

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年11月23日(23.11.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/224096 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/00 (2006.01) A61K 38/08 (2019.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)

県柏市柏の葉六丁目5番1号 国立研究開発法人
国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 鈴
木 利宙(SUZUKI Toshihiro); 〒2778577 千葉県
柏市柏の葉六丁目5番1号 国立研究開発法人
国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/018618

(22) 国際出願日: 2023年5月18日(18.05.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
63/343,252 2022年5月18日(18.05.2022) US

(71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研
究センター(NATIONAL CANCER CENTER)
[JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁
目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中面 哲也 (NAKATSURA Tetsuya);
〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目5番1号
国立研究開発法人国立がん研究センター東病
院内 Chiba (JP). 竹之内 一政(TAKENOUCHI
Kazumasa); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁
目5番1号 国立研究開発法人国立がん研
究センター東病院内 Chiba (JP). 塚本 信夫
(TSUKAMOTO Nobuo); 〒2778577 千葉県柏市
柏の葉六丁目5番1号 国立研究開発法人国立
がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 下村 真
菜美(SHIMOMURA Manami); 〒2778577 千葉

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス(SIKS
& CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8
番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, 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, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: CANCER VACCINE USING COMMON CANCER ANTIGEN COCKTAIL, TCR/CAR-T CELL THERA-
PEUTIC, COMPANION DIAGNOSTIC METHOD, AND METHOD FOR DIAGNOSING CANCER ONSET RISK BY
BLOOD-CIRCULATING CANCER CELL DETECTION

(54) 発明の名称: 共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチン、TCR/CAR-T細胞治療薬、
コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a cancer vaccine that uses a common cancer
antigen cocktail, a TCR/CAR-T cell therapeutic, a companion diagnostic method, and a method for diagnosing cancer
onset risk by blood-circulating cancer cell detection. The present invention provides a cancer vaccine that includes (1)
common cancer antigens including 3 or more of GPC3, ROBO1, EPHB4, CLDN1, and LAT1, (2) partial peptides of the
3 or more common cancer antigens that have CTL inducibility, (3) dendritic cells stimulated by the partial peptides, or (4)
mRNA that codes for the common cancer antigens or the partial peptides.

(57) 要約: 本発明の課題は、共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチン、TCR/CAR-T細胞治
療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法を提供する
ことである。本発明によれば、(1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1
から選択される3種以上を含む共通がん抗原; (2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであっ
てCTL誘導能を有する部分ペプチド; (3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞; または(4) 前記
共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNAを含む、がんワクチンが提供される。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：

共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチン、TCR／CAR－T細胞治療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法

技術分野

[0001] 本発明は、共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチンに関する。本発明はさらに、TCR／CAR－T細胞治療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法に関する。

背景技術

[0002] がんと診断され、根治的な切除手術を受けたとしても、10年以上生存できない患者は多い。日本では毎年100万人ががんに罹患して、40万人が死亡している。がんを対象とした、がんワクチン、TCR／CAR－T細胞治療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法が開発されれば、毎年の罹患者100万人の多くが対象となるものと考えられる。また、将来的に採血でのがん発症リスク診断や発症リスク者へのがん予防ワクチンとしても使えるようになれば、全国民が対象となりうる。

[0003] しかし、これまでのがんに対するワクチン療法の開発はいずれも失敗に終わっている。TCR／CAR－T細胞治療も固形がんの治療法として有望なものは未だ登場していない。また、CTCを捕捉する技術も完成したと言えものではなく、CTCと思われる細胞を確実にがん細胞と証明してがんの再発・発症リスク診断につながる技術はない。注目されたネオアンチゲンを利用したワクチンやTCR－T細胞治療も個別化治療であり、開発コストや規制のハードルは高い。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 多くの人が適応となるがんワクチンやTCR遺伝子導入T細胞療法を開発するためには、標的とするがん細胞に発現している抗原が重要である。抗原としては、個別対応になるネオアンチゲンでは難しく、高頻度のがんで発現し、ほとんどの正常臓器に発現しない、いわゆる共通がん抗原が重要である。また、CAR-T細胞療法や抗体治療、あるいは血中循環がん細胞を捕捉するためには、特に、細胞膜に発現する共通がん抗原が必要になる。従来報告されているようながん精巢抗原など有名ながん抗原の多くは細胞膜には発現せず、発現頻度が少ない、あるいは正常組織にも発現しているといった問題があった。

[0005] 本発明は、共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチン、TCR/CAR-T細胞治療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、免疫組織化学的解析により、様々な固形がんを高頻度に発現し、正常組織にはほとんど発現しない10種類の共通がん抗原を同定した。そのうち5種類は膜蛋白抗原であり、これまで調べた頭頸部がん、肺がん、肝がん、胆道がん、膵がん、大腸がんといった固形がんにおいて、ほとんどの症例のがんに、これら5種類の抗原の少なくとも一以上が発現しており、これらの共通がん抗原カクテルはあらゆる固形がんをカバーできることを証明した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。

[0007] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

- <1> (1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1 (SLC7A5) から選択される3種以上を含む共通がん抗原；
- (2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチド；
- (3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞；または
- (4) 前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNA

を含む、がんワクチン。

<2> 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α (HSPH1)、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含む、<1>に記載のがんワクチン。

<3> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、<1>に記載のがんワクチン。

<4> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含む、<1>に記載のがんワクチン。

<5> 前記部分ペプチドが、配列番号1から80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドである、<1>から<4>の何れか一項に記載のがんワクチン。

<6> (1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1から選択される3種以上を含む共通がん抗原；

(2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチド；

(3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞；または

(4) 前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNAを含む、がんワクチン。

<7> 配列番号5、7～10、14～22、24～38、40、42、48、49、52～80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

<8> GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)を有するT細胞の混合物を含む、CAR-T細胞療法剤。

