8	PerCP	SK1, 345774, BD	ICS
CD107a	PE	H4A3, 560948, BD	ICS
IFNγ	APC	25723.11, 341117, BD	ICS
TNFα	BV421	MAb11, 562783, BD	ICS
死細胞マーカー*	BV510	N/A, 564406, BD	生存率
HLA-A02	PE	BB7.2, 558570, BD	HLA タイピング
HLA-ABC	FITC	DX17, 560168, BD	HLA タイピング
HLA-B8	PE	REA145, 130-119-137, Miltenyi Biotech	HLA タイピング
CD4	PerCP	SK3, 566924, BD	Treg 単離
CD25	Pe-Cy7	M-A251, 557741, BD	Treg 単離
CD127	FITC	HIL-7R-M21, 560549, BD	Treg 単離
FOXP3	PE	259D/C7, 560046, BD	Treg 単離
ARG2	N/A	EPR9473, ab137069, abcam	ウエスタンブロット
ビンキュリン	N/A	V284, SAB4200080, Sigma-Aldrich	ウエスタンブロット
抗ウサギ, IgG, HRP 結合	N/A	N/A, CST7074, Cell Signaling Technology	ウエスタンブロット
抗マウス, IgG, HRP 結合	N/A	N/A, CST7076, Cell Signaling Technology	ウエスタンブロット

*死細胞マーカー*d* は *Fixable Viability Stain 510* であって抗体ではない。*N/A* = 適用できず

【００８６】

ＨＬＡ発現のフローサイトメトリーベースの分析

細胞株のＰａｎ－ＨＬＡ（ＨＬＡ－ＡＢＣ社）及びＨＬＡ－Ｂ８発現レベルは、それぞれＨＬＡ－ＡＢＣ－ＦＩＴＣ（ＢＤ社）及びＨＬＡ－Ｂ８－ＰＥ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社）で染色することで分析した。ＨＬＡ陰性細胞株Ｋ５６２を用いて、ＨＬＡ－ＡＢＣ$^{+}$細胞及びＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$細胞にゲートを設定した。データはＢＤ Ｃａｎｔｏ ＩＩフローサイトメーターを用いて取得し、ＦｌｏｗＪｏを用いて解析した。本試験に使用した抗体を上の表２に挙げる。

【００８７】

ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞培養物の作製

ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞培養物は、ＰＢＭＣをＡＲＧ２－Ｓ０５ペプチドで刺激した後、翌日に低用量ＩＬ－２（１２０ＵＬ）で刺激することにより取得した。ペプチド刺激後１２日目に、細胞をペプチドで再刺激し、磁性ビーズを用いてＩＦＮγ分泌細胞単離した。次に、これらの細胞をフィーダー細胞、ＣＤ３抗体、及び抗用量ＩＬ－２（３０００～６０００Ｕ／ｍＬ）を含む迅速増殖プロトコールを用いて増殖させた。１６～１７日目に、培養物の特異性は、ＡＲＧ２－Ｓ０５ペプチドで刺激し、サイトカイン放出をＩＣＳにより測定することで決定した。

【００８８】

制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及びエフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）又は静止Ｔ細胞（Ｔｒｅｓｔ）の活性化、増殖、及び単離

ＰＢＭＣを解凍し、１０％ＦＢＳ、１％ピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ社）、及び１％非必須アミノ酸（Ｇｉｂｃｏ社）を添加したＸ－ｖｉｖｏ中、製造者の説明書に従ってＣＤ３／ＣＤ２８ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｇｉｂｃｏ社）で刺激した。ビーズ活性化後２日、５日、及び７日目に、３００Ｕ／ｍＬ ＩＬ－２を添加した。８日目に、ビーズを除去し、細胞を、ＩＬ－２を含まない培地に蒔いた。９日目に、細胞をＣＤ３－ＡＰＣ／Ｈ７、ＣＤ４－ＰｅｒＣＰ、ＣＤ２５－Ｐｅ－Ｃｙ／７、及び死細胞染色液ＦＶＳ－５１０で染色した。一部の細胞をＣＤ１２７の蛍光マイナス１（ＦＭＯ）対照として使用し、残りの細胞をＣＤ１２７－ＦＩＴＣで染色した。ＣＤ１２７－ＦＩＴＣ染色細胞から、一部を固定し、透過処理を施し、ＦＯＸＰ３に関して染色した。生集団から、ＴｒｅｇをＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５^{ｈｉｇｈ}ＣＤ１２７$^{-}$として選別し、Ｔｅｆｆ又はＴｒｅｓｔをＣＤ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５^{ｌｏｗ}ＣＤ１２７$^{+}$として選別した。選別はＢＤ ＦＡＣＳＭｅｌｏｄｙ（商標）を用いて行い、ＢＤ ＦＡＣＳＣｈｏｒｕｓソフトウエアを用いてデータを可視化した。ゲート設定戦略及び特定の選別ゲートを図８、９及び１７に示し、使用した抗体を表２に挙げる。

【００８９】

Ｔｏｔａｌ ＲＮＡの抽出

ＲＮＡ抽出のために、細胞を採取し、ＰＢＳで洗浄し、ペレットとした。細胞ペレットを、ＲＮＡ単離まで－８０℃で保存した。Ｔｏｔａｌ ＲＮＡ単離は、製造者の説明書に従ってＲＮＥａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いて行い、３０μＬのＲＮアーゼフリー水で溶出させた。ＲＮＡ濃度は、ＮａｎｏＤｒｏｐ２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて決定した。ＲＮＡは－８０℃で保存した。

【００９０】

ｃＤＮＡの合成及びＲＴ－ｑＰＣＲ

ｃＤＮＡは、ランダムプライマー及び４００～１０００ｎｇのＲＮＡを投入物とし、Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いて合成した。ＲＴ－ｑＰＣＲ分析前に、ｃＤＮＡを１：２～１：４に希釈した。ＲＴ－ｑＰＣＲ分析は、Ｒｏｃｈｅ Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ ４８０装置で、ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙを用いて行った。アッセイは三重反復で行い、結果を従前に記載されているように分析した(Ｂｏｏｋｏｕｔ ｅｔ ａｌ., Ｃｕｒｒ. Ｐｒｏｔｏｃ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. ７３, １５.８.１-１５.８.２８ (２００６))。アッセイ中に増幅がなかった低発現サンプルについては、Ｃｔ値は４０に設定した。逆転写

酵素を含まない対照もプライマーバリデーション分析に含めた。本試験で使用したプライマーを以下の表３に挙げる。

【００９１】

【表３】

表 3 - *RT-qPCR* プライマー

遺伝子	プライマーID	供給先
ARG1	Hs00163660_m1	Thermo Scientific
ARG2	Hs00982833_m1	Thermo Scientific
CTLA4	Hs00175480_m1	Thermo Scientific
FOXP3	Hs01085834_m1	Thermo Scientific
IL-10	Hs00961622_m1	Thermo Scientific
POL2RA	Hs00172187_m1	Thermo Scientific
IKZ2	Hs00212361_m1	Thermo Scientific
IL2RA	Hs00907777_m1	Thermo Scientific
TNFRSF18	Hs00188346_m1	Thermo Scientific

【００９２】

ウエスタンブロッティングのための細胞溶解液の調製

Ｓｅｔ２細胞、ＵＫＥ－１細胞及び選別したＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔ細胞を無菌ＰＢＳで２回洗浄した後、ペレットとし、－８０℃で保存した。細胞ペレットを、１：１００希釈でＨａｌｔ（商標）Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加した氷冷ＲＩＰＡ溶解バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に再懸濁した。細胞溶解液を４℃で１５分間、継続撹拌下に置いた後、４℃で１５分間、１６８００×ｇで遠心分離した。次に、上清を新しいエッペンドルフ管に移し、ＢＣＡ Ｐｒｐｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）で製造者のプロトコールに従って行うタンパク質濃度測定に使用した。

【００９３】

選別したＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現のウエスタンブロット解析

総タンパク質２０μｇに相当する容量の細胞溶解液を蒸留水、Ｂｏｌｔ（商標）Ｓａｍｐｌｅ Ｒｅｄｕｃｉｎｇ Ａｇｅｎｔ（１：１０希釈）及びＢｏｌｔ（商標）ＬＤＳサンプルバッファー（１：４希釈、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と混合して、総サンプル容量を５０μＬとした。変性を助けるためにサンプルを９９℃で１０分間インキュベートし、次いで、ＰｏｗｅｒＰａｃ ＨＶ（ＢｉｏＲａｄ社）とＢｏｌｔ（商標）ＭＥＳ ＳＤＳ Ｒｕｎｎｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて、２００Ｖで２０分間、Ｂｏｌｔ（商標）４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ Ｐｌｕｓゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で分離した。タンパク質サイズの定量を可能にするため、ＢｉｏＲａｄ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｐｌｕｓ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｕａｌ Ｃｏｌｏｒラダーを利用した。ゲルをｉＢｌｏｔ ２ ＰＶＤＦ Ｍｉｎｉｓｔａｃｋ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に移し、ｉＢｌｏｔ Ｇｅｌ ２ Ｔｒａｎｓｆｅｒデバイス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を製造者のガイドラインに従って用いてエレクトロブロッティングを行った。膜は、ＡＲＧ２タンパク質とビンキュリンタンパク質を別々に染色できるように２つに切断した。膜の両部分を、脱脂粉乳を５％添加したＴＢＳＴバッファー（０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加したＴＢＳバッファー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社））中で１時間ブロッキングした。次に、膜の一方をブロッキングバッファーで１：１，０００に希釈したＡＲＧ２特異的一次抗体とともに４℃で一晩インキュベートし、膜のもう半分をＴＢＳＴ中で一晩保持した。翌日、膜の染色されていない部分を、ブロッ

キングバッファーで１：１００，０００に希釈したビンキュリン特異抗体とともに１時間インキュベートした。その後、膜をＴＢＳＴで５分間３回洗浄した。その後、ＡＲＧ２染色膜とビンキュリン染色膜を、それぞれ抗ウサギ又は抗マウス二次抗体とともに、ブロッキングバッファーで１：２，０００希釈して１時間インキュベートした。３回の洗浄後、膜をＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ（商標）Ｗｅｓｔ Ｆｅｍｔｏ Ｍａｘｉｍｕｍ Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）で５分間現像し、ＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（Ｖ．５．２．１）を用いてＧｅｌ Ｄｏｃ（商標）ＸＲ Ｓｙｓｔｅｍ（ＢｉｏＲａｄ社）で可視化した。使用した抗体を上記の表２に挙げる。

【００９４】

細胞傷害性アッセイ

Ａｎｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ. Ｊ. Ｉｍｍｕｎｏｌ. １６３, ３８１２-３８１８ (１９９９)に従前に記載されているように、従来の^{51}Ｃｒ放出アッセイを行い、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞の細胞傷害性を評価した。簡単に述べれば、標的細胞を１００μＣｉの放射性^{51}Ｃｒで１時間標識した後、２回洗浄して、細胞外の余分な^{51}Ｃｒを除去した。エフェクター細胞及び標的細胞を種々のエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で蒔き、４時間インキュベートした。次に、１００μＬの上清を回収し、^{51}Ｃｒ放出を、２４７０ Ａｕｔｏｍａｔｉｃ γカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社）を用いて決定した。最大^{51}Ｃｒ放出は別のウェルで、標的細胞に１００μＬの１０％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘを添加することで決定した。自発的な標的細胞溶解は、他のウェルで、標的細胞を培地単独でインキュベートすることで決定した。アッセイは総てのＥ：Ｔ比で技術的二重反復を用いて設定し、最大及び最小放出ウェルは、六重の技術的反復を用いて設定した。

【００９５】

ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｔｒｅｇ抑制アッセイ

刺激開始後８日目に、磁性ビーズ分離（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社）を用いて、Ｔｒｅｇ／Ｔｒｅｓｔ選別に使用した活性化ＰＢＭＣのＣＤ８陽性画分を単離した。選別した細胞の純度は、細胞をＣＤ３－ＡＰＣ／Ｈ７、ＣＤ８－ＦＩＴＣ及びＦＶＳ－５１０で染色した後にフローサイトメトリーにより評価した。翌日、ＣＤ８ Ｔ細胞を濃度５μＭのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（ＣＦＳＥ）色素（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ社）で染色した。次に、１．５×１０^{5}のＣＦＳＥ標識ＣＤ８ Ｔ細胞を丸底９６ウェルプレートで０．３×１０^{5}の選別精製したＴｒｅｇ又はＴｒｅｓｔ細胞とともに共培養した。共培養開始の１日後に、細胞を１：２５比でヒトＴアクチベーター抗ＣＤ３／ＣＤ２８Ｄｙｎａビーズ（Ｇｉｂｃｏ社）で刺激し、３００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２を添加した。ＣＤ８ Ｔ細胞の増殖状態は、共培養開始後０日目と５日目にフローサイトメトリーを用いて分析した。細胞をＣＤ４－ＰｅｒＣＰで染色することで、ＣＦＳＥ標識ＣＤ８ Ｔ細胞からＴｒｅｇ／Ｔｒｅｓｔ細胞を区別することができた。各分析時点について、三重の技術的反復を設定した。データはＢＤ Ｃａｎｔｏ ＩＩフローサイトメーターを用いて取得し、ＦＣＳ Ｅｘｐｒｅｓｓ Ｖ．７及びＦｌｏｗＪｏ Ｖ．１０を用いて解析した。使用した抗体を上記の表２に挙げる。

【００９６】

活性化ＰＢＭＣとエフェクターＴ細胞の共培養におけるＴｒｅｇ／Ｔｒｅｓｔ集団分析

刺激開始後９日目に、７．５×１０^{5}の活性化ＰＢＭＣを単独で、又は５×１０^{5}のＡＲＧ２特異的ＣＤ８ Ｔ細胞もしくは５×１０^{5}の自己対照ＣＤ８ Ｔ細胞のいずれかとともにインキュベートした。対照ＣＤ８ Ｔ細胞は、上記のように活性化ＰＢＭＣから単離した。細胞を４８ウェルプレートで６時間培養し、その後、上記のＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔの選別と同じ手順を用いて染色した。さらに、活性化ＰＢＭＣのみを含むサンプルに基づいて、同様のゲート設定戦略を利用した（図９）。ＡＲＧ２特異的ＣＤ８ Ｔ細胞又は対照ＣＤ８ Ｔ細胞を含むサンプルのＴｒｅｇ及びＴｒｅｓｔの集団サイズを、活性化ＰＢＭＣのみを含むサンプルと比較して、２つの集団の減少パーセントを求めた。Ｔ細胞を添加した両条件には三重の技術的反復を含め、活性化ＰＢＭＣ単独の条件には六重の技