<9> 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含む、<8>に記載のCAR-T細胞療法剤。

<10> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、<8>に記載のCAR-T細胞療法剤。

<11> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含む、<8>に記載のCAR-T細胞療法剤。

<12> GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)を有するT細胞の混合物を含む、CAR-T細胞療法剤。

<13> GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上を含む共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体(TCR)を有するT細胞の混合物を含む、TCR-T細胞療法薬。

<14> 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含む、<13>に記載のTCR-T細胞療法剤。

<15> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、<13>に記載のTCR-T細胞療法剤。

<16> 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含む、<13>に記載のTCR-T細胞療法剤。

<17> GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの3種以上を含む共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体(TCR)を有するT細胞の混合物を含む、TCR-T細胞療法薬。

< 1 8 > T細胞受容体（TCR）が、
配列番号 1 0 3 のタンパク質と配列番号 1 0 4 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 0 5 のタンパク質と配列番号 1 0 6 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 0 7 のタンパク質と配列番号 1 0 8 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 0 9 のタンパク質と配列番号 1 1 0 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 1 1 のタンパク質と配列番号 1 1 2 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 2 3 のタンパク質と配列番号 1 2 4 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 2 5 のタンパク質と配列番号 1 2 6 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 2 7 のタンパク質と配列番号 1 2 8 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 2 9 又は 1 3 0 のタンパク質と配列番号 1 3 1 のタンパク質との
組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 1 3 2 のタンパク質と配列番号 1 3 3 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 3 4 のタンパク質と配列番号 1 3 5 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 3 6 のタンパク質と配列番号 1 3 7 のタンパク質との組み合わせ
からなるヘテロダイマー；
配列番号 1 3 8 又は 1 3 9 のタンパク質と配列番号 1 4 0 のタンパク質との
組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 1 4 1 のタンパク質と配列番号 1 4 2 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 3 のタンパク質と配列番号 1 4 4 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 5 のタンパク質と配列番号 1 4 6 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 7 のタンパク質と配列番号 1 4 8 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 7 のタンパク質と配列番号 1 7 8 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 9 のタンパク質と配列番号 1 8 0 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 1 のタンパク質と配列番号 1 8 2 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 3 のタンパク質と配列番号 1 8 4 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 3 のタンパク質と配列番号 1 9 4 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 5 のタンパク質と配列番号 1 9 6 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 7 のタンパク質と配列番号 1 9 8 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 9 又は 2 0 0 のタンパク質と配列番号 2 0 1 のタンパク質との

組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 2 0 2 のタンパク質と配列番号 2 0 3 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 2 1 6 のタンパク質と配列番号 2 1 7 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；または

配列番号 2 1 8 のタンパク質と配列番号 2 1 9 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

の何れかである、＜１３＞から＜１７＞の何れかーに記載のＴＣＲ－Ｔ細胞療法剤。

＜１９＞ 配列番号１０３～１１２、１２３～１４８、１７７～１８４、１９３～２０３、２１５～２１９の何れかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

＜２０＞ 配列番号１０３のタンパク質と配列番号１０４のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１０５のタンパク質と配列番号１０６のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１０７のタンパク質と配列番号１０８のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１０９のタンパク質と配列番号１１０のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１１１のタンパク質と配列番号１１２のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１２３のタンパク質と配列番号１２４のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１２５のタンパク質と配列番号１２６のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１２７のタンパク質と配列番号１２８のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１２９又は１３０のタンパク質と配列番号１３１のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１３２のタンパク質と配列番号１３３のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号１３４のタンパク質と配列番号１３５のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 6 のタンパク質と配列番号 1 3 7 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 8 又は 1 3 9 のタンパク質と配列番号 1 4 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 1 のタンパク質と配列番号 1 4 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 3 のタンパク質と配列番号 1 4 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 5 のタンパク質と配列番号 1 4 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 7 のタンパク質と配列番号 1 4 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 7 のタンパク質と配列番号 1 7 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 9 のタンパク質と配列番号 1 8 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 1 のタンパク質と配列番号 1 8 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 3 のタンパク質と配列番号 1 8 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 3 のタンパク質と配列番号 1 9 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 5 のタンパク質と配列番号 1 9 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 7 のタンパク質と配列番号 1 9 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 9 又は 2 0 0 のタンパク質と配列番号 2 0 1 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 202 のタンパク質と配列番号 203 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 216 のタンパク質と配列番号 217 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；または

配列番号 218 のタンパク質と配列番号 219 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

の何れかである、T細胞受容体（TCR）。

<21> 配列番号 113～122、149～176、185～192、204～214、220～224 の何れかの塩基配列を有する遺伝子。

<22> 対象者由来の試料における GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、および LAT1 のうちの 3 種以上の発現の有無、および HLA class I の細胞膜発現を多重蛍光免疫染色により同時に測定する工程 1、および上記発現の有無に基づいて、がんの免疫療法の適応を判定する工程 2 を含む、コンパニオン診断方法。

<23> 工程 1 において、さらに AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、および FOXM1 のうちの 1 種以上の発現の有無を測定する、<22> に記載のコンパニオン診断方法。

<24> 工程 1 において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、および LAT1 の全ての発現の有無を測定する、<22> に記載のコンパニオン診断方法。

<25> 工程 1 において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、および FOXM1 の全ての発現の有無を測定する、<22> に記載のコンパニオン診断方法。

<26> 対象者由来の血液試料における細胞について、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、および LAT1 のうちの 3 種以上の発現を分析することを含む、がんの発症リスクの診断方法。

<27> さらに AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およ

びFOX M1のうちの1種以上の発現を分析することを含む、＜26＞に記載のがんの発症リスクの診断方法。

＜28＞ GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全ての発現を分析する、＜26＞に記載のがんの発症リスクの診断方法。