術的反復を含めた。
【００９７】
動物実験
動物実験はコペンハーゲン大学病院ヘレフ腫瘍科の動物施設で行った。実験は実験動物福祉に関するデンマーク倫理委員会(the Danish Ethics Committee on Experimental Animal Welfare)（Ｄｙｒｅｆｏｒｓｏｇｓｔｉｌｓｙｎｅｔ）の承認を得て行った。Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６ＪＢｏｍＴａｃを背景に自家繁殖させた。日常的な世話は動物施設の世動物飼育員が行った。
【００９８】
ペプチドワクチン接種
マウスＡＲＧ１ペプチド（ｍＡＲＧ１＿１６９－１７７、ＩＳＡＫＤＩＶＹＩ（配列番号２２））はＳｃｈａｆｅｒ社により合成され、ＤＭＳＯに溶解して保存濃度１０ｍＭとした。マウスＡＲＧ２ペプチド（ｍＡＲＧ２＿１８８－１９６、ＬＳＰＰＮＩＶＹＩ（配列番号２１））はＰｅｐＳｃａｎ社又はＳｃｈａｆｅｒ社により合成され、無菌水に溶解した保存濃度２ｍＭとした。ＡＲＧ２ペプチドは使用前に、無菌の０．２２μｍフィルターを通して濾過した。総ての合成ペプチドの純度は＞９０％であった。本試験に使用した総てのペプチドを表１に挙げる。ＡＲＧ２ペプチド（１００μｇ）を容量５０μＬの無菌水に懸濁し、モンタニドＩＳＡ　５１（Ｓｅｐｐｉｃ社）で１：１の乳化を行った。対照ワクチンは５０μＬの無菌水を含み、モンタニドで１：１の乳化を行った。マウスの尾の基部の皮下に１００μＬの対照又はペプチド乳剤を接種した。腫瘍試験では、腫瘍接種後、１日目と１７日目（Ｐａｎ０２）、０日目と７日目（ＭＣ３８）又は０日目と５日目（Ｂ１６－Ｆ１０及びＬＬ２）にマウスにワクチン接種を行った。残りの試験では、接種間を最低１週間あけて１～３回のワクチン接種をマウスに行った。
【００９９】
腫瘍試験
Ｐａｎ０２、ＭＣ３８、Ｂ１６－Ｆ１０及びＬＬ２細胞株を接種の１週間前に解凍し、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）及び１％ペニシリン及びストレプトアビジン（Ｐ／Ｓ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を含むＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ社）中で培養した。
【０１００】
雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスの右側腹部の皮下に５×10^5のＰａｎ０２、ＭＣ３８、Ｂ１６－Ｆ１０又はＬＬ２細胞を接種した。腫瘍体積をデジタルノギスで測定し、（長さ×幅^2）／２として計算した。実験のエンドポイントは、腫瘍体積が１０００ｍｍ３を超えるか又は腫瘍の潰瘍化が存在する場合と定義した。腫瘍測定を行った調査員は、処置群に対して盲検化されていた。
【０１０１】
マウスＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ
マウスは、腫瘍試験ではエンドポイントで、残りの試験では最後のワクチン接種の１週間後に犠死させた。脾臓を採取し、７０μｍのフィルターで破砕し、Ｒｅｄ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｅｌｌ　Ｌｙｓｉｓ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｑｉａｇｅｎ社）で赤血球を溶解した。８×10^5の脾細胞をＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴプレートに蒔いた。ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴは従前に記載されているように行った。腫瘍を採取し、小片に切断し、２．１ｍｇ／ｍｌのコラゲナーゼ１型（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ社）、７５μｇ／ｍｌのＤＮａｓｅ　Ｉ（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ社）、５ｍＭのＣａＣｌ２、及び１％Ｐ／Ｓを含むＲＰＭＩ培地中で酵素的に消化した。細胞を７０μｍのセルストレーナーで濾過し、赤血球を上記のように溶解した。ＣＤ４５＋腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を、ＣＤ４５マイクロビーズ（ＭＣ３８及びＬＬ２腫瘍用）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）又はＣＤ４５（ＴＩＬ）マイクロビーズ（Ｂ１６－Ｆ１０腫瘍用）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）を用いて腫瘍単細胞懸濁液から単離した。単離したＣＤ４５＋細胞を一晩静止させた。ウェルあたり５×10^5のＣＤ４５＋細胞をＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴプレートに蒔いた。Ａ

ＲＧ２応答の表現型を決定するために、それぞれＣＤ８ａ（Ｌｙ－２）及びＣＤ４＋（Ｌ３Ｔ４）マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社）を用いて、ワクチン接種マウスの脾臓からＣＤ８＋及びＣＤ４＋　Ｔ細胞を、製造者の説明書に従って単離した。単離したＴ細胞を一晩静止させた。２．８×１０^{5}のＣＤ８＋又はＣＤ４＋　Ｔ細胞を、ナイーブマウス（抗原提示細胞として使用）由来の６×１０^{5}の脾細胞とともにＩＦＮγＥＬＩＳＰＯＴプレートに蒔いた。ペプチド特異的応答は、ペプチド刺激ウェルと非刺激ウェル間の平均スポット数の差として報告した。

【０１０２】

腫瘍ＲＮＡの抽出及びＲＮＡシークエンシング

腫瘍断片（≦３０ｍｇ）をＲＮＡｌａｔｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）中、－８０℃で保存した。腫瘍をＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社）でホモジナイズし、製造者の説明書に従ってＲＮＥａｓｙ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いてＲＮＡを抽出した。ＲＮＡ濃度をＮａｎｏｄｒｏｐ　２０００分光光度計で測定した。単離されたＲＮＡを－８０℃で保存した。ＲＮＡｓｅｑは、４匹の非処置マウス及び６匹のワクチン接種マウスの腫瘍に対して、Fjaestad et al., Oncogene 41, 1364-1375 (2022)に従前に記載されているように行った。要するに、５００ｎｇの精製ＲＮＡ（ＲＩＮスコア＞７）を、オリゴｄＴ磁性ビーズ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ社）を用いてポリアデニル化ｍＲＮＡに関して濃縮した後、断片化を行い、ランダムプライミング（ＮＥＢＮｅｘｔ社）を用いてｃＤＮＡを合成した。ｃＤＮＡはアダプターライゲーションによりＩｌｌｕｍｉｎａシークエンシング用に調製され、その後ＰＣＲを用いたインデキシングとサイズ選択を行った。ｃＤＮＡライブラリーの濃度はＫＡＰＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔｓ（Ｒｏｃｈｅ社）により決定し、Ｎｏｖａｓｅｑ６０００　Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングプラットフォームを用いて配列を決定した。ＲＮＡｓｅｑデータは、ＧＥＯリポジトリ（ＧＳＥ２１２５００）で入手可能である。リードのアライメントと定量は、Ｆｊａｅｓｔａｄらに従前に記載されているように行った。要するに、配列決定したＤＮＡをＳＴＡＲ－ｖ２．７．８を用いてＧＲＣｍ３９参照ゲノムアセンブリにアライメントし、ｆｅａｔｕｒｅＣｏｕｎｔｓとＥＮＳＥＭＢＬ　ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｓ　ｖｅｒｓｉｏｎ　１０４を用いてリードを定量した。遺伝子発現の差はＤＥＳｅｑ２で解析した。ボルカノプロットは、差次的遺伝子発現解析に基づいてＥｎｈａｎｃｅｄＶｏｌｃａｎｏパッケージ（ｖ１．８．０）を用いて作成した。　Ｔｈｅ　Ｇｅｎｅ　Ｏｎｔｏｌｏｇｙ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ(http://geneontology.org/)を用いて、差次的にアップレギュレートされた遺伝子に関連する生物学的プロセスを評価した後、最も特異的なサブプロセスを分類した。

【０１０３】

ＩｍｍｕＣＣ

ＣＩＢＥＲＳＯＲＴ解析ツールの計算フレームワークと、マウスのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑデータのデコンボリューションに適した、開発されたＩｍｍｕＣＣシグネチャーマトリックス（非組織特異的）を用いて、２５の免疫細胞サブタイプの特徴付けと定量を行った。使用したＩｍｍｕＣＣシグネチャーマトリックスは５１１遺伝子からなり、そのうち５１０遺伝子が我々のバルクＲＮＡ－Ｓｅｑデータからマッピングされた（１遺伝子が欠落）。ＣＩＢＥＲＳＯＲＴによるバルクＲＮＡ－Ｓｅｑサンプルのデコンボリューションには、ＤＥｓｅｑ２の比率正規化データの中央値を用いて入力混合マトリックスを作成した。さらに、解析はＣＩＢＥＲＳＯＲＴ－ＲｅｌａｔｉｖｅモードとＣＩＢＥＲＳＯＲＴ－Ａｂｓｏｌｕｔｅモードの両方を含んだ。ＣＩＢＥＲＳＯＲＴ－Ｒｅｌａｔｉｖｅは全免疫量に対する免疫細胞画分を表し、したがってサンプル内比較に適している一方、ＣＩＢＥＲＳＯＲＴ－Ａｂｓｏｌｕｔｅは各細胞種の存在量を定量するスコアを生成するため、細胞種間のサンプル内比較にも同じ細胞種のサンプル間比較にも適している。ＣＩＢＥＲＳＯＲＴの出力は、１０００回の並べ替えを行い、分位正規化パラメータを無効にして生成した。本研究では、２つの集団スキームを定義し（コンパクト及び拡張、表５と表６）、２５の免疫部分集団の一部を集約した。統合された部分集団の合計絶対スコアは、部分

集団の合計として計算した。相対分率は、各スキームの新しい総免疫量に基づいて再計算した。

【０１０４】

統計解析

ＥＬＩＳＰＯＴ応答の統計解析は、Moodie et al. (Methods Mol. Biol. 792, 185-196 (2012))により記載されているように、分布によらないリサンプリング法（ＤＦＲ）を用い、Ｒスタジオで行った。増殖アッセイからの記述統計及びＴｒｅｇ／Ｔｒｅｓｔ集団解析からのＴｒｅｇ集団サイズの変化は、対応のないｔ検定を用いて統計学的に解析した。腫瘍成長曲線の統計的有意性を決定するために、複数の時点間の比較を伴う２元配置ＡＮＯＶＡを行った。処置群間のペプチド特異的ＩＦＮγ分泌細胞及びＩｍｍｕＣＣ関連解析の差の統計的有意性は、それぞれマン・ホイットニーＵ検定及び対応のない両側ｔ検定で評価した。統計解析はＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（バージョン９）で行った。

【０１０５】

実施例２　－　ＡＲＧ２に対する自然ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞応答

本発明者らは、ＭＨＣクラスＩ分子に直接提示できる短いペプチドを用いて、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞を調べた。ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ　ＨＬＡ予測アルゴリズム（ｓｙｆｐｅｉｔｈｉ．ｄｅ及びｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋで入手可能）を用いて、以下の表４に示すように、ＨＬＡ－Ａ２に強く結合すると予測される１５の短いＡＲＧ２由来ペプチド（９マー及び１０マー）のライブラリーを作製した。

【０１０６】

【表４】

表４－ ペプチドライブラリー*HLA-A2* 予測 *AR2* 由来ペプチド

ペプチド名	配列番号:	位置 (AA)	配列	予測アルゴリズム	スコア(SYFP)またはランク(NETMHC)
A2S01	1	2-10	SLRGSLSRL	SYPF および NetMHC	28 (SYFP)および 1.10 (NetMHC)
A2S02	2	10-18	LLQTRVHSI	SYFP	27
A2S03	3	18-26	ILKKSVHSV	SYPF および NetMHC	28 および 1.50
A2S04	4	53-61	GLMKRLSSL	SYPF および NetMHC	28 および 0.250
A2S05	5	84-92	NLIVNPRSV	SYFP	24
A2S06	6	94-102	LANQELAEV	SYFP	25
A2S07	7	114-122	VTLGGDHSL	SYFP	24
A2S08	8	166-175	FLLRELQDKV	NetMHC	0.400
A2S09	9	167-175	LLRELQDKV	SYFP	27
A2S10	10	170-178	ELQDKVPQL	SYFP	24
A2S11	11	193-201	IVYIGLRDV	SYFP	23
A2S12	12	229-237	KVMERTFDL	NetMHC	0.400
A2S13	13	278-286	YIAEEIHNT	SYPF および NetMHC	23 および 1.10
A2S14	14	287-295	GLLSALDLV	SYPF および NetMHC	27 および 0.125
A2S15	15	288-297	LLSALDLVEV	SYPF および NetMHC	0.300

【０１０７】

これらの１５のペプチド（Ａ２Ｓ０１～Ａ２Ｓ１５）を、ＨＬＡ－Ａ２陽性（ＨＬＡ－Ａ２$^+$）であると確認された５人の健常ドナー（ＨＤ）の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）でスクリーニングした。ＰＢＭＣをｉｎ　ｖｉｔｒｏにて各ペプチドで刺激し、１２～１４

日の培養後にＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴにおいて再刺激した。
【０１０８】
　ペプチドＡ２Ｓ０５（配列番号５）、Ａ２Ｓ１４（配列番号１４）及びＡ２Ｓ１５（配列番号１５）は強い候補と同定され、それぞれ３人以上のドナーのＰＢＭＣで有意な応答を誘発した（図１Ａ）。しかしながら、ＨＤにおけるＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴの反復は有意な応答を示さなかったことから、Ａ２Ｓ１５で見られた応答は検証できなかった（図５Ａ）。一方、Ａ２Ｓ１４は、検証セットアップにおいて強いＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答を誘発した（図５Ｂ）。ＴＮＦα及びＩＦＮγの細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）による応答のさらなる特徴付けにより、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞からの反応が明らかになった（図１Ｂ）。Ａ２Ｓ０５はまた、強いＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答を誘発することが検証され（図５Ｃ）、その応答はＩＣＳによりＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞からのものであることが示された（図１Ｃ）。よって、Ａ２Ｓ０５は、ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞応答を誘発するＡＲＧ２ペプチドとして同定された。
【０１０９】
　次に、１７のＨＤをＡ２Ｓ０５及び従前に記載した高免疫原性ＡＲＧ２由来ペプチドＡ２Ｌ２（配列番号１７）に対する応答に関してスクリーニングした。Ａ２Ｌ２に対する強く高頻度の応答が見られた。しかしながら、Ａ２Ｓ０５に対しては、この特定のアッセイでわずかな応答しか見られなかった（図２Ａ）。このアッセイに使用したＨＤは、ＨＬＡ型が同定されていなかった。したがって、スクリーニングされたドナーは、ペプチドＡ２Ｓ０５と不適合なＨＬＡ型を持っている可能性があると考えられた。そこで、ＨＬＡ－Ａ２の状態（陽性又は陰性）が判明しているさらに３８人のドナー（固形腫瘍を有する癌患者１３人と健常ドナー２５人）を、Ａ２Ｓ０５に対する反応に関してスクリーニングした。ほとんどのドナーはＨＬＡ－Ａ２＋であることに基づいて選択されたが（ｎ＝２９）、一部のＨＬＡ－Ａ２ドナー（ｎ＝９）は対照として含まれた。ここでも、Ａ２Ｓ０５に対する応答はあまり観察されず、統計的に有意な応答は３８人のドナーのうち１０人に見られるに過ぎなかった（図２Ｂ）。興味深いことに、Ａ２Ｓ０５に対する応答はＨＬＡ－Ａ２$^{+}$及びＨＬＡ－Ａ^{2}－ドナーの両方で観察され（図２Ｃ）、Ａ２Ｓ０５はｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ　ＨＬＡ予測アルゴリズムにより示唆されたようにＨＬＡ－Ａ２拘束性ではないことが示された。
【０１１０】
　強いＡ２Ｓ０５応答を示した４人のドナーの完全なＨＬＡタイピングを行った。その結果、４人のドナーは総てＨＬＡ－Ａ１、ＨＬＡ－Ｂ８及びＨＬＡ－Ｃ７を有していたことが判明した（図２Ｄ）。重要なこととして、Ａ２Ｓ０５に対して強いｉｎ　ｖｉｔｒｏ応答示した一部のドナーにおいて、ＰＢＭＣにｅｘ　ｖｉｖｏでも強く有意な応答が検出された（図２Ｅ）。
【０１１１】
実施例３　－　ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の特徴付け
　ＡＲＧ２特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞をさらに特徴付けるために、４人のドナーからのＡ２Ｓ０５特異的Ｔ細胞培養物を確立した。簡単に述べれば、ドナーのＰＢＭＣをｉｎ　ｖｉｔｒｏにてＡ２Ｓ０５で刺激した。１２日後、ペプチド特異的Ｔ細胞を再刺激し、ＩＦＮγ捕捉キットを用いて単離した。ＩＦＮγ産生細胞を、迅速増殖プロトコールを用いて増殖させ、増殖１６～１７日目にＩＣＳによりＩＦＮγ及びＴＮＦαに対する特異性を調べた。４人のドナーの総てから高特異性ＣＤ８$^{+}$培養物が確立された（図３Ａ）。
【０１１２】
　確立された培養物を用いて、Ａ２Ｓ０５のＨＬＡ拘束性を決定した。Ａ２Ｓ０５ペプチドでパルスした種々の標的細胞株と共培養したＨＤ７８及びＨＤ９３由来のＡ２Ｓ０５特異的Ｔ細胞を用い、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴを行った。これらの結果から、ＨＬＡ－Ａ１$^{+}$及びＨＬＡ－Ｃ７$^{+}$細胞株に対する反応性はないが（図３Ｂ及び３Ｃ）、ＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$転移性悪性黒色腫細胞株ＦＭ６に対する認識及び反応性活性は示す（図３Ｄ）ことが明らかになった。ＦＭ６は、フローサイトメトリーによってＨＬＡ－Ｂ８$^{+}$であることが