＜29＞ GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全ての発現を分析する、＜26＞に記載のがんの発症リスクの診断方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、共通がん抗原カクテルを利用した、共通がん抗原カクテルを利用した、がんワクチン、TCR／CAR-T細胞治療薬、コンパニオン診断方法、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、肝細胞がんなどにおける10種の共通がん抗原の発現を確認するために、パラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学染色を実施した結果を示す。

[図2]図2は、GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROBO1の細胞膜発現型共通がん抗原の各がん種での発現を示す。

[図3]図3は、神経芽腫、腎芽腫、絨毛がんの小児がんにおける共通がん抗原の発現とHLA-Class Iの発現を示す。

[図4]図4は、肝細胞がんヒト臨床検体の非がん部における各共通がん抗原の発現を確認した結果を示す。

[図5]図5は、ヒト正常組織マイクロアレイを用いてGPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROBO1の31の正常組織における細胞膜発現型共通がん抗原の発現を表に示す。

[図6]図6は、TCR-T、CAR-T、がんワクチン等の免疫療法に、どの共通がん抗原を標的にすると効果的かを判定するために多重蛍光免疫染色を利用した適

用診断システム開発の概念を示す。

[図7]図7は、PDXは肝細胞がんと肺がん患者由来の標本、ヒト臨床検体には肝細胞がん、肝内胆管がん、中咽頭がん(HPV-)患者の標本を用いてGPC3, EPH B4, CLDN1, LAT1, R0B01の細胞膜発現型の共通がん抗原とHLA-Class Iを対象に多重蛍光免疫染色を行った結果を示す。

[図8]図8は、肝細胞がんならびに原発性大腸がんにおける各がん抗原の遺伝子発現を示す。

[図9]図9は、抗原予測を行った肝細胞がんならびに大腸がん肝転移における各がん抗原の遺伝子発現を示す。

[図10]図10は、がん抗原由来エピトープペプチドの予測パイプラインを示す。

[図11]図11は、肝細胞がんにおける各がん抗原由来ペプチドのSCOREadjの分布を示す。

[図12]図12は、肝細胞がん7症例において予測されたがん抗原ペプチドの総数を示す。

[図13]図13は、抗原特異的T細胞を誘導できる共通がん抗原由来エピトープペプチドの同定法を示す。10種類の共通がん抗原アミノ酸配列より、ブライトパス・バイオ社との共同研究で確立したアルゴリズムを用いて、HLA-A*24:02拘束性エピトープペプチドを72種類、HLA-A*02:01拘束性エピトープペプチドを73種類予測し、合成されたペプチドをトランスジェニックマウスにワクチンし、ELISpot法により抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図14]図14は、10種類の共通がん抗原蛋白質全長のアミノ酸配列から HLA-A*02:01に提示が予測されるペプチドを合成し、ヒトのHLA-A*02:01を全身の細胞に発現するマウスに、週に1回、計3回ペプチドワクチンを投与して、脾細胞中にペプチドに反応するCD8陽性キラーT細胞(CTL)を誘導できるペプチドをスクリーニングによって多数同定した結果を示す。

[図15]図15は、10種類の共通がん抗原蛋白質全長のアミノ酸配列から HLA-A*24:02に提示が予測されるペプチドを合成し、ヒトの HLA-A*24:02を全身の

細胞に発現するマウスに、週に1回、計3回ペプチドワクチンを投与して、脾細胞中にペプチドに反応するCD8陽性キラーT細胞(CTL)を誘導できるペプチドをスクリーニングによって多数同定した結果を示す。

[図16]図16は、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチド感作樹状細胞(DC)を、トランスジェニックマウスにワクチンすることによって、抗原特異的T細胞が誘導されるか、各HLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価する方法を示す。

[図17]図17は、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチド感作樹状細胞(DC)を、HLA-A*24:02トランスジェニックマウスにワクチンし、抗原特異的T細胞が誘導されるか、各HLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価した結果を示す。

[図18]図18は、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチド感作樹状細胞(DC)を、HLA-A*02:01トランスジェニックマウスにワクチンし、抗原特異的T細胞が誘導されるか、各HLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価した結果を示す。

[図19]図19は、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチドの配列を含むロングペプチドを用いて、ペプチドが実際に細胞内でプロセスされHLA上に提示されるかを確かめるために、HLA-A*02:01 TgmまたはHLA-A*24:02 Tgmを用いて検証した結果を示す。

[図20]図20は、LNP-Covid-19 Spike mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図21]図21は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的IFN- γ 産生の結果を示す。

[図22]図22は、LNP-eGFP mRNA を3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的IFN- γ 産生の結果を示す。

[図23]図23は、LNP-Covid-19 Spike mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的IFN- γ 産生の結果を示す。

[図24]図24は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を3回投与したHLA-A*24:02 Tgマ

ウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図25]図 2 5 は、LNP-eGFP mRNA を3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図26]図 2 6 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図27]図 2 7 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA 2回投与の投与方法を示す。

[図28]図 2 8 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を2回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図29]図 2 9 は、LNP-eGFP mRNA を2回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図30]図 3 0 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAを2回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図31]図 3 1 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図32]図 3 2 は、LNP-eGFP mRNA を2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図33]図 3 3 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAを2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

[図34]図 3 4 は、Spikeタンパク質に対する抗体測定の結果を示す。

[図35]図 3 5 は、LNP-hGPC3 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図36]図 3 6 は、LNP-hGPC3 mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図37]図 3 7 は、LNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を

示す。

[図38]図38は、LNP-hGPC3 mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図39]図39は、LNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図40]図40は、LNP-hROB01 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図41]図41は、LNP-hROB01 mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAをHLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図42]図42は、LNP-hROB01 mRNA あるいはLNP-eGFP mRNAをHLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図43]図43は、LNP-hCLDN1 mRNA あるいはLNP-hEPHB4 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図44]図44は、LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図45]図45は、LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図46]図46は、LNP-hTGFB1 mRNA あるいはLNP-hSPARC mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図47]図47は、LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的IFN- γ の産生を評価した結果を示す。

[図48]図48は、LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNA

NAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図49]図 4 9 は、LNP-hAFP mRNA あるいはLNP-hHSP105 α mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図50]図 5 0 は、LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図51]図 5 1 は、LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図52]図 5 2 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA 3回投与の投与方法を示す。

[図53]図 5 3 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA、あるいはLNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図54]図 5 4 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA、あるいはLNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*02:01 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により鼠径リンパ節での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図55]図 5 5 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA、あるいはLNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により脾臓細胞での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図56]図 5 6 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA、あるいはLNP-Luciferase mRNAを、HLA-A*24:02 Tgマウスに投与し、ELISPOT法により鼠径リンパ節での抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した結果を示す。

[図57]図 5 7 は、CD8分子のMHCへの結合阻害による高親和性T細胞クローンの選択法を示す。

[図58]図 5 8 は、GPC3ペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド特異的CTLクローンの樹立を示す。

[図59]図 5 9 は、FOXMIペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド

特異的CTLクローンの樹立を示す。

[図60]図 6 0 は、HSP105ペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド特異的CTLクローンの樹立を示す。

[図61]図 6 1 は、ヒトHLA遺伝子導入マウスを用いたペプチド反応性TCR遺伝子の同定を示す。

[図62]図 6 2 は、エレクトロポレーション法による共通がん抗原 (FOXM1) を認識するTCR-T細胞の作製を示す。

[図63]図 6 3 は、がんの多様性を克服するカクテルTCR-T細胞の開発スキームを示す。

[図64]図 6 4 は、CAR-T細胞によるin vitro 細胞傷害性評価を示す。

[図65]図 6 5 は、CAR-T細胞によるin vivo 細胞傷害性評価を示す。

[図66]図 6 6 は、カクテルCAR-T治療の開発を示す。

[図67]図 6 7 は、様々ながん細胞株における膜タンパク共通がん抗原の発現解析の結果を示す。

[図68]図 6 8 は、様々ながん細胞株における膜タンパク共通がん抗原の発現解析の結果を示す。

[図69]図 6 9 は、肝細胞がんの症例の採血検体中において、膜蛋白質共通がん抗原GPC3、ROBO1、CLDN1、EPHB4のいずれかを細胞膜に発現しているCTC様細胞を検出した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明者らは、免疫組織化学的解析により、様々な固形がんを高頻度に発現し、正常組織にはほとんど発現しない10種類の共通がん抗原を同定した。そのうち5種類は膜蛋白抗原であり、これまで調べた頭頸部がん、肺がん、肝がん、胆道がん、膵がん、大腸がんといった固形がんにおいて、ほとんどの症例のがんに、これら5種類の抗原の少なくとも一以上が発現しており、これらの共通がん抗原カクテルはあらゆる固形がんをカバーできることを証明した。これらの結果により、これらの共通がん抗原カクテルを利用した

、がんワクチン、TCR-T細胞治療、CAR-T細胞治療、それらのコンパニオン診断、および血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断が可能であることが示された。

[0011] 日本人の85%、世界の人口の50%はHLA-A24あるいは-A2を持っている。本発明においては、10種類の共通がん抗原蛋白質全長のアミノ酸配列から、HLA-A24に提示が予測されるペプチドおよびHLA-A2に提示が予測されるペプチドを合成し、ヒトのHLA-A24あるいは-A2を全身の細胞に発現するマウスに、週に1回、計3回ペプチドワクチンを投与して、脾細胞中にペプチドに反応するCD8陽性キラーT細胞（CTL）が誘導されることを証明した。これらのペプチドは、CTL誘導能に優れており、ペプチドワクチン、またはペプチドを付加した樹状細胞ワクチンにより、がんの治療、再発予防または予防に応用が可能である。また、10種類の共通がん抗原は、CTLを誘導できる多数のペプチド配列を含むものであり、mRNAワクチンとしても応用可能である。

[0012] さらに、10種類の共通がん抗原由来のペプチドワクチンの投与により誘導された、ペプチドに特異的に反応するCTLの細胞表面にあり、がん細胞表面のHLAとペプチドの複合体を認識するT細胞受容体（TCR）をクローニングすることにより、このTCRを遺伝子導入したT細胞療法（TCR-T治療）を開発することができる。各共通がん抗原ペプチドに反応できるTCRのレパトリーを増やすことにより、患者個々に最適な、あるいは、様々ながんに適応可能なカクテルTCR-T治療が可能である。10種類の膜蛋白共通がん抗原のいずれかはほとんどのがん組織に発現している。このことは、これらに対するカクテル抗体療法、あるいはカクテルCAR-T治療は、ほとんどの固形がんの治療法として使えることを意味している。

[0013] <共通がん抗原>

GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1は、それぞれ公知のタンパク質である。後記の実施例において、

hGPC3_isoform_2_NP_004475

hROB01_isoform_X5_XP_006713340(hROB01の細胞質内型)

hROB01_isoform_a_NP_002932(hROB01の膜局在型)

hEPHB4_NP_004435

hCLDN1_NP_066924

hSLC7A5_NP_003477

hAFP_isoform_1_NP_001125

hTGFB1_NP_000349

hSPARC_isoform_1_NP_003109

hFOXMI_isoform_2_NP_068772

hHSPH1_isoform_1_NP_006635

として記載したアミノ酸配列で表されるタンパク質、そのアイソフォーム、またはそのホモログを使用することができる。アイソフォームとしては、例えばスプライシングバリエーション、個体差に基づくSNP等のバリエーション等が挙げられる。具体的には、上記の実施例に記載したアミノ酸配列において、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質、(2)上記の実施例に記載したアミノ酸配列において、1または複数、好ましくは1～数個、さらに好ましくは、1～10個、1～5個、1～3個、1もしくは2個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0014] <ペプチドおよびタンパク質>