確認され、ＲＴ－ｑＰＣＲによってＡＲＧ２を発現することが確認された（図６）。残りの２つのＡＲＧ２特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞培養物は、ＦＭ６に対して反応性を示すことが確認され（図７Ａ）、４つ総てのＡＲＧ２特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞培養物が、さらに３つのＨＬＡ－Ｂ８＋細胞株に対して反応性を示すことが確認された（図７Ｃ）。ＡＲＧ２特異的ＣＤ８　Ｔ細胞培養物の特異性は、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴで対応する　ＡＲＧ１配列（ＡＲＧ１＿６５－７３）を有するペプチドに対する反応性がないことで確認された（図７Ｂ）。

【０１１３】

次に、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞がＦＭ６細胞を溶解することができるかどうかを確認するために、標準的な^{51}Ｃｒ細胞傷害性アッセイを行った。実際に、特異的Ｔ細胞は濃度依存的にＦＭ６細胞を溶解し（図３Ｅ）、よって、ＡＲＧ２特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞の細胞傷害能が実証された。ＩＦＮγによる刺激は、ＨＬＡ－Ｂ８発現の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を高め（図６）、ＦＭ６細胞の溶解に小さな増加をもたらした（図３Ｅ）。

【０１１４】

したがって、Ａ２Ｓ０５ペプチドのＨＬＡ－Ｂ８拘束性が、転移性悪性黒色腫細胞株ＦＭ６及び他の３つのＨＬＡ－Ｂ＋癌細胞株に対する特異的認識及び細胞溶解活性によって確認された。このペプチドがＨＬＡ－Ａ２と結合すると予測されていたことを考えると、これは驚くべきことであった。興味深いことに、進行した黒色腫患者では健常ドナーと比較してＨＬＡ－Ｂ８の頻度が有意に減少しているという所見に基づいて、ＨＬＡ－Ｂ８ハプロタイプがメラノーマに対して防御的な役割を果たすのではないかと考えられている(Fensterle et al., BMC Med. 4, 1-6 (2006))。さらに、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）では、ＨＬＡ－Ｂ８発現はＣＭＬの発症率の低下と関連している(Posthuma et al., Blood 93, 3863-3865 (1999))。ＡＲＧ２のアップレギュレーションは、転移性黒色腫のＴｒｅｇ及び悪性黒色腫細胞でも観察されており(Lowe et al., JCI Insight 4, (2019)及びYu et al., J. Cell. Physiol. 235, 9997-10011 (2020))、急性骨髄性白血病におけるＡＲＧ２の免疫抑制的役割が記載されている(Mussai et al., Blood 122, 749-758 (2013))。理論に縛られるものではないが、クラスＩ　ＡＲＧ２ペプチドのＨＬＡ－Ｂ８拘束性は、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞が黒色腫及びＣＭＬにおける免疫監視に役割を果たしていることを示唆している。

【０１１５】

実施例４　－　ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は活性化制御性Ｔ細胞を特異的に認識する

最近の研究では、Ｌｏｗｅらは、末梢血からの活性化Ｔｒｅｇが、活性化エフェクターＣＤ４＋　Ｔ細胞（Ｔｅｆｆ）と比較して高いＡＲＧ２発現を示すことを発見し、ＴｒｅｇによるＡＲＧ２依存的なＴ細胞増殖抑制を実証した(Lowe et al., JCI Insight 4, (2019))。活性化Ｔｒｅｇが活性化Ｔｅｆｆよりも高いＡＲＧ２レベルを発現していれば、それらはＡＲＧ２特異的Ｔ細胞によって優先的に認識され得るという仮説が立てられた。　この仮説を検証するために、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを用いてＰＢＭＣを活性化し、Ｌｏｗｅらによって記載された実験に基づいて、２日目、５日目、及び７日目にＩＬ－２を添加した。活性化後９日目に、精製Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆを、ＦＡＣＳを用いて精製した（図８Ａ及び９）。次に、精製したＴｒｅｇ又はＴｅｆｆを、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて自己ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の標的細胞として蒔いた。ＴｅｆｆよりもＴｒｅｇに対して有意に高い応答が３人のドナー総てで観察され（図４Ａ）、ＲＴ－ｑＰＣＲ解析は、最小レベルのＡＲＧ１発現（図８Ｅ）とともに、ＴｅｆｆよりもＴｒｅｇにおいて３～７倍高いＡＲＧ２発現を示し（図４Ｂ）、よって、ＡＲＧ２依存的認識が示された。Ｔｒｅｇ表現型は、ＴｒｅｇにおけるＦＯＸＰ３（図４Ｃ）、ＩＬ－１０及びＣＴＬＡ－４（図８Ｃ～Ｄ）を含むＴｒｅｇシグネチャー遺伝子の優先的発現によって確認された。最後に、Ｔｒｅｇ及びＴｅｆｆにおけるＡＲＧ２発現レベルを、２つのサブセットを単離した活性化細胞のバルク培養における発現レベルと比較したところ、バルク培養はＴｅｆｆに匹敵するレベルのＡＲＧ２を発現していることが判明した（図４Ｄ）。

【０１１６】

このように、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞がＴｒｅｇを認識し、それと反応する能力は、それらの免疫調整機能を強調することが示された。制御細胞を標的とするＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の能力は、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞が「制御因子を制御する」能力を特徴とする抗Ｔｒｅｇであることを示している。活性化ＴｒｅｇにおけるＡＲＧ２の優先的発現は、活性化バルク培養又は活性化Ｔｅｆｆｓと比較して、ＡＲＧ２誘導がＴｒｅｇの免疫抑制能の増大の能動的メカニズムとして機能することを示唆している。したがって、理論に縛られるものではないが、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞による活性化Ｔｒｅｇの標的化は、ＡＲＧ２発現の高い活性化Ｔｒｅｇが発揮する免疫抑制を除去することにより、重要な免疫調節能を持つことが合理的に予測できる。多くの腫瘍はこのようなＴｒｅｇの多さを特徴としており、したがって、ＡＲＧ２特異的抗Ｔｒｅｇによって活性化された免疫抑制性Ｔｒｅｇを標的とすることで、腫瘍浸潤Ｔ細胞（ＴＩＬ）のＴｒｅｇ媒介性の免疫抑制を緩和できる可能性がある。

【０１１７】

実施例５　－　ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は活性化制御性Ｔ細胞を特異的に認識する

最近の研究では、Ｌｏｗｅらは、末梢血からの活性化Ｔｒｅｇが、活性化エフェクターＣＤ４$^+$　Ｔ細胞（Ｔｅｆｆ）と比較して高いＡＲＧ２発現を示すことを発見し、ＴｒｅｇによるＡＲＧ２依存的なＴ細胞増殖抑制を実証した(Lowe et al., JCI Insight 4, (2019))。活性化Ｔｒｅｇが他のＴ細胞よりも高いＡＲＧ２レベルを発現していれば、それらはＡＲＧ２特異的Ｔ細胞によって優先的に認識され得るという仮説が立てられた。この仮説を検証するために、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズを用いてＰＢＭＣを活性化し、Ｌｏｗｅらによって記載された実験に基づいて、２日目、５日目、及び７日目にＩＬ－２を添加した。活性化後９日目に、精製Ｔｒｅｇ及び静止Ｔ細胞（Ｔｒｅｓｔ）を、ＦＡＣＳを用いて精製した（図１２Ａ及び１３）。次に、精製したＴｒｅｇ又はＴｒｅｓｔを、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて自己ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の標的細胞として蒔いた。ＴｒｅｓｔよりもＴｒｅｇに対して有意に高い応答が３人のドナー総てで観察され（図１１Ａ～Ｃ）。さらに、、活性化ＰＢＭＣをＡＲＧ２特異的Ｔ細胞と共培養したところ、自己ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞と共培養した活性化ＰＢＭＣに比べて、Ｔｒｅｇ集団に有意な減少がもたらされ（図１１Ｄ）、Ｔｒｅｇに対するＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の細胞傷害活性が示差された。重要なことに、ＲＴ－ｑＰＣＲ解析は、最小レベルのＡＲＧ１発現（図１２Ｂ）とともに、ＴｒｅａｔよりもＴｒｅｇにおいて３～７倍高いＡＲＧ２発現を示し（図１１Ｅ）、ＴｒｅｇのＡＲＧ２依存的認識が示された。Ｔｒｅｇにおけるタンパク質レベルでの好ましいＡＲＧ２発現は、ウエスタンブロット解析により確認された（図１１Ｆ及び１２Ｆ）。Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＡＲＧ２発現レベルは、これら２つのＴ細胞サブセットが単離された活性化ＰＢＭＣのバルク培養の発現レベルとも比較したところ、バルク培養はＴｒｅｓｔに匹敵するレベルでＡＲＧ２を発現することが判明した（図１１Ｅ）。さらに、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞におけるＡＲＧ２発現は、ＴｒｅｓｔのＡＲＧ２発現に匹敵していた（図１２Ｄ）。最後に、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて、自己ＡＲＧ２特異的ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の標的細胞としてＴｒｅｇ又はＴｒｅｓｔを蒔いた。興味深いことに、ＡＲＧ２特異的ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞も、ＴｒｅｓｔよりもＴｒｅｇに対して有意に高い応答を示した（図１１Ｆ～Ｇ）。

【０１１８】

単離されたＡＲＧ２発現Ｔｒｅｇの免疫抑制表現型を確認するために、活性化ＰＢＭＣの一部をＦＯＸＰ３に関して細胞内染色した。Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔとして選別された細胞間のＦＯＸＰ３発現を評価したところ、ＴｒｅｇではＴｒｅｓｔに比べて高いＦＯＸＰ３発現を示した（図１３Ａ）。このことはまた、Ｔｒｅｇ及びＴｒｅｓｔにおけるＦＯＸＰ３発現のＲＴ－ｑＰＣＲ分析によっても確認された（図１２Ｃ）。選別精製戦略をさらに検証するために、他のいくつかのＴｒｅｇシグネチャー遺伝子の発現をＲＴ－ｑＰＣＴにより評価したところ、ＩＬ２ＲＡ（ＣＤ２５）、ＴＮＦＲＳＦ１８（ＧＩＴＲ）、ＩＫＺＦ２（ＨＥＬＩＯＳ）、ＣＴＬＡ４、及びＩＬ１０がＴｒｅｇにおいて優先的に発現することが判明した（図１３Ｂ～Ｆ）。興味深いことに、Ｔｒｅｇはまた、Ｔｒｅｓｔよ

りも、ＰＤＣＤ１（ＰＤ－１）を選好的に発現する（図１３Ｇ）。最後に、選別精製されたＴｒｅｇの機能的表現型を増殖アッセイによって確認した。この目的で、自己ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の高純度集団を単離した（図１２Ｅ）。Ｔｒｅｓｔ又はＴｒｅｇと共培養した抗ＣＤ３／ＣＤ２８及びＩＬ－２刺激ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞の増殖を５日間にわたって評価したところ、ＴｒｅｇはＴｒｅｓｔと比較してＣＤ８$^+$　Ｔ細胞の増殖を有意に抑制することが判明した（図１３Ｈ）。

【０１１９】

実施例６　－　膵臓癌のマウスモデルにおいてペプチド接種により誘導されたＡＲＧ２特異的Ｔ細胞は免疫調整し、腫瘍成長を阻害する

本発明者らは、従前に、単回のワクチン接種で強力かつ高頻度のＴ細胞応答を誘発した高免疫原性マウスＡＲＧ２由来エピトープ（ｍＡＲＧ２＿１８８－１９６、ＬＳＰＰＮＩＶＹＩ）を同定した。免疫原性ＡＲＧ２由来ペプチドを接種すると肺癌のマウスモデルにおいて腫瘍成長が遅延することが示された。別の腫瘍モデルでＡＲＧ２由来ペプチド接種の抗腫瘍効果を確認するため、及びＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の免疫調整機能を調べるために、同系マウスモデルＰａｎ０２を用いた。Ｐａｎ０２は膵管腺癌（ＰＤＡＣ）のモデルであり、ＡＲＧ２発現とＰＤＡＣ患者の予後不良との相関が従前に証明されていること、また腫瘍終末期にＰａｎ０２腫瘍でＡｒｇ２が高発現していることが証明されているとともに腫瘍のエンドポイントでＰａｎ０２腫瘍に高いＡＲＧ２発現が実証されていることから、ＡＲＧ２ベースのワクチンを研究するのに適している。

【０１２０】

Ｃ５７ＢＬ／６マウスにＰａｎ０２細胞を投与し、腫瘍が触知可能となった１１日目に、平均腫瘍体積が同程度のマウスを異なる処置群に割り付けた。腫瘍接種後１１日目と１７日目に、マウスは従前に記載したＡＲＧ２ベースのワクチン又は対照ワクチンのいずれかを受けた（図１４Ａ）。興味深いことに、ＡＲＧ２接種マウスでは腫瘍成長の顕著な阻害が観察され、実際、腫瘍増殖は２０日目以降に停止した（図１４Ｂ）。さらに、ＡＲＧ２接種群の１匹のマウスは、完全な腫瘍退縮を示した（図１５Ａ）。これらの結果は独立した試験でも確認された（図１５Ｂ）。ワクチンの安全性はまた、ＡＲＧ２接種群で体重の減少がなかったことでも実証された（図１５Ｃ）。