本発明におけるペプチドおよびタンパク質は、これをコードする遺伝子の塩基配列情報に基づくDNAのクローニング、プラスミド構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養及び培養物からのタンパク質の回収などの操作を含む一般的な遺伝子工学的手法によって、発現ベクター又はクローニングベクター等を用いて製造することができる。

[0015] 組み換えベクターは、ポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込むことにより製造することができる。ベクターは、宿主の種類及び使用目的により

適宜選択すればよい。ベクターとしては、例えば、染色体、エピソーム又はウイルス等に由来するベクターが挙げられる。具体的には、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス（例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、及びレトロウイルス等）等に由来するベクター及びそれらを組み合わせたベクター、プラスミド及びバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター（例えばコスミド及びファージミド等）が挙げられる。

[0016] ポリヌクレオチドを、公知の方法によりベクターに挿入することにより、ポリヌクレオチドを含む組換えベクターが得られる。

[0017] ポリヌクレオチドが組み込まれた組換えベクターは、公知の宿主、例えば大腸菌、バチルス属細菌のような細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞（例えば、COS-7細胞、Vero細胞、CHO細胞等）等に公知の方法で導入することにより、組換えベクターが導入された形質転換体を得られる。

[0018] 遺伝子導入は、当業者に公知の方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染等が挙げられる。

[0019] <がんワクチン>

本発明のがんワクチンは、

(1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原；

(2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチド；

(3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞；または

(4) 前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNAを含む。

- [0020] 共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含むものであればよく、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種、4種、または5種を含むものでもよい。好ましくは、共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含んでいてもよい。
- [0021] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択されるもの以外に、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含んでいてもよい。即ち、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種、2種、3種、4種または5種をさらに含んでいてもよい。
- [0022] 好ましくは、共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含むものでもよい。
- [0023] 本発明においては、上記した3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチドをがんワクチンとして使用することができる。即ち、部分ペプチドとしては、少なくとも3種類以上の部分ペプチドを使用することになる。
- [0024] 具体的には、部分ペプチドとしては、GPC3の部分ペプチド、ROBO1の部分ペプチド、EPHB4の部分ペプチド、CLDN1の部分ペプチド、およびLAT1の部分ペプチドから選択される3種以上を含むものであればよく、GPC3の部分ペプチド、ROBO1の部分ペプチド、EPHB4の部分ペプチド、CLDN1の部分ペプチド、およびLAT1の部分ペプチドから選択される3種、4種、または5種を含むものでもよい。好ましくは、部分ペプチドとしては、GPC3の部分ペプチド、ROBO1の部分ペプチド、EPHB4の部分ペプチド、CLDN1の部分ペプチド、およびLAT1の部分ペプチドの全てを含んでいてもよい。

[0025] GPC3の部分ペプチド、ROBO1の部分ペプチド、EPHB4の部分ペプチド、CLDN1の部分ペプチド、およびLAT1の部分ペプチドから選択されるもの以外に、部分ペプチドは、AFPの部分ペプチド、TGFB1の部分ペプチド、SPARCの部分ペプチド、HSP105 α の部分ペプチド、およびFOX M1の部分ペプチドのうちの1種以上をさらに含んでもよい。即ち、共通がん抗原は、AFPの部分ペプチド、TGFB1の部分ペプチド、SPARCの部分ペプチド、HSP105 α の部分ペプチド、およびFOX M1の部分ペプチドのうちの1種、2種、3種、4種または5種をさらに含んでもよい。

[0026] 好ましくは、部分ペプチドは、GPC3の部分ペプチド、ROBO1の部分ペプチド、EPHB4の部分ペプチド、CLDN1の部分ペプチド、LAT1の部分ペプチド、AFPの部分ペプチド、TGFB1の部分ペプチド、SPARCの部分ペプチド、HSP105 α の部分ペプチド、およびFOX M1の部分ペプチドの全てを含むものでもよい。

[0027] 上記の部分ペプチドは、エピトープペプチドであり、MHC（ヒトにおいてはHLA）と結合して、細胞表面に抗原提示され、かつ抗原性を有する（T細胞によって認識され得る）ペプチドである。エピトープペプチドとしては、MHCクラスIと結合して抗原提示され、CD8陽性T細胞に認識されるエピトープペプチドであるCTLエピトープペプチド、並びにMHCクラスIIと結合して抗原提示され、CD4陽性T細胞に認識されるエピトープペプチドであるヘルパーエピトープペプチドがある。本発明における部分ペプチドは、好ましくは、MHCクラスIと結合して抗原提示され、CD8陽性T細胞に認識されるエピトープペプチドであるCTLエピトープペプチドである。

[0028] 本発明における部分ペプチドは、腫瘍細胞において特異的に発現しているタンパク質由来のペプチドであり、腫瘍抗原ペプチドである。抗原提示とは、細胞内に存在するペプチドがMHCと結合し、このMHC／抗原ペプチド複合体が細胞表面に局在化する現象である。細胞表面に提示された抗原はT

細胞などにより認識された後、細胞性免疫や液性免疫を活性化する。MHCクラスⅠに提示された抗原は、細胞性免疫を活性化するとともに、ナイーブT細胞のT細胞受容体に認識され、ナイーブT細胞を、細胞傷害活性を有するCTLへと誘導するため、免疫療法に用いられる腫瘍抗原ペプチドとしては、MHCクラスⅠと結合し、抗原提示されるペプチドが好ましい。

[0029] 本発明における部分ペプチドは、上記の通り、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、またはFOX M1の部分ペプチドであって、MHC、特にHLAと結合するペプチドであり、好ましくはMHC、特にHLAにより抗原提示されるペプチドであり、さらに好ましくはMHC、特にHLAにより抗原提示されてCTLを誘導可能なペプチドである。部分ペプチドは、好ましくはHLAクラスⅠに結合可能であり、より好ましくはHLA-A02および/またはHLA-A24に結合可能である。