【０１２１】

腫瘍接種後３１日目のＥＬＩＳＰＯＴ分析のために、６匹のＡＲＧ２接種マウスと３匹の対照接種マウスを無作為に選択した。ここで、総てのＡＲＧ２接種マウスで強い応答が観察され、対照接種マウスでは応答がなかった（図１４Ｃ）。ＡＲＧ１の対応する領域に由来するペプチド（ｍＡＲＧ１＿１６９－１７７、ＩＳＡＫＤＩＶＹＩ）に対する交差反応性は、配列が部分的に類似しているもかかわらず観察されなかったので、観察された免疫応答はＡＲＧ２に特異的であった（図１４Ｄ及び１５Ｄ）。次に、ＡＲＧ２接種マウスのペアを無作為に選択し、プールした脾細胞サンプルを調製した。これらのサンプルから、ＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$　Ｔ細胞を単離した。ＥＬＩＳＰＯＴアッセイでは、ＡＲＧ２接種マウスの３群総てで、ＣＤ４$^+$画分及びＣＤ８$^+$画分の両方で応答が観察された（図１４Ｅ）。

【０１２２】

腫瘍サイズが小さかったため、利用できる腫瘍組織の量は限られていた。しかしながら、ＡＲＧ２ベースのワクチンを接種したマウスの腫瘍へのＡＲＧ２特異的Ｔ細胞のホーミングが、他の３つのマウス腫瘍モデルで示され（図１５Ｅ～Ｇ）、ワクチンがワクチン接種時にＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の腫瘍浸潤を誘導することが示唆される。腫瘍における転写ランドスケープに対するＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の誘導の結果を評価するために、対照ワクチンで処置した４匹のマウスとＡＲＧ２ベースのワクチンで処置した６匹のマウスから全腫瘍ＲＮＡを単離し、ＲＮＡｓｅｑを行った。差次的遺伝子発現解析により、ＡＲＧ２－ペプチドによるワクチン接種後に、全部で２８２のアップレギュレート遺伝子と３３のダウンレギュレート遺伝子が同定された（図１４Ｆ）。生物学的プロセスに基づくジーンオントロジー解析により、ＡＲＧ２ベースのワクチンで処置したマウスでアップレギュレー

トされた遺伝子のうち、濃縮されたプロセスの４４％が腫瘍免疫と関連していることが示された（図１５Ｈ）。これらのうち７６％は正の抗腫瘍免疫応答に関連し、１０％は負の抗腫瘍免疫応答に関連し、残りの１４％は細菌に対する免疫応答に関連していた（図１５Ｉ）。ＡＲＧ２ベースのワクチンで処置したマウスで有意に濃縮された生物学的プロセスの中に、自然免疫と適応免疫の両方に関連するプロセスが見出された。Ｔ細胞及びリンパ球、Ｉ型インターフェロン、サイトカイン調節、血管新生及び免疫系プロセス、ならびにカルシウムイオン濃度に関連するプロセスの濃縮が見られ、全体としてＡＲＧ２接種マウスにおける免疫応答の発達を示している（図１４Ｇ）。

【０１２３】

これらの観察に続いて、ＩｍｍｕＣＣアルゴリズムを用いて、バルク腫瘍サンプルにおける浸潤免疫細胞タイプの相対的構成を評価した（表５及び６）。全体として、ＡＲＧ２ベースの免疫調整ワクチンを接種すると、腫瘍微小環境への免疫細胞の平均浸潤量が高くなる明らかな傾向があった（図１４Ｈ）。具体的には、ＡＲＧ２免疫調整ワクチンを受けたマウスでは、ＮＫ細胞を含むいくつかの免疫細胞種の平均絶対割合の増加が認められ、マクロファージと単球の数が高くなる傾向が見られた（図１６）。ＡＲＧ２由来ペプチドワクチンを受けたマウスでは、平均Ｍ１／Ｍ２マクロファージ比及びＣＤ８／Ｔｒｅｇ比（図１４Ｉ及びＪ）が高いことから、より炎症性の高い腫瘍微小環境が示され、ワクチン接種時に誘導されるＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の免疫調整能が示唆された。

【０１２４】

【表５】

表 5 - *ImmuCC* アルゴリズムのコンパクト集団スキームに使用した
集団および部分集団の概要

コンパクト集団スキーム ImmuCC アルゴリズム	
集団	**部分集団**
B 細胞	ナイーブ B 細胞 メモリーB 細胞 形質細胞
CD8 T 細胞	CD8 ナイーブ T 細胞. CD8 活性化 T 細胞 CD8 メモリーT 細胞
CD4 T 細胞	CD4 ナイーブ T 細胞 CD4 メモリーT 細胞 CD4 濾胞性 T 細胞 Th1 細胞 Th17 細胞 Th2 細胞
制御性 T 細胞	-
γ-δ T 細胞	-
NK 細胞	静止 NK 活性化 NK
DC 細胞	活性化 DC 未熟 DC
単球	-
顆粒球	好酸球 マスト細胞 好中球
マクロファージ	M0 マクロファージ M1 マクロファージ M2 マクロファージ

【０１２５】

【表６】

表６ - *ImmuCC* アルゴリズムの拡張集団スキームで使用した
集団およびぶ分集団の概要

拡張集団スキーム ImmuCC アルゴリズム	
集団	**部分集団**
B 細胞	ナイーブ B 細胞 メモリーB 細胞 形質細胞
NK 細胞	静止 NK 活性化 NK
DC 細胞	活性化 DC 未熟 DC
顆粒球	好酸球 マスト細胞 好中球
CD8 ナイーブ T 細胞	-
CD8 活性化 T 細胞	-
CD8 メモリーT 細胞	-
CD4 ナイーブ T 細胞	-
CD4 メモリーT 細胞	-
CD4 濾胞性 T 細胞	-
Treg 細胞	-
Th17 細胞	-
γδ T 細胞	-
Mo マクロファージ	-
M1 マクロファージ	-
M2 マクロファージ	-
単球	-

【０１２６】

したがって、ＡＲＧ２接種後のマウスＰａｎ０２腫瘍モデルにおいて、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の免疫調整機能が証明された。ＡＲＧ２接種マウスのＰａｎ０２腫瘍における遺伝子発現の変化は、免疫細胞浸潤の増加の形での抗腫瘍免疫応答、ならびにＭ１／Ｍ２マクロファージ及びＣＤ８／Ｔｒｅｇ比がより高い、より炎症性の高い微小環境の確立が誘導されてことを示している。ＡＲＧ２接種により、より免疫寛容な腫瘍微小環境が誘導されたことは、Ｐａｎ０２腫瘍成長の有意な抑制が観察されたことの説明となり得る。さらに、他の３つのマウス腫瘍モデル、すなわちＭＣ３８、Ｂ１６－Ｆ１０及びＬＬ２を用いて、腫瘍床に浸潤するＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の能力を検証した。全体として、これらの結果は、ＡＲＧ２特異的Ｔ細胞の、抗腫瘍性免疫応答に有利なように免疫ランドスケープを変化させる能力を強調している。

【０１２７】

配列

開始位置及び終了位置は、特に断りのない限り、全長ヒトアルギナーゼ２（配列番号１９）内の位置を示す。

【０１２８】

表1

配列番号	配列	名称	開始位置	終了位置
1	SLRGSLSRL	A201	2	10
2	LLQTRVHSI	A2S02	10	18
3	ILKKSVHSV	A2S03	18	26
4	GLMKRLSSL	A2S04	53	61
5	NLIVNPRSV	A2S05	84	92
6	LANQELAEV	A2S06	94	102
7	VTLGGDHSL	A2S07	114	122
8	FLLRELQDKV	A2S08	166	175
9	LLRELQDKV	A2S09	167	175
10	ELQDKVPQL	A2S10	170	178
11	IVYIGLRDV	A2S11	193	201
12	KVMERTFDL	A2S12	229	237
13	YIAEEIHNT	A2S13	278	286
14	GLLSALDLV	A2S14	287	295
15	LLSALDLVEV	A2S15	288	297
16	GFSWIKPCISSASIVYIGLRDVDPPEHFILKNYD IQYFSMRDIDRLGIQK	「ホットスポット」	180	229
17	SLRGSLSRLLQTRVHSILKKSVHSVAVIGAPFS	A2L2	2	34
18	QIVKNPRSV	ARG1_65-73	65*	73*
19	Full length human ARG2 - see below			
20	Full length human ARG1 - see below			
21	LSPPNIVYI	mARG2_188-196	188	196
22	ISAKDIVYI	mARG1_169-177	169*	177*
23	FSWVTPCISAKDIVYIGLRDVDPGEHYII	ARG1 (aa162-190)	162*	190*
24	FSWIKPCLSPPNIVYIGLRDVEPPEHFIL	ARG2 (aa181-209)	181	209

* 全長ヒトアルギナーゼ1における位置

ヒトアルギナーゼ2全長 (NP_001163.1)(配列番号 19)

MSLRGSLSRL LQTRVHSILK ***KSV***HSVAVIG APFSQGQKRK GVEHGPAAIR EAGLMKRLSS
LGCHLKDFGD LSFTPVPKDD LYNNLIVNPR SVGLANQELA EVVSRAVSDG YSCVTLGGDH
SLAIGTISGH ARHCPDLCVV WVDAHADINT PLTTSSGNLH GQPVSFLLRE LQDKVPQLP**G**
FSWIKPCISS ASIVYIGLRD VDPPEHFILK NYDIQYFSMR DIDRLGIQKV MERTFDLLIG
KRQRPIHLSF DIDAFDPTLA PATGTPVVGG LTYREGMYIA EEIHNTGLLS ALDLVEVNPQ
LATSEEEAKT TANLAVDVIA SSFGQTREGG HIVYDQLPTP SSPDESENQA RVRI

アルギナーゼ1との相同性に基づいて免疫原性のホットスポットと同定された領域は、太字下線で示される(配列番号16)。A2L2ホットスポット(配列番号17)中心として同定された輸送ペプチドの境界は、太字斜体で「KSV」と示される。

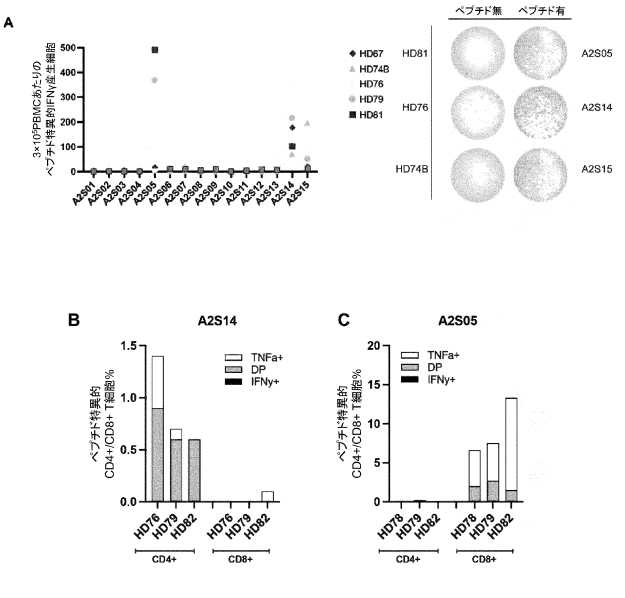
ヒトアルギナーゼ1全長 (NP_000036.2) (配列番号 20)

MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN
DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKN GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV
IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP **GFSWVTPCIS AKDIVYIGLR**
DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF
TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT
LACFGLAREG NHKPIDYLNP PK

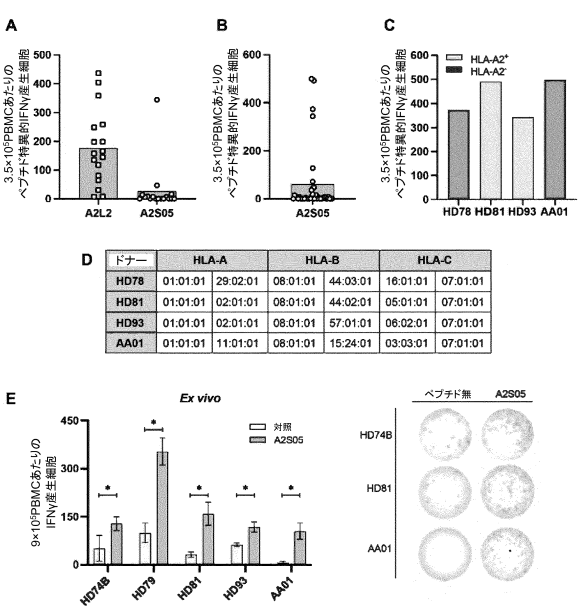
免疫原性のホットスポットと同定された領域は、太字下線で示される。

【図面】

【図１】



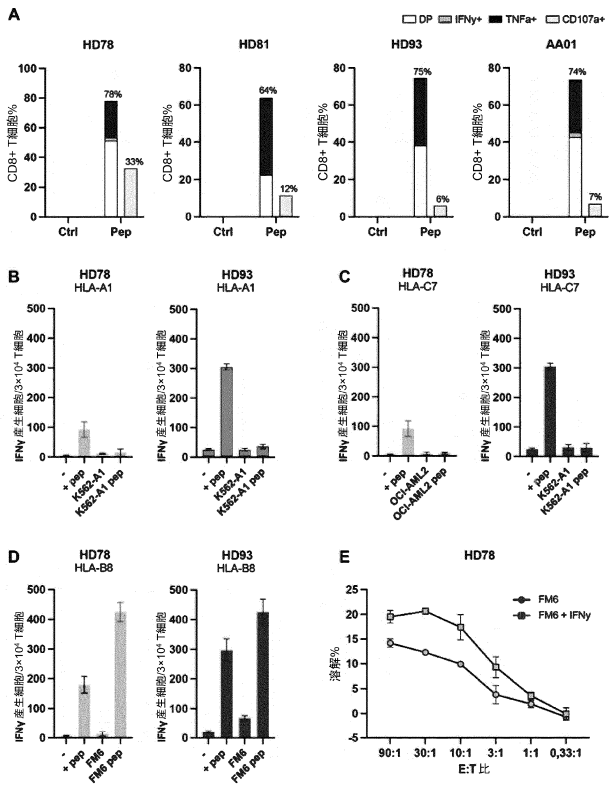
【図２】



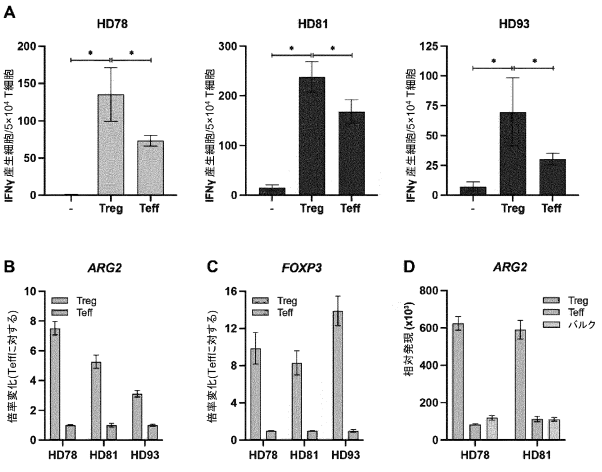
D

ドナー	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
HD78	01:01:01	29:02:01	08:01:01	44:03:01	16:01:01	07:01:01
HD81	01:01:01	02:01:01	08:01:01	44:02:01	05:01:01	07:01:01
HD93	01:01:01	02:01:01	08:01:01	57:01:01	06:02:01	07:01:01
AA01	01:01:01	11:01:01	08:01:01	15:24:01	03:03:01	07:01:01

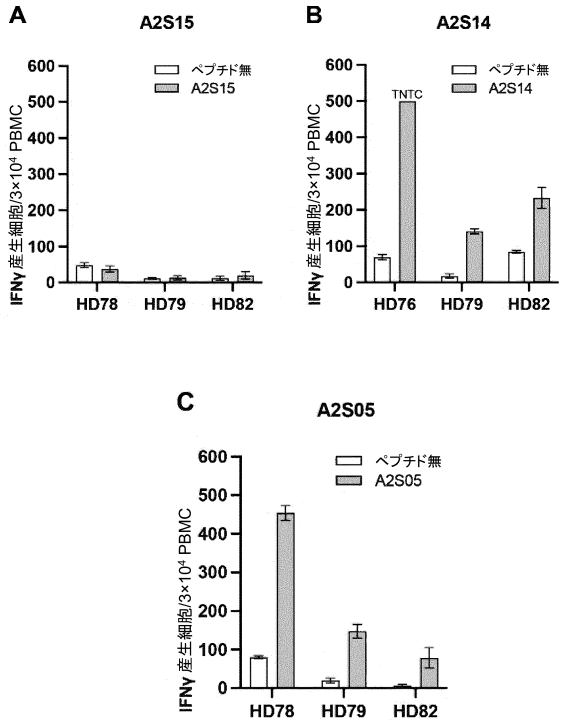
【図３】



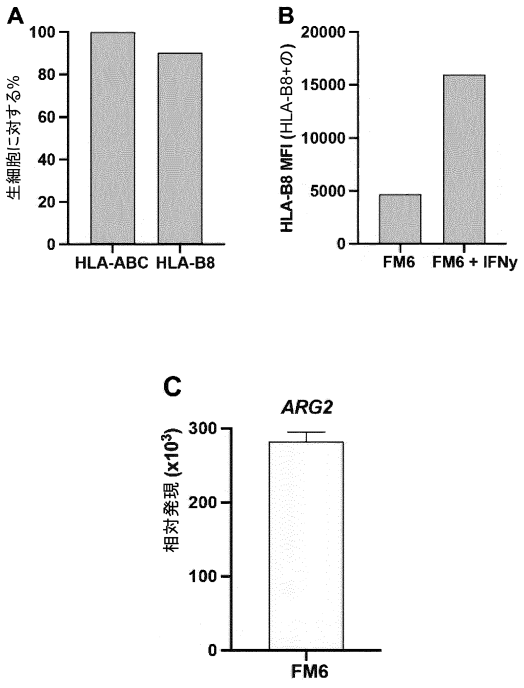
【図４】



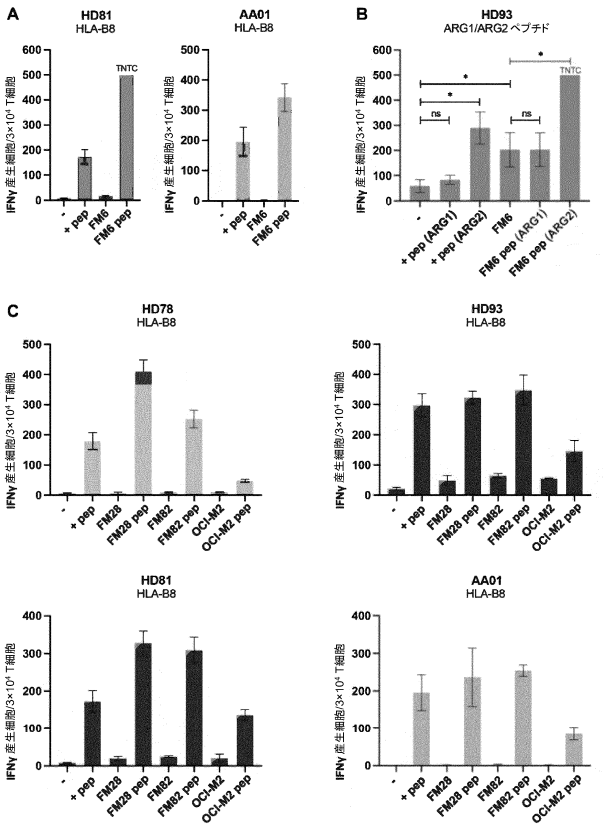
【図５】


A
A2S15
ペプチド無
A2S15
IFNγ 産生細胞/3×10⁴ PBMC
HD78
HD79
HD82
B
A2S14
ペプチド無
A2S14
TNTC
HD76
HD79
HD82
C
A2S05
ペプチド無
A2S05
HD78
HD79
HD82

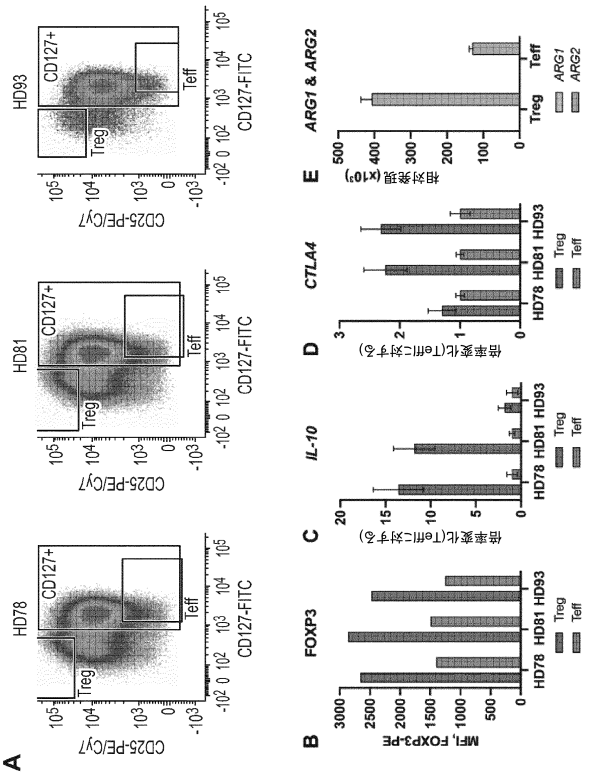
【図６】


A
生細胞に対する%
HLA-ABC
HLA-B8
B
HLA-B8 MFI (HLA-B8+の)
FM6
FM6 + IFNγ
C
ARG2
相対発現 (x10³)
FM6

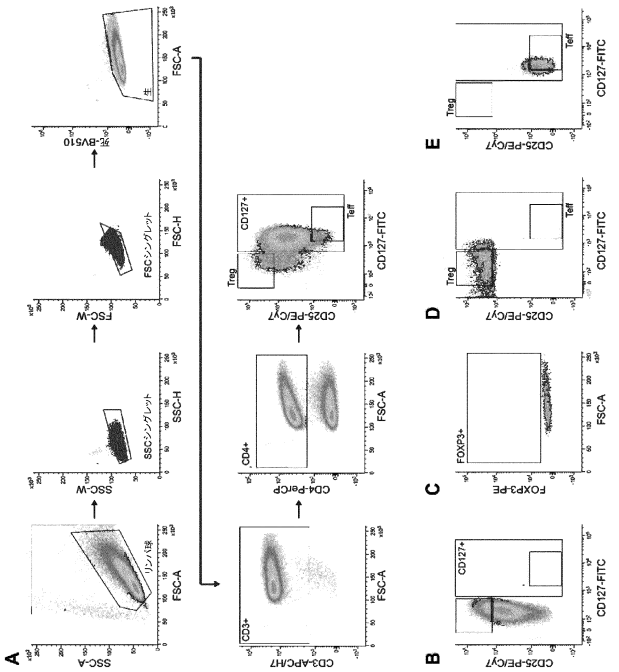
【図７】


A
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8
IFNγ 産生細胞/3×10⁴ T細胞
TNTC
B
HD93
ARG1/ARG2 ペプチド
C
HD78
HLA-B8
HD93
HLA-B8
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8

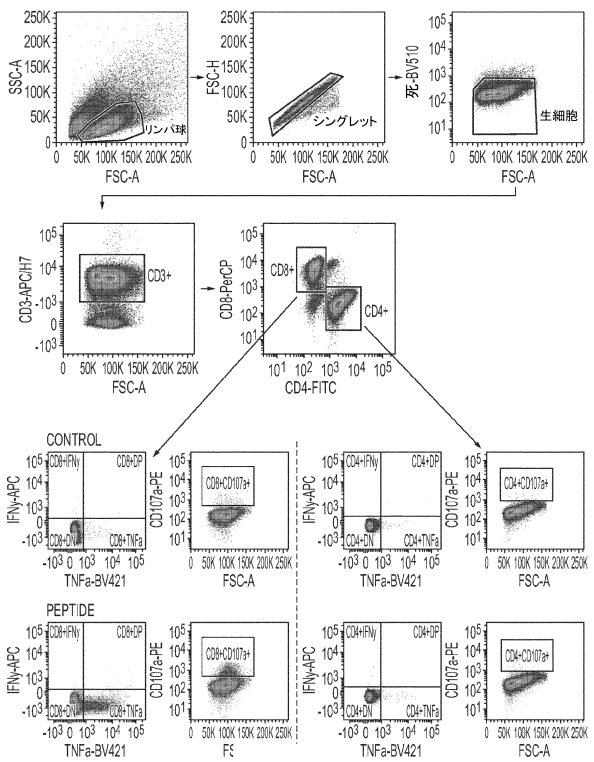
【図８】


A
HD93
HD81
HD78
CD127+
Teff
Treg
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
B
FOXP3
MFI, FOXP3-PE
C
IL-10
倍率変化(Teffに対する)
D
CTLA4
倍率変化(Teffに対する)
E
ARG1 & ARG2
相対発現 (x10³)
ARG1
ARG2
HD78 HD81 HD93
Treg
Teff