[0030] 部分ペプチドは、エペトープのアミノ酸配列を含む配列であれば、アミノ酸長は特に限定されないが、一般的にはアミノ酸長は約8～14アミノ酸程度が好ましく、約8～11アミノ酸程度がより好ましく、約9～約11アミノ酸程度が特に好ましい。

[0031] ヒトのMHCクラスⅠであるHLAクラスⅠと結合するエペトープペプチドは、約8～14アミノ酸長、好ましくは約9～11アミノ酸長であり、その配列中に結合するHLA特有の結合モチーフを有することが知られている。例えば、HLA-A02と結合するペプチドは、N末端から2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであってもよく、および/またはC末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであってもよいという結合モチーフを有してもよく、HLA-A24と結合するペプチドは、N末端から2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであってもよく、および/またはC末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであってもよい結合モチーフを有していてもよいが、上記に限定されるわけではない。

- [0032] したがって、部分ペプチドは、好ましくは、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、またはFOX M1の部分ペプチドであって、上記タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはメチオニンであってもよく、および／または、C末端のアミノ酸がバリン、ロイシンもしくはイソロイシンであるペプチドであってもよいエピトープペプチドを含む。あるいは、部分ペプチドは、好ましくは、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、またはFOX M1の部分ペプチドであって、上記タンパク質のアミノ酸配列中の連続する8～14アミノ酸からなり、N末端から第2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンもしくはトリプトファンであってもよく、および／または、C末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシンもしくはフェニルアラニンであってもよいペプチドであるが、上記に限定されるわけではない。
- [0033] 部分ペプチドは、N末端および／またはC末端が修飾されていてもよい。修飾として具体的には、N-アルカノイル化（例えば、アセチル化）、N-アルキル化（例えば、メチル化）、C末端アルキルエステル（例えば、エチルエステル）、およびC末端アミド（例えばカルボキサミド）等が挙げられる。
- [0034] 部分ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる既知の方法に準じて行うことができる。
- [0035] 上記した部分ペプチドとしては、配列番号1から80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドを使用することができる。
- [0036] 上記のペプチドのうち、配列番号5、7～10、14～22、24～38、40、42、48、49、52～80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドは新規ペプチドである。
- [0037] 上記した部分ペプチドはCTL誘導活性を有し、腫瘍抗原ペプチドとして

、C T L 誘導剤として使用することができる。すなわち、H L A - A 0 2 抗原またはH L A - A 2 4 抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、インビトロで上記した部分ペプチドを添加して刺激することにより、上記の部分ペプチドを提示したH L A - A 0 2 抗原陽性細胞、またはH L A - A 2 4 抗原陽性細胞を特異的に認識するC T L を誘導することができる。C T L の誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してC T L が産生する種々のサイトカイン（例えばI F N - γ ）の量を、例えばE L I S A 法などによって測定することにより、確認することができる。また5 1 C r で標識した抗原ペプチド提示細胞に対するC T L の傷害性を測定する方法によっても確認することもできる。

[0038] 本発明においては、部分ペプチドで刺激した樹状細胞をがんワクチンとして使用することができる。即ち、部分ペプチドと樹状細胞とをin vitroで接触させることにより、細胞表面にH L A - A 0 2 抗原またはH L A - A 2 4 抗原と本発明の部分ペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞を製造することができる。好ましくは、樹状細胞としては、がん患者由来の単離された細胞を使用することができる。樹状細胞は、例えば、がん患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をG M - C S F およびI L - 4 存在下で培養して樹状細胞を誘導することができる。上記のようにしてがん患者から単離された樹状細胞と、本発明の部分ペプチドをin vitroで接触させることにより、細胞表面にH L A - A 0 2 抗原またはH L A - A 2 4 抗原と部分ペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞を製造することができる。

[0039] 本発明においては、上記した共通がん抗原、または上記した部分ペプチドをコードするm R N A をがんワクチンとして使用することができる。共通がん抗原または部分ペプチドをコードするm R N A としては、複数の部分ペプチドをタンデムにコードするm R N A を使用してもよい。この場合、1 本のm R N A 上に複数の部分ペプチドがコードされることになる。

[0040] 本発明のがんワクチンは、がん患者に対して有効であり、特にH L A - A

O2またはHLA-A24陽性のがん患者に対して有効である。具体的には、例えば、肝細胞がん、大腸がん、中咽頭がん、食道がん、子宮がん、腎芽腫、肺がん、乳がん、舌がん、肝内胆管がん、腎がん、神経芽腫、絨毛がんなどの患者に対して有効である。

[0041] 本発明のがんワクチンは、がんの予防または治療のために使用することができる。がんの予防としては、患者のがんへの罹患の予防だけでなく、手術により原発巣の腫瘍を切除した患者における再発予防、手術、放射線療法もしくは薬物療法等のがん治療により完全に除去できなかった腫瘍の転移防止等が含まれる。がんの治療には、がんを縮小させるがんの治癒・症状改善のみでなく、がん細胞の増殖、腫瘍の拡大もしくは原発巣からのがん細胞の転移を抑制する進行防止等が含まれる。

[0042] 本発明のがんワクチンは、医薬組成物の形態で提供することができる。

本発明のがんワクチンの剤形は、経口投与剤又は非経口投与剤のいずれでもよいが、一般的には非経口投与剤が好ましい。非経口投与剤としては、皮下注射剤、筋肉内注射剤、静脈内注射剤、座剤などが挙げられる。

[0043] 本発明のがんワクチンが経口投与剤である場合は、上記した有効成分を、薬学的に許容される賦形剤とともに、がんワクチンに製剤化することができる。賦形剤としては、例えば、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、重合アミノ酸、及びアルブミン等が挙げられる。