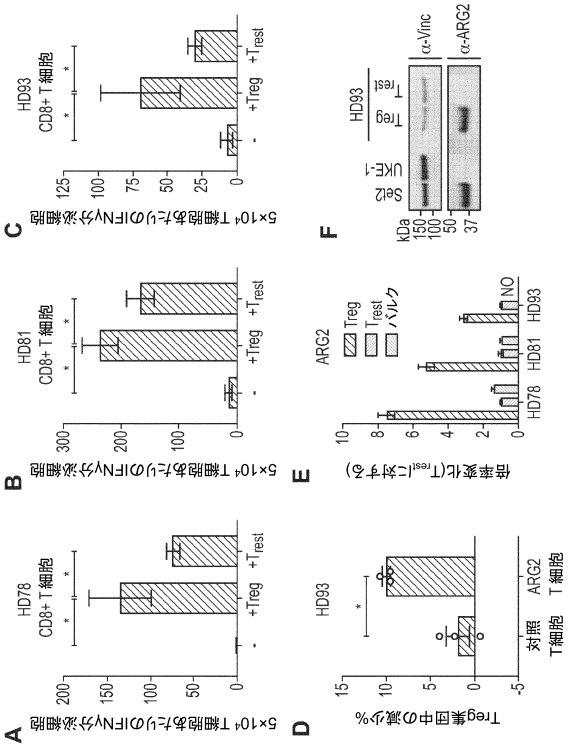
【図９】



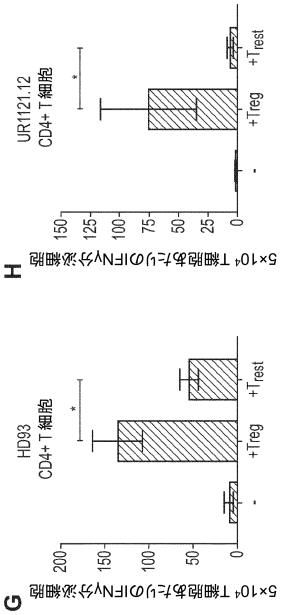
【図１０】



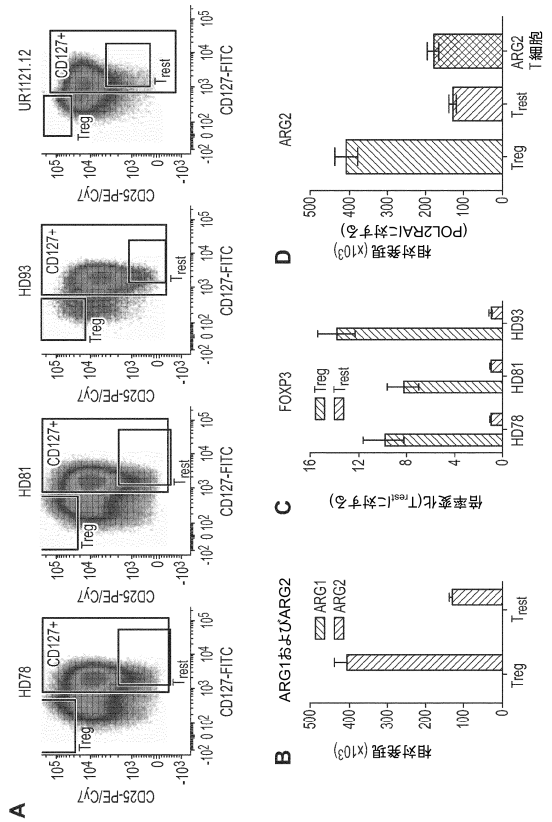
【図１１－１】



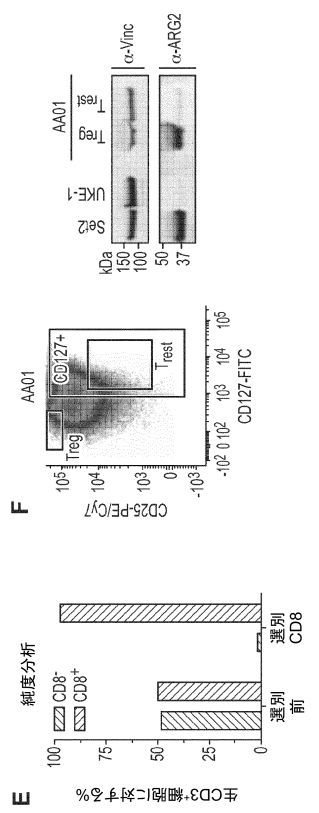
【図１１－２】



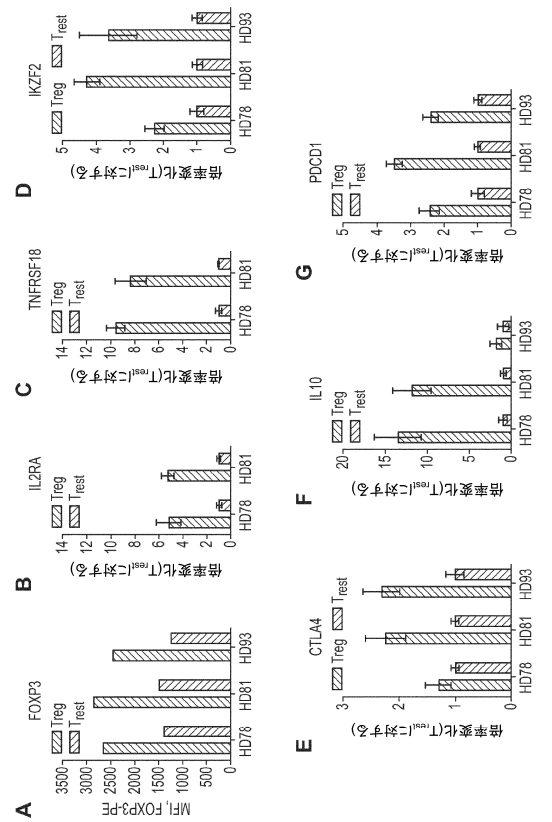
【図１２－１】



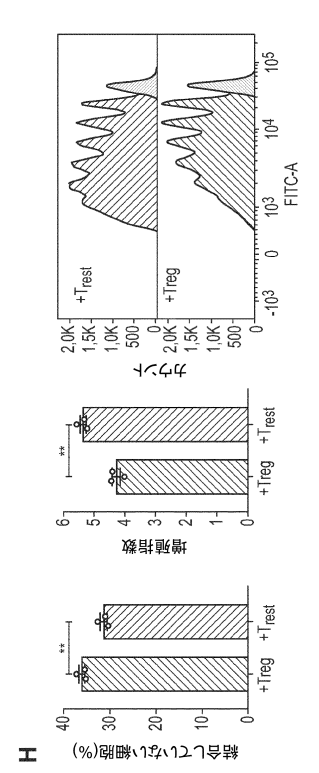
【図１２－２】



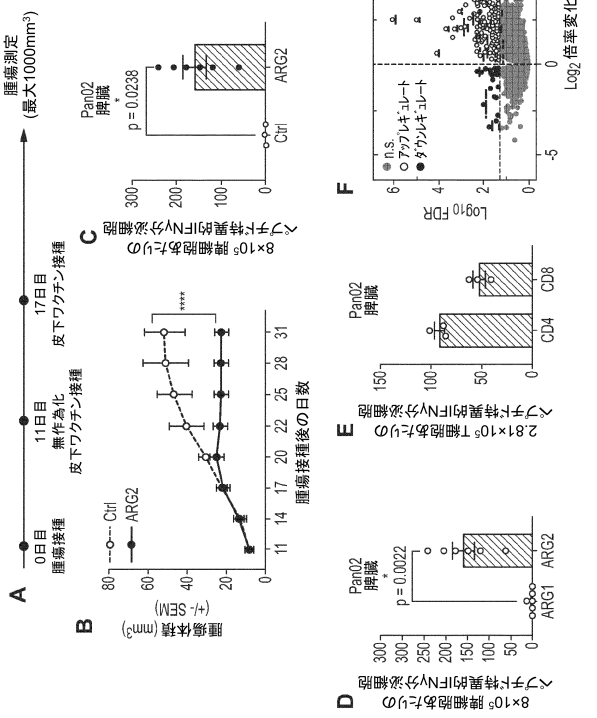
【図１３－１】



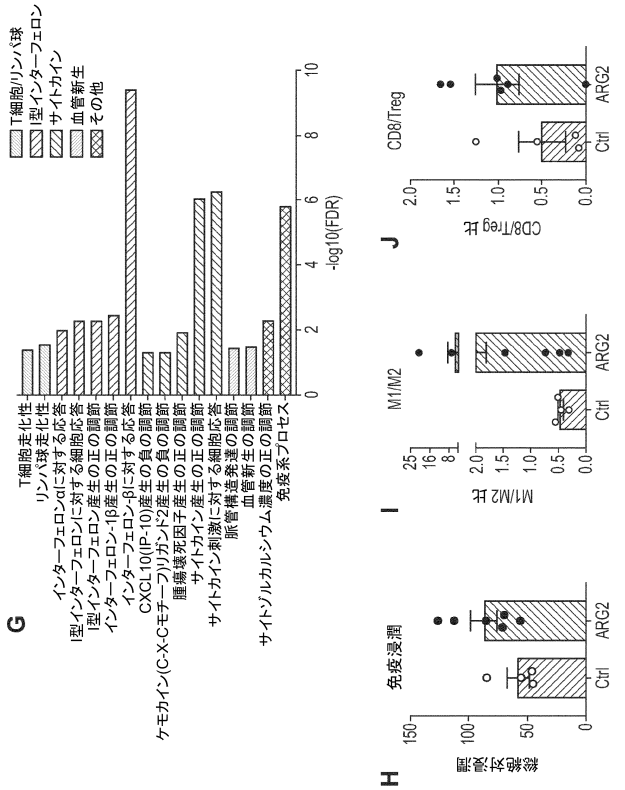
【図１３－２】



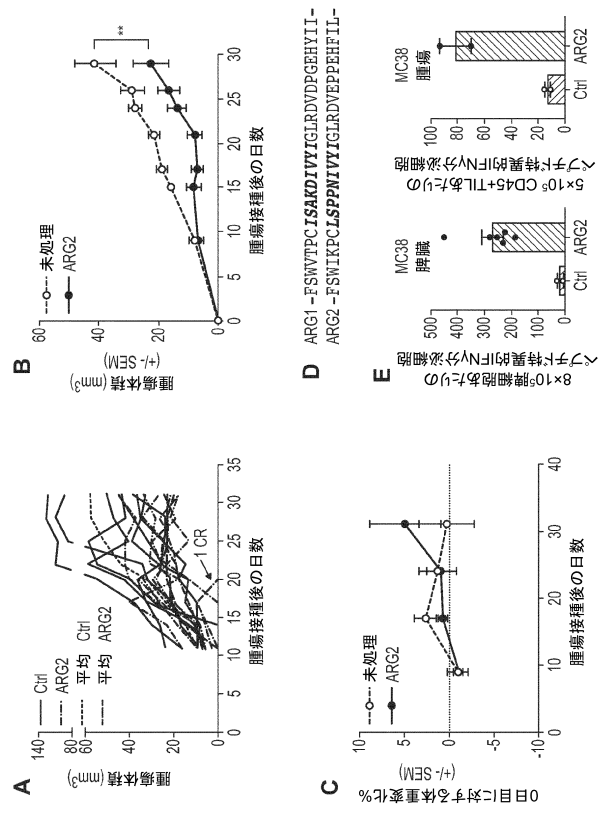
【図１４－１】



【図１４－２】

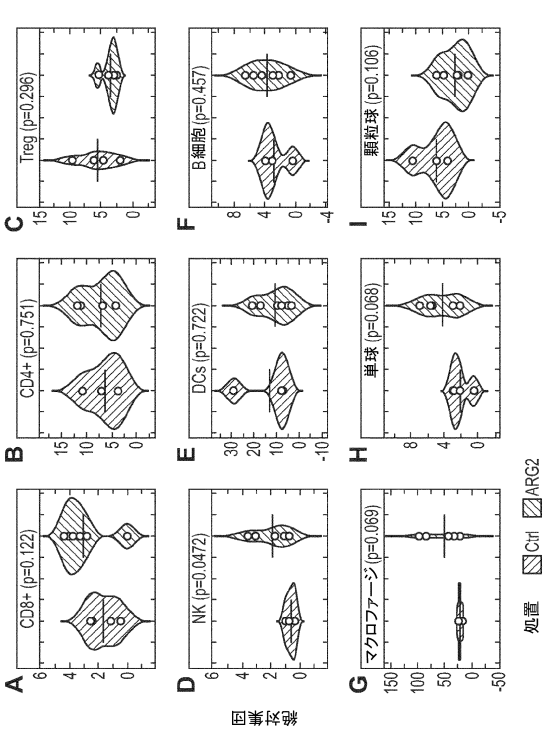


【図１５－１】

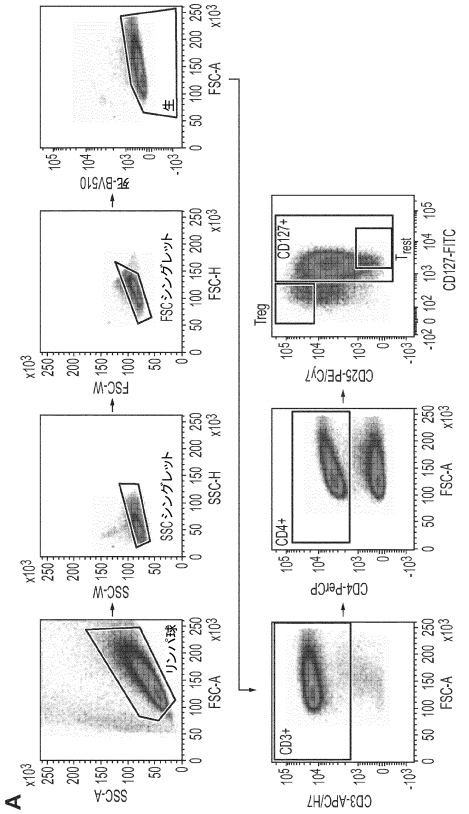


【図１５－２】

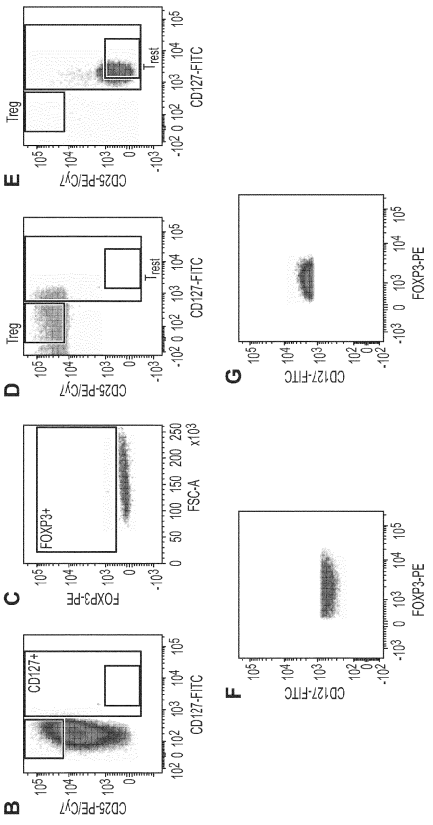
【図１６】



【図１７－１】



【図１７－２】



【図１８－１】

対照ワクチンを受けたマウスと比較したARG2ワクチンで処置したマウスのPan02腫瘍における差次的発現遺伝子(DEG)
（カットオフ補正p値<0.05および絶対log2倍率変化>0）

DEG - アップレギュレート				DEG - ダウンレギュレート			
番号	遺伝子	Log2 変化倍率	FDR	番号	遺伝子	Log2 変化倍率	FDR
1	Foxo4	0.22	5.00E-02	1	Get4	-0.20	3.11E-02
2	Fam193b	0.28	2.19E-02	2	Sf1	-0.21	5.00E-02
3	Tmem126b	0.45	5.00E-02	3	Samm50	-0.22	3.90E-02
4	Deptor	0.50	6.57E-03	4	Snx4	-0.24	3.06E-02
5	Lipe	0.60	7.61E-05	5	Tent4a	-0.28	1.32E-02
6	Rn18s	0.60	3.20E-02	6	Pip5k1a	-0.32	4.55E-02
7	Zfp953	0.62	1.98E-02	7	Pphln1	-0.34	4.55E-02
8	Gpr146	0.65	3.12E-02	8	Rfc5	-0.36	5.00E-02
9	Slc2a4rg-ps	0.66	4.85E-02	9	Glce	-0.36	3.33E-02
10	Snta1	0.67	1.07E-02	10	Pcbp2	-0.38	2.07E-02
11	Txnip	0.68	4.81E-03	11	Rpl37	-0.38	4.81E-03
12	Gsn	0.72	3.73E-02	12	Tamm41	-0.40	2.03E-02
13	Klf9	0.75	5.00E-02	13	Rpl8	-0.41	3.97E-02
14	Gbp7	0.76	3.76E-02	14	Espl1	-0.42	8.41E-03
15	Tmod2	0.80	3.98E-02	15	Scaf11	-0.50	4.12E-02
16	Rcsd1	0.81	4.22E-02	16	Tubgcp2	-0.52	4.63E-02
17	Naaa	0.81	3.96E-02	17	Arv1	-0.52	2.96E-02
18	Nnmt	0.82	3.94E-02	18	Cks2	-0.59	3.78E-02
19	Gm4951	0.83	2.67E-02	19	Cep72	-0.61	2.96E-02
20	Esr1	0.85	3.31E-02	20	Micall2	-0.62	2.22E-02
21	Acad12	0.87	1.35E-02	21	Utp4	-0.63	2.71E-02
22	Clec2d	0.88	2.56E-02	22	Incenp	-0.63	3.98E-02
23	Iqgap2	0.89	3.96E-02	23	Neil3	-0.78	2.77E-02
24	Cep85l	0.90	2.75E-02	24	Inhba	-0.85	2.46E-02
25	Stard8	0.91	3.98E-02	25	Htr1b	-1.20	3.90E-02
26	Glul	0.91	4.39E-02	26	Egr1	-1.27	3.96E-02
27	mt-Tp	0.95	4.51E-02	27	5730471H19Rik	-1.32	2.03E-02
28	Lrg1	0.96	4.66E-02	28	Gemin4	-1.78	2.90E-02
29	Calml4	1.00	1.32E-02	29	Clstn2	-1.85	3.73E-02
30	Tsc22d3	1.00	5.00E-02	30	9130024F11Rik	-2.19	9.07E-03
31	Sord	1.03	3.96E-02	31	Gm46606	-2.81	4.25E-02
32	Rilp	1.03	4.29E-02	32	Gm17322	-3.14	3.31E-02
33	A4galt	1.05	4.87E-03	33	Gzmd	-3.42	1.65E-02
34	Arhgap26	1.06	4.49E-02				
35	Dnhd1	1.07	2.07E-02				
36	Mll2	1.10	3.90E-02				
37	Gm7694	1.14	2.34E-02				
38	Abcd2	1.14	1.79E-07				
39	Gmpr	1.14	5.00E-02				
40	Cysltr1	1.19	2.84E-02				
41	Ppp1r9a	1.19	2.44E-02				
42	Cyp4b1	1.19	7.31E-03				
43	Slc36a2	1.19	4.44E-02				
44	Lifr	1.21	2.30E-02				
45	Slc12a8	1.23	4.63E-02				
46	Ccr2	1.24	4.85E-02				
47	Nqo1	1.24	4.25E-02				
48	Cib2	1.24	8.06E-03				
49	Adm	1.26	2.46E-02				
50	Zfp760	1.26	3.31E-02				
51	Marchf1	1.26	2.71E-02				
52	Tmem38b	1.27	4.87E-03				
53	Fam124a	1.27	2.44E-02				
54	Susd3	1.27	5.00E-02				
55	Pgap6	1.28	4.76E-02				
56	Unc45b	1.29	4.74E-02				
57	Gm26740	1.29	3.83E-02				
58	Nhlrc1	1.29	5.00E-02				
59	Prtg	1.30	2.56E-02				
60	Cd1d1	1.33	2.52E-02				
61	Ak8	1.33	5.00E-02				
62	Kif19a	1.36	3.63E-03				

【図１８－２】

63	Prtn3	1.36	4.87E-02				
64	Reps2	1.36	6.71E-03				
65	Acyp2	1.36	3.73E-02				
66	Tslp	1.37	4.02E-02				
67	Rragd	1.37	4.14E-02				
68	A530010L16Rik	1.38	5.00E-02				
69	Dhdh	1.39	3.15E-02				
70	Sectm1a	1.40	9.07E-03				
71	Fam13a	1.40	4.81E-03				
72	Slc38a4	1.41	1.05E-02				
73	Slc43a3	1.41	3.42E-02				
74	Rnase6	1.42	2.44E-02				
75	Vegfd	1.42	4.27E-02				
76	Gbp2b	1.45	4.87E-03				
77	Gspt2	1.47	4.86E-02				
78	Wfdc17	1.49	5.00E-02				
79	Tnfsf10	1.49	4.03E-04				
80	Clec10a	1.49	2.67E-02				
81	Ms4a4d	1.50	2.22E-02				
82	Gm47754	1.54	4.53E-02				
83	Celf3	1.55	4.76E-02				
84	Peg10	1.56	2.90E-02				
85	Gm20522	1.56	1.19E-02				
86	Acsl1	1.57	3.71E-02				
87	Tmem255b	1.57	3.73E-02				
88	Gpc3	1.58	2.10E-02				
89	Prxl2b	1.59	4.36E-02				
90	Clip4	1.60	3.66E-02				
91	9330159M07Rik	1.60	2.44E-02				
92	Ggt5	1.60	5.01E-03				
93	Six1	1.67	4.22E-02				
94	Gfra2	1.72	2.13E-02				
95	Gm11131	1.72	4.29E-02				
96	Tppp3	1.73	3.96E-02				
97	2310040G24Rik	1.73	4.81E-03				
98	Chrdl1	1.73	3.66E-02				
99	Ephx2	1.74	8.14E-03				
100	Gm12185	1.74	2.30E-02				
101	Cyp2j9	1.74	4.19E-02				
102	Kcna6	1.75	2.44E-02				
103	Tmeff2	1.76	2.14E-02				
104	Vtn	1.76	2.10E-02				
105	Ackr1	1.77	3.40E-02				
106	Tek	1.78	2.26E-02				
107	Agtr1a	1.79	4.63E-02				
108	1600010M07Rik	1.79	3.80E-02				
109	Plekhb1	1.80	2.56E-02				
110	Adap2os	1.81	3.11E-02				
111	Slfn8	1.82	3.81E-02				
112	Col4a4	1.82	3.73E-02				
113	Ddx60	1.83	3.73E-02				
114	Oas1b	1.84	3.96E-02				
115	Gldc	1.85	2.03E-02				
116	Ifi207	1.86	3.80E-02				
117	A030001D20Rik	1.88	3.32E-02				
118	Slc10a6	1.89	1.49E-02				
119	Cd38	1.90	3.73E-02				
120	Lpar4	1.90	3.73E-02				
121	Cd34	1.91	4.41E-02				
122	Ptpn3	1.92	3.80E-02				
123	Myoc	1.93	3.98E-02				
124	Lgi2	1.95	5.01E-04				
125	Hp	1.96	2.01E-04				
126	Ifit1	1.96	4.39E-02				
127	S100b	1.97	5.00E-02				
128	Thrsp	1.98	4.63E-02				
129	Ano3	1.98	2.25E-02				
130	Adamts5	2.00	3.94E-02				
131	Sptbn5	2.00	3.98E-02				

【図１８－３】

132	Pirb	2.01	4.92E-02				
133	Fgf10	2.01	1.35E-02				
134	BC064078	2.02	3.31E-02				
135	Slfn5	2.03	2.42E-02				
136	Lyz1	2.03	7.45E-03				
137	Clec4b1	2.04	3.06E-02				
138	Serpina3c	2.04	9.94E-04				
139	G0s2	2.05	4.81E-03				
140	Ppp1r3c	2.06	4.61E-03				
141	Enpep	2.07	1.04E-02				
142	Zbtb16	2.10	1.39E-03				
143	C4b	2.11	2.11E-02				
144	A530032D15Rik	2.13	1.65E-02				
145	Scn7a	2.13	5.27E-03				
146	Folr2	2.15	2.44E-02				
147	Arhgap20	2.17	7.94E-03				
148	Lrrc18	2.17	7.45E-03				
149	Tril	2.18	2.44E-02				
150	Hcar1	2.18	2.64E-02				
151	Kcna2	2.19	4.41E-02				
152	BC023105	2.19	4.81E-02				
153	Ms4a8a	2.19	6.57E-03				
154	Ifi205	2.20	1.71E-02				
155	Gm16026	2.22	4.46E-02				
156	Cmah	2.23	8.04E-03				
157	Rbp4	2.25	6.57E-03				
158	Pnp2	2.26	4.27E-02				
159	Entpd2	2.26	9.50E-03				
160	Usp18	2.26	4.53E-02				
161	Ebf2	2.30	3.55E-02				
162	Ccl9	2.30	3.96E-02				
163	Gm5431	2.31	2.13E-02				
164	Mx2	2.33	2.67E-02				
165	Cd55	2.33	5.00E-02				
166	Fgf9	2.34	2.67E-02				
167	Dhx58	2.36	4.25E-02				
168	Lyve1	2.38	1.03E-02				
169	Rnf165	2.39	3.36E-02				
170	H2-T24	2.39	3.98E-02				
171	Myrip	2.40	2.56E-02				
172	Gpr88	2.40	3.31E-02				
173	Vat1l	2.40	3.32E-02				
174	Slc28a2	2.41	3.90E-02				
175	Plagl1	2.41	3.73E-02				
176	Gabre	2.42	3.96E-02				
177	Ifi203-ps	2.44	2.64E-02				
178	Cxcl12	2.44	3.32E-02				
179	Vit	2.45	1.04E-05				
180	Papln	2.45	2.30E-02				
181	Slc4a4	2.46	6.44E-03				
182	Ifit3b	2.47	3.19E-02				
183	Sfrp4	2.47	1.65E-02				
184	Cadm3	2.47	4.87E-03				
185	Fabp4	2.48	8.75E-07				
186	H2bu2	2.48	2.90E-02				
187	Ifi204	2.49	2.97E-02				
188	Oas1a	2.49	2.57E-02				
189	Phf11b	2.52	3.60E-02				
190	Osr1	2.54	9.50E-03				
191	Steap4	2.54	2.48E-03				
192	Gm36161	2.56	4.02E-02				
193	Aldh1a1	2.56	4.03E-04				
194	Cadps2	2.56	2.34E-02				
195	Adgrg2	2.59	2.67E-02				
196	G530011O06Rik	2.61	9.11E-03				
197	Ifi209	2.63	3.60E-02				
198	Oas2	2.64	1.64E-02				
199	C1s2	2.66	4.63E-02				
200	Tnxb	2.67	3.83E-02				

【図１８－４】

201	Ifitm6	2.68	4.86E-03				
202	Gm14461	2.69	3.76E-02				
203	Efhd1	2.70	3.98E-02				
204	Oxtr	2.70	1.86E-02				
205	Adgre4	2.71	3.05E-02				
206	Arhgef37	2.72	3.96E-02				
207	Ccn3	2.73	4.22E-02				
208	Cldn19	2.74	2.90E-02				
209	Cfb	2.74	3.30E-02				
210	Kcna1	2.75	1.53E-02				
211	Mab21l1	2.77	3.31E-02				
212	Barx2	2.79	4.22E-02				
213	Ccl3	2.81	4.78E-02				
214	Isg15	2.83	4.06E-02				
215	Trim30c	2.83	1.65E-02				
216	Pwwp3b	2.83	3.83E-02				
217	Plac9a	2.84	3.63E-03				
218	Otof	2.88	2.30E-02				
219	BC147527	2.88	7.14E-03				
220	Ifi44	2.89	6.44E-03				
221	Oas1g	2.92	2.50E-02				
222	C7	2.93	7.90E-04				
223	Ptx3	2.94	3.01E-02				
224	Mpz	2.97	6.57E-03				
225	Fgf16	2.98	3.66E-02				
226	Mx1	3.06	2.03E-02				
227	Opcml	3.06	2.07E-02				
228	A530020G20Rik	3.07	3.05E-02				
229	Saa3	3.15	3.73E-02				
230	Spta1	3.17	2.84E-02				
231	Gm47445	3.17	4.92E-02				
232	Aass	3.18	1.05E-02				
233	Gdf10	3.18	5.27E-03				
234	Oas3	3.20	2.56E-02				
235	Gzma	3.20	4.57E-02				
236	Lmx1a	3.20	4.29E-02				
237	Gm15675	3.21	2.81E-02				
238	Gabra3	3.24	1.56E-03				
239	1700019D03Rik	3.26	1.56E-02				
240	Gm49839	3.28	4.69E-02				
241	Chga	3.31	2.33E-02				
242	Ifi27l2a	3.32	4.81E-03				
243	Ptchd1	3.33	4.76E-02				
244	Cmpk2	3.37	1.05E-02				
245	Cd36	3.37	2.56E-02				
246	Ifi208	3.38	8.49E-03				
247	Phf11a	3.43	1.93E-02				
248	Pex5l	3.50	4.87E-03				
249	Irf7	3.53	1.42E-02				
250	Hsd17b14	3.54	7.45E-03				
251	A130071D04Rik	3.55	3.86E-02				
252	Gdf3	3.59	3.96E-02				
253	Agtr2	3.60	3.63E-03				
254	5330406M23Rik	3.63	3.96E-02				
255	Ifi206	3.64	6.57E-03				
256	Ifi213	3.69	8.96E-03				
257	Nrk	3.73	2.10E-02				
258	Gm43775	3.88	3.66E-02				
259	Rsad2	3.89	1.31E-02				
260	Ppp2r2b	3.90	3.96E-02				
261	Ugt8a	3.96	3.96E-02				
262	Clec3b	3.97	1.89E-03				
263	Ighv5-17	4.15	3.78E-02				
264	Cd5l	4.15	1.56E-02				
265	Hspd1-ps4	4.15	3.26E-02				
266	Lpl	4.17	4.87E-03				
267	Ly6i	4.20	4.81E-02				
268	Ms4a4c	4.33	1.07E-02				
269	Ly6c2	4.34	1.32E-02				

【図１８－５】

270	Rhov	4.40	2.90E-02				
271	Neto1	4.50	2.46E-02				
272	Slfn4	4.58	2.84E-02				
273	Rtl3	4.86	1.50E-03				
274	Igkv6-17	5.00	2.84E-02				
275	Gm6545	5.12	6.71E-03				
276	Gm12796	5.19	1.32E-02				
277	Ankdd1a	5.26	3.36E-02				
278	Igkv4-68	5.41	3.80E-02				
279	Gm17749	5.78	2.28E-02				
280	Igkv19-93	5.87	2.67E-02				
281	Npy	6.31	2.85E-02				
282	Gm15056	6.55	3.31E-02				

【図１９－１】

対照ワクチンを受けたマウスと比較したARG2ワクチンで処置したマウスのPan02腫瘍における差次的アップレギュレート遺伝子に関連する生物学的プロセスの遺伝子オントロジー解析

差次的アップレギュレート遺伝子(FDR>0.05)に関連するGO生物学的プロセス
各プロセスは「免疫関連(1)/(1)」の列で免疫関連(1)または非免疫関連(0)として分類される。

GO 生物学的プロセスの完了	Mus musculus - REFLIST (21997)	upload_1 (50)	upload_1 (予測)	upload_1 (超える/超えない)	upload_1 (包含スコア)	upload_1 (p値エンリッチメント)	upload_1 (FDR)	免疫関連 (0/1)
response to interferon-beta (GO:0035456)	64	14	0.72	+	19.47	1.64E-13	3.69E-10	1
cellular response to interferon-beta (GO:0035458)	56	13	0.63	+	20.67	6.37E-13	1.11E-09	1
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	690	30	7.75	+	3.87	5.39E-10	5.00E-07	1
response to cytokine (GO:0034097)	792	32	8.9	+	3.6	7.85E-10	6.51E-07	1
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	489	25	5.61	+	4.46	1.08E-09	8.53E-07	1
immune system process (GO:0002376)	1494	62	16.82	+	3.21	2.17E-09	1.59E-06	1
regulation of cytokine production (GO:0001817)	773	30	8.68	+	3.45	6.77E-09	4.45E-06	1
immune response (GO:0006955)	1814	45	18.13	+	2.48	2.42E-08	1.38E-05	1
regulation of immune system process (GO:0002682)	1637	41	18.39	+	2.23	2.24E-06	8.61E-04	1
positive regulation of interferon-beta production (GO:0032728)	48	7	0.54	+	12.98	2.47E-06	9.27E-04	1
response to type I interferon (GO:0034340)	34	6	0.38	+	15.71	4.95E-06	1.77E-03	1
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)	62	7	0.7	+	10.05	1.15E-05	3.36E-03	1
positive regulation of type I interferon production (GO:0032481)	68	7	0.76	+	9.16	2.00E-05	4.85E-03	1
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	312	14	3.5	+	3.99	1.65E-05	4.88E-03	1
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0007204)	313	14	3.52	+	3.98	1.92E-05	4.88E-03	1
cellular response to type I interferon (GO:0071357)	25	5	0.28	+	17.8	1.84E-05	4.93E-03	1
type I interferon signalling pathway (GO:0060337)	25	5	0.28	+	17.8	1.84E-05	5.01E-03	1
regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	67	7	0.75	+	9.3	1.83E-05	5.06E-03	1
regulation of innate immune response (GO:0045088)	237	12	2.66	+	4.51	2.41E-05	5.79E-03	1
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	1094	29	12.29	+	2.36	2.45E-05	5.75E-03	1
innate immune response (GO:0045087)	875	25	9.83	+	2.54	2.57E-05	5.96E-03	1
regulation of immune response (GO:0050776)	1051	28	11.81	+	2.37	3.24E-05	7.30E-03	1
positive regulation of interleukin-1 production (GO:0032732)	74	7	0.83	+	8.42	3.31E-05	7.39E-03	1
response to interferon-alpha (GO:0035455)	31	5	0.35	+	14.36	4.62E-05	9.98E-03	1
positive regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032760)	109	8	1.22	+	6.53	4.98E-05	1.06E-02	1
positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	111	8	1.25	+	6.42	5.62E-05	1.15E-02	1
regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032680)	184	10	2.07	+	4.84	6.58E-05	1.31E-02	1
regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	187	10	2.1	+	4.76	7.48E-05	1.46E-02	1
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	86	7	0.97	+	7.25	8.06E-05	1.55E-02	1
cellular response to interferon-alpha (GO:0035457)	19	4	0.21	+	18.74	1.11E-04	2.00E-02	1
regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032651)	96	7	1.08	+	6.49	1.54E-04	2.63E-02	1
lymphocyte chemotaxis (GO:0048247)	42	5	0.47	+	10.6	1.70E-04	2.89E-02	1
regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	42	5	0.47	+	10.6	1.70E-04	2.89E-02	1
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	299	12	3.36	+	3.57	2.00E-04	3.22E-02	1
regulation of vasculature development (GO:1901342)	303	12	3.4	+	3.53	2.25E-04	3.52E-02	1
regulation of type I interferon production (GO:0032479)	103	7	1.16	+	6.05	2.31E-04	3.53E-02	1
T cell chemotaxis (GO:0010818)	9	3	0.1	+	29.67	2.77E-04	3.99E-02	1
negative regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000342)	10	3	0.11	+	26.71	3.57E-04	4.85E-02	1
negative regulation of IP-10 production (GO:0071659)	10	3	0.11	+	26.71	3.57E-04	4.89E-02	1
negative regulation of innate immune response (GO:0045824)	84	9	0.94	+	9.54	9.51E-07	4.05E-04	1
negative regulation of immune response (GO:0050777)	188	12	2.11	+	5.68	2.62E-06	9.60E-04	1
negative regulation of defense response (GO:0031348)	238	11	2.67	+	4.11	1.14E-04	2.02E-02	1
negative regulation of immune system process (GO:0002683)	446	15	5.03	+	2.98	2.26E-04	3.49E-02	1
negative regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060339)	24	4	0.27	+	14.84	2.47E-04	3.70E-02	1
defense response to virus (GO:0051607)	226	21	2.54	+	8.27	6.04E-13	1.19E-09	1
response to virus (GO:0009615)	287	22	3.22	+	6.82	5.87E-12	7.71E-09	1
response to bacterium (GO:0009617)	896	36	10.07	+	3.58	7.04E-11	7.93E-08	1
negative regulation of viral process (GO:0048525)	102	13	1.15	+	11.35	5.12E-10	5.05E-07	1
regulation of viral life cycle (GO:1903900)	143	14	1.61	+	8.72	2.57E-09	1.76E-06	1
regulation of viral genome replication (GO:0045069)	87	11	0.98	+	11.26	1.23E-08	7.68E-06	1
regulation of viral process (GO:0050792)	166	14	1.86	+	7.51	1.50E-08	9.13E-06	1
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1430	59	16.74	+	3.52	2.76E-17	1.45E-13	0