[0044] 本発明のがんワクチンが非経口投与剤である場合は、上記した有効成分を、薬学的に許容される担体とともに、がんワクチンに製剤化することができる。担体としては、例えば、水、食塩、デキストロース、エタノール、グリセロール、及びDMSO等が挙げられる。

本発明のがんワクチンは、更に、所望により、アルブミン、湿潤剤、及び／又は乳化剤などを含んでもよい。

また、細胞性免疫の賦活化のために、上記した有効成分は、適当なアジュバントとともに使用することができる。本発明のがんワクチンは、当該アジ

ユバントを含有してもよい。

[0045] アジュバントとしては、当分野において既知のアジュバントが適用可能であり、具体的には、以下のものが挙げられる。ゲルタイプとしては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびリン酸カルシウムなどが挙げられる。菌体タイプとしては、C p G、モノホスホリルリピドA、コレラ毒素、大腸菌易熱性毒素、百日咳毒素およびムラミルジペプチドなどが挙げられる。油乳濁液タイプ（エマルション製剤）としては、フロイント不完全アジュバントなどが挙げられる。高分子ナノ粒子タイプとしては、リポソーム、生分解性マイクロスフェアおよびサポニン由来のQS-21などが挙げられる。合成タイプとしては、非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルペプチドアナログ、ポリホスファゼンおよび合成ポリヌクレオチドなどが挙げられる。サイトカインタイプとしてIFN- γ 、IL-2およびIL-12などが挙げられる。

[0046] 本発明のがんワクチン（医薬組成物）の剤形は、特に限定されないが、油乳濁液（エマルション製剤）、高分子ナノ粒子、リポソーム製剤、直径数 μ mのビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤などが挙げられる。

[0047] 本発明のがんワクチン（医薬組成物）の投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。がんワクチンにおける有効成分の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、成人（体重50kg）一人当たりで通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

[0048] また、部分ペプチドで刺激した樹状細胞をがんワクチンとして使用する場合には、上記の樹状細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与などが挙げられる。このような部分ペプチド

で刺激した樹状細胞を有効成分として含有するがんワクチンを患者の体内に戻すことにより、がん罹患している患者の体内で、本発明の共通がん抗原を発現するがん細胞に特異的なCTLが効率良く誘導され、その結果、がんを予防または治療することができる。

[0049] <CAR-T細胞療法剤>

本発明のCAR-T細胞療法剤は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)を有するT細胞の混合物を含む。

共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含むものであればよく、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種、4種、または5種を含むものでもよい。好ましくは、共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含んでいてもよい。

[0050] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択されるもの以外に、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含んでいてもよい。即ち、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種、2種、3種、4種または5種をさらに含んでいてもよい。

[0051] 好ましくは、共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含むものでもよい。

[0052] CAR-T細胞療法とは、腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体の一部に遺伝子操作を加えて改変したキメラ抗原受容体(CAR)を患者由来のT細胞に遺伝子導入し、この遺伝子改変T細胞を体外で増幅培養した後に患者に輸注するという免疫細胞治療法である。具体的には、患者から採取された末梢血単核球を抗CD3抗体とIL-2等の存在下で培養することによりT

細胞を活性化したのち、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなどの形質転換用ベクターを用いてCARをコードする遺伝子をT細胞に導入することにより、遺伝子改変T細胞を作製する。

[0053] キメラ抗原受容体は、がん細胞の細胞表面に存在する分子を認識する抗体の抗体可変領域の軽鎖と重鎖を直列に結合させた単鎖抗体（scFv）をN末端側に、T細胞受容体（TCR）／CD3複合体を構成する分子のうちCD3ζ鎖をC末端側に持つように設計されたキメラタンパク分子である。このキメラ抗原受容体は、scFv領域で特定の抗原を認識すると、CD3ζ鎖を介してT細胞の活性化が生じる。T細胞の活性化を増強するために、scFvとζ鎖の間に1または2以上の共刺激分子（例えばCD28、4-1BB、ICOSなど）を組み込んでもよい。scFvとして、TCR様抗体（TCR様抗体から設計され得る抗体分子またはその断片を含む）を用いてCARを作製することができる。腫瘍抗原由来のペプチドとMHCとの複合体を認識するCARは、CTLが標的とし得る腫瘍抗原ペプチドを提示しているがん細胞、がん細胞を貪食してMHCクラスⅠ上に腫瘍抗原ペプチドを提示している樹状細胞などを認識することができるため、前記CARを導入した遺伝子改変T細胞は、人工CTLと同様に、前記腫瘍抗原に特異的ながんの予防および／または治療剤として有用である。

[0054] キメラ抗原受容体（CAR）を有するT細胞（CAR-T細胞）は、そのまま、又は各種担体とともにCAR-T細胞療法剤に製剤することができる。

CAR-T細胞療法剤の剤形は、経口投与剤又は非経口投与剤のいずれであってもよい。一般的には非経口投与剤が好ましい。非経口投与剤としては、皮下注射剤、筋肉内注射剤、静脈内注射剤、座剤などが挙げられる。

[0055] CAR-T細胞療法剤が経口投与剤である場合は、得られたCAR-T細胞を、薬学的に許容される賦形剤とともに、CAR-T細胞療法剤に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、重合アミノ酸、及び

アルブミン等が挙げられる。

[0056] CAR-T細胞療法剤が非経口投与剤である場合は、得られたCAR-T細胞を、薬学的に許容される担体とともに、CAR-T細胞療法剤に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、水、食塩、デキストロース、エタノール、グリセロール、及びDMSO等が挙げられる。

[0057] <TCR-T細胞療法薬>

本発明のTCR-T細胞療法薬は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上を含む共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体（TCR）を有するT細胞の混合物を含む。