【図１９－２】

response to other organism (GO:0051707)	1488	59	16.72	+	3.53	2.60E-17	2.05E-13	0
biological process involved in interspecies interaction between organisms	1624	61	18.24	+	3.34	7.75E-17	3.06E-13	0
response to biotic stimulus (GO:0009607)	1529	60	17.18	+	3.49	2.08E-17	3.28E-13	0
response to external stimulus (GO:0009605)	2452	76	27.54	+	2.76	1.40E-16	4.40E-13	0
defense response (GO:0006952)	1493	57	16.77	+	3.4	5.19E-16	1.36E-12	0
defense response to symbiont (GO:0140546)	227	21	2.55	+	8.24	6.54E-13	1.03E-09	0
response to stimulus (GO:0050896)	8671	153	97.4	+	1.57	1.78E-12	2.54E-09	0
defense response to other organism (GO:0098542)	1119	42	12.57	+	3.34	1.19E-11	1.44E-08	0
negative regulation of viral genome replication (GO:0045071)	59	11	0.66	+	16.6	3.09E-10	3.25E-07	0
response to stress (GO:0006950)	3303	76	37.1	+	2.05	5.51E-10	4.82E-07	0
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	2900	69	32.58	+	2.12	1.22E-09	9.16E-07	0
response to organic substance (GO:0010033)	2608	62	29.3	+	2.12	1.63E-08	9.51E-06	0
cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	2473	59	27.78	+	2.12	2.60E-08	1.41E-05	0
positive regulation of gene expression (GO:0010628)	1203	37	13.51	+	2.74	4.07E-08	2.14E-05	0
response to chemical (GO:0042221)	3577	75	40.18	+	1.87	5.13E-08	2.61E-05	0
cellular response to organic substance (GO:0071310)	1866	48	20.96	+	2.29	7.46E-08	3.67E-05	0
positive regulation of multicellular organismal process (GO:0051240)	1639	44	18.41	+	2.39	8.82E-08	4.21E-05	0
positive regulation of biological process (GO:0048518)	6454	110	72.5	+	1.52	5.19E-07	2.34E-04	0
positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	2367	54	26.59	+	2.03	5.08E-07	2.35E-04	0
regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	967	30	10.86	+	2.76	7.50E-07	3.28E-04	0
regulation of nuclease activity (GO:0032069)	27	6	0.3	+	19.78	1.52E-06	6.16E-04	0
positive regulation of response to external stimulus (GO:0032103)	452	19	5.08	+	3.74	1.50E-06	6.21E-04	0
regulation of ribonuclease activity (GO:0060700)	15	5	0.17	+	29.67	2.20E-06	8.66E-04	0
positive regulation of cell communication (GO:0010647)	1764	42	19.82	+	2.12	5.21E-06	1.85E-03	0
sensory perception of smell (GO:0007608)	1124	0	12.63	-	< 0,01	5.51E-06	1.85E-03	0
positive regulation of signaling (GO:0023056)	1771	42	19.89	+	2.11	5.49E-06	1.88E-03	0
ion homeostasis (GO:0050801)	809	25	9.09	+	2.75	7.15E-06	2.35E-03	0
chemical homeostasis (GO:0048878)	1201	32	13.49	+	2.37	7.87E-06	2.48E-03	0
inorganic ion homeostasis (GO:0098771)	760	24	8.54	+	2.81	7.77E-06	2.50E-03	0
positive regulation of response to external stimulus (GO:0048522)	5933	99	66.65	+	1.49	9.84E-06	3.04E-03	0
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	4105	21	46.11	-	0.46	1.12E-05	3.33E-03	0
metal ion homeostasis (GO:0055065)	672	22	7.55	+	2.91	1.10E-05	3.34E-03	0
negative regulation of response to biotic stimulus (GO:0002832)	117	9	1.31	+	6.85	1.19E-05	3.40E-03	0
regulation of response to stimulus (GO:0048583)	4055	74	45.55	+	1.62	1.56E-05	4.38E-03	0
regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0051480)	357	15	4.01	+	3.74	1.96E-05	4.82E-03	0
cation homeostasis (GO:0055080)	751	23	8.44	+	2.73	1.94E-05	4.85E-03	0
homeostatic process (GO:0042592)	1680	39	18.87	+	2.07	1.91E-05	4.94E-03	0
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	1224	1	13.75	-	0.07	2.85E-05	6.51E-03	0
regulation of defense response (GO:0031347)	627	20	7.04	+	2.84	3.99E-05	8.74E-03	0
regulation of cellular response to growth factor stimulus (GO:0090287)	299	13	3.36	+	3.87	5.04E-05	1.06E-02	0
regulation of biological quality (GO:0065008)	3901	70	43.82	+	1.6	5.22E-05	1.08E-02	0
regulation of cold-induced thermogenesis (GO:0120161)	146	9	1.64	+	5.49	6.12E-05	1.24E-02	0
cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	1967	42	22.1	+	1.9	7.21E-05	1.41E-02	0
positive regulation of metabolic process (GO:0009893)	3772	67	42.37	+	1.58	9.07E-05	1.72E-02	0

【図１９－３】

regulation of response to biotic stimulus (GO:0002831)	364	14	4.09	+	3.42	9.23E-05	1.73E-02	0
positive regulation of signal transduction (GO:0009967)	1555	35	17.47	+	2	9.54E-05	1.77E-02	0
defense response to bacterium (GO:0042742)	513	17	5.76	+	2.95	9.80E-05	1.80E-02	0
cellular protein metabolic process (GO:0044267)	2999	14	33.69	-	0.42	1.08E-04	1.95E-02	0
cellular calcium ion homeostasis (GO:0006874)	470	16	5.28	+	3.03	1.17E-04	2.04E-02	0
divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072507)	531	17	5.96	+	2.85	1.46E-04	2.53E-02	0
positive regulation of cold-induced thermogenesis (GO:0120162)	98	7	1.1	+	6.36	1.73E-04	3.87E-02	0
cellular metal ion homeostasis (GO:0006875)	596	18	6.7	+	2.69	1.88E-04	3.09E-02	0
regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling	254	11	2.85	+	3.86	1.97E-04	3.20E-02	0
cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503)	495	16	5.56	+	2.88	2.06E-04	3.28E-02	0
calcium ion homeostasis (GO:0055074)	498	16	5.59	+	2.86	2.20E-04	3.47E-02	0
triglyceride metabolic process (GO:0006641)	72	6	0.81	+	7.42	2.33E-04	3.53E-02	0
regulation of morphogenesis of an epithelium (GO:1905330)	73	6	0.82	+	7.32	2.50E-04	3.61E-02	0
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	1804	6	20.27	-	0.3	2.49E-04	3.64E-02	0
cellular cation homeostasis (GO:0030003)	665	19	7.47	+	2.54	2.47E-04	3.64E-02	0
regulation of anatomical structure size (GO:0090066)	556	17	6.25	+	2.72	2.47E-04	3.67E-02	0
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	5553	38	62.38	-	0.61	2.80E-04	3.97E-02	0
positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	1005	25	11.29	+	2.21	3.18E-04	4.47E-02	0
cellular ion homeostasis (GO:0006873)	681	19	7.65	+	2.48	3.30E-04	4.60E-02	0
fatty acid metabolic process (GO:0006631)	366	13	4.11	+	3.16	3.44E-04	4.76E-02	0
regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000341)	27	4	0.3	+	13.19	3.69E-04	4.98E-02	0

【図１９－４】

差次的アップレギュレート遺伝子(FDR>0.05)に関連する免疫関連GO生物学的プロセス
免疫関連プロセスがカテゴリーに分類される

GO 生物学的プロセスの完了	カテゴリー	表示のための選択 (設14)	upload_1 (FDR)
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0007204)	Ca2+ 免疫活性化	X	4.88E-03
lymphocyte chemotaxis (GO:0048247)	T 細胞リンパ球	X	2.88E-02
T cell chemotaxis (GO:0010818)	T 細胞リンパ球	X	3.99E-02
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	サイトカイン	X	5.00E-07
response to cytokine (GO:0034097)	サイトカイン		6.51E-07
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	サイトカイン	X	8.53E-07
regulation of cytokine production (GO:0001817)	サイトカイン		4.45E-06
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	サイトカイン		4.88E-03
negative regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000342)	サイトカイン	X	4.85E-02
negative regulation of CXCL10 (IP-10) production (GO:0071659)	サイトカイン	X	4.89E-02
positive regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032760)	サイトカイン		1.06E-02
positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	サイトカイン	X	1.15E-02
regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032680)	サイトカイン		1.31E-02
regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	サイトカイン		1.46E-02
response to interferon-beta (GO:0035456)	I型インターフェロン	X	3.69E-10
cellular response to interferon-beta (GO:0035458)	I型インターフェロン		1.11E-09
positive regulation of interferon-beta production (GO:0032728)	I型インターフェロン		9.27E-04
response to type I interferon (GO:0034340)	I型インターフェロン		1.77E-03
positive regulation of type I interferon production (GO:0032481)	I型インターフェロン	X	4.85E-03
cellular response to type I interferon (GO:0071357)	I型インターフェロン	X	4.93E-03
type I interferon signalling pathway (GO:0060337)	I型インターフェロン		5.01E-03
regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	I型インターフェロン		5.06E-03
response to interferon-alpha (GO:0035455)	I型インターフェロン	X	9.98E-03
cellular response to interferon-alpha (GO:0035457)	I型インターフェロン		2.00E-02
regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	I型インターフェロン		2.89E-02
regulation of type I interferon production (GO:0032479)	I型インターフェロン		3.53E-02
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)	IL-1		3.36E-03
positive regulation of interleukin-1 production (GO:0032732)	IL-1	X	7.39E-03
regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032651)	IL-1		2.63E-02
immune system process (GO:0002376)	一般免疫応答	X	1.59E-06
immune response (GO:0006955)	一般免疫応答		1.38E-05
regulation of immune system process (GO:0002682)	一般免疫応答		8.61E-04
regulation of innate immune response (GO:0045088)	一般免疫応答		5.75E-03
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	一般免疫応答		5.75E-03
innate immune response (GO:0045087)	一般免疫応答		5.96E-03
regulation of immune response (GO:0050776)	一般免疫応答		7.30E-03
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	血管新生		1.55E-02
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	血管新生	X	3.22E-02
regulation of vasculature development (GO:1901342)	血管新生	X	3.52E-02

【配列表】
20255088400000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/054568

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 537 154 A2 (NANTOMICS LLC [US]) 11 September 2019 (2019-09-11) The query sequence SEQ ID NO:19 has 100.00 % identity (100.00 % over the entire subject, 4.24 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 91-105:1-15) with subject GSP:BGS93540 (length: 15) from US2019279771-A1 published on 2019-09-12. ----- -/--	1-16

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 May 2023	25/05/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seranski, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054568

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/099582 A1 (IO BIOTECH APS [DK]) 22 May 2020 (2020-05-22) cited in the application The query sequence SEQ ID NO:19 has 100.00 % identity (100.00 % over the entire subject, 2.82 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 17-26:1-10) with subject KPOP:OF794758 (length: 10) from KR20210093287-A/56 published on 2022-03-29. The query sequence SEQ ID NO:19 has 100.00 % identity (83.33 % over the entire subject, 4.24 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 89-103:4-18) with subject GSP:BHU83773 (length: 18) from WO2020099582-A1 published on 2020-05-22. -----	1-16
X	WO 2018/065563 A1 (HERLEV HOSPITAL [DK]) 12 April 2018 (2018-04-12) cited in the application The query sequence SEQ ID NO:19 has 100.00 % identity (100.00 % over the entire subject, 2.82 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 158-167:1-10) with subject GSP:BFE94032 (length: 10) from WO2018065563-A1 published on 2018-04-12. -----	1-16
X	WO 2020/072700 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US] ET AL.) 9 April 2020 (2020-04-09) The query sequence SEQ ID NO:19 has 100.00 % identity (100.00 % over the entire subject, 2.54 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 42-50:1-9) with subject GSP:BHO58203 (length: 9) from WO2020072700-A1 published on 2020-04-09. -----	1-16
A	MARKUS MUNDER: "Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, WILEY-BLACKWELL, UK, vol. 158, no. 3, 17 September 2009 (2009-09-17), pages 638-651, XP071104973, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1111/J.1476-5381.2009.00291.X the whole document -----	1-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/054568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3537154 A2	11-09-2019	AU 2019201463 A1	26-09-2019
		CA 3035956 A1	09-09-2019
		CN 110244052 A	17-09-2019
		EP 3537154 A2	11-09-2019
		JP 2019203878 A	28-11-2019
		KR 20190106809 A	18-09-2019
		US 2019279771 A1	12-09-2019
WO 2020099582 A1	22-05-2020	AU 2019378076 A1	27-05-2021
		CA 3118794 A1	22-05-2020
		CN 113164545 A	23-07-2021
		EP 3880225 A1	22-09-2021
		IL 283133 A	30-06-2021
		JP 2022507373 A	18-01-2022
		KR 20210093287 A	27-07-2021
		SG 11202104881V A	29-06-2021
		US 2021403566 A1	30-12-2021
		WO 2020099582 A1	22-05-2020
WO 2018065563 A1	12-04-2018	AU 2017341112 A1	02-05-2019
		CA 3039510 A1	12-04-2018
		CN 109890399 A	14-06-2019
		EP 3522905 A1	14-08-2019
		IL 265805 A	30-06-2019
		JP 7211938 B2	24-01-2023
		JP 2019537562 A	26-12-2019
		KR 20190077381 A	03-07-2019
		US 2019338270 A1	07-11-2019
		US 2021139877 A1	13-05-2021
		WO 2018065563 A1	12-04-2018
WO 2020072700 A1	09-04-2020	US 2021382068 A1	09-12-2021
		WO 2020072700 A1	09-04-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*37/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*1/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/18		
Ｃ１２Ｎ	*15/33*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783*	*(2010.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
			Ｃ１２Ｎ	15/33		
			Ｃ１２Ｎ	5/0783		

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

Ｆターム（参考） CA44 CA46

4C085 AA03 AA13 AA38 DD86 EE01 EE03 EE06 FF11 FF12 FF17 FF19