[0058] 共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含むものであればよく、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種、4種、または5種を含むものでもよい。好ましくは、共通がん抗原は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含んでいてもよい。

[0059] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択されるもの以外に、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含んでいてもよい。即ち、共通がん抗原は、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種、2種、3種、4種または5種をさらに含んでいてもよい。

[0060] 好ましくは、共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含むものでもよい。

[0061] 共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体（TCR）は、本発明の部分ペプチド（抗原ペプチド）とHLAとの複合体を認識することができる。

[0062] T細胞受容体（TCR）は、通常、TRAとTRBのヘテロダイマーである。

T細胞受容体（TCR）の具体例としては、後記の実施例における表2～表11に記載のものを使用することができる。即ち、具体的なT細胞受容体（TCR）としては、

配列番号103のタンパク質と配列番号104のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号105のタンパク質と配列番号106のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号107のタンパク質と配列番号108のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号109のタンパク質と配列番号110のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号111のタンパク質と配列番号112のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号123のタンパク質と配列番号124のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号125のタンパク質と配列番号126のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号127のタンパク質と配列番号128のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号129又は130のタンパク質と配列番号131のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号132のタンパク質と配列番号133のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号134のタンパク質と配列番号135のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号136のタンパク質と配列番号137のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 8 又は 1 3 9 のタンパク質と配列番号 1 4 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 1 のタンパク質と配列番号 1 4 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 3 のタンパク質と配列番号 1 4 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 5 のタンパク質と配列番号 1 4 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 7 のタンパク質と配列番号 1 4 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 7 のタンパク質と配列番号 1 7 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 9 のタンパク質と配列番号 1 8 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 1 のタンパク質と配列番号 1 8 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 3 のタンパク質と配列番号 1 8 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 3 のタンパク質と配列番号 1 9 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 5 のタンパク質と配列番号 1 9 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 7 のタンパク質と配列番号 1 9 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 9 又は 2 0 0 のタンパク質と配列番号 2 0 1 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 2 0 2 のタンパク質と配列番号 2 0 3 のタンパク質との組み合わせ

からなるヘテロダイマー；

配列番号 216 のタンパク質と配列番号 217 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；または

配列番号 218 のタンパク質と配列番号 219 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

を挙げることができる。

[0063] 上記した T 細胞受容体 (TCR) のアミノ酸配列及び塩基配列はいずれも新規な配列である。

本発明によれば、配列番号 103～112、123～148、177～184、193～203、215～219 の何れかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が提供される。

本発明によれば、配列番号 113～122、149～176、185～192、204～214、220～224 何れかの塩基配列を有する遺伝子が提供される。

[0064] 本発明の共通がん抗原の部分ペプチドと末梢血リンパ球とを *in vitro* で接触させることにより、T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞を誘導することができる。得られる T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞は、本発明の共通がん抗原を提示する細胞を特異的に傷害することができる。好ましくは、本発明の共通がん抗原の部分ペプチドを用いて、*in vitro* で患者末梢血リンパ球を刺激して T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞 (即ち、腫瘍特異的 CTL) を増やした後に、この T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞を患者に戻すことができる。

[0065] 上記の通り、T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞は、がんの治療剤または予防剤の有効成分とすることができ、TCR-T 細胞療法薬として使用することができる。TCR-T 細胞療法薬は、TCR-T 細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与などが挙げられる。このような TCR-T 細胞を有効成分として含有してなるが

んの治療または予防剤を患者の体内に戻すことにより、本発明の共通がん抗原が陽性のがんに罹患した患者の体内でTCR-T細胞によるがん細胞の傷害作用が促進され、がん細胞を破壊することにより、がんを治療することができる。

[0066] 本発明のTCR-T細胞は、腫瘍細胞に抗原提示されている部分ペプチドとHLAとの複合体を標的として細胞傷害活性を発揮することができる。すなわち本発明のTCR-T細胞のT細胞受容体(TCR)は、本発明の部分ペプチドとHLAとの複合体を認識するものである。

[0067] T細胞受容体(TCR)を有するT細胞(TCR-T細胞)は、そのまま、又は各種担体とともにTCR-T細胞薬に製剤することができる。

TCR-T細胞療法薬の剤形は、経口投与剤又は非経口投与剤のいずれであってもよい。一般的には非経口投与剤が好ましい。非経口投与剤としては、皮下注射剤、筋肉内注射剤、静脈内注射剤、座剤などが挙げられる。

[0068] TCR-T細胞療法薬が経口投与剤である場合は、得られたTCR-T細胞療法を、薬学的に許容される賦形剤とともに、TCR-T細胞療法薬に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、重合アミノ酸、及びアルブミン等が挙げられる。

[0069] TCR-T細胞療法薬が非経口投与剤である場合は、得られたTCR-T細胞療法を、薬学的に許容される担体とともに、TCR-T細胞療法薬に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、水、食塩、デキストロース、エタノール、グリセロール、及びDMSO等が挙げられる。

[0070] <コンパニオン診断方法>

本発明のコンパニオン診断方法は、対象者由来の試料におけるGPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上（即ち、3種、4種または5種）の発現の有無、およびHLA class Iの細胞膜発現を多重蛍光免疫染色により同時に測定する工程1、および上記発現の有無に基づいて、がんの免疫療法の適応を判定する工程2を含む。

[0071] 好ましくは、工程1において、さらにAFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上（即ち、1種、2種、3種、4種または5種）の発現の有無を測定してもよい。

好ましくは、工程1において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全ての発現の有無を測定してもよい。

好ましくは、工程1において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全ての発現の有無を測定してもよい。

[0072] 対象者由来の試料としては、特に限定されないが、肝臓、大腸、中咽頭、食道、子宮、腎臓、肺、乳房、舌、肝内胆管、神経、血液などを挙げることができる。

[0073] 本発明の共通がん抗原の発現の有無、およびHLA class Iの細胞膜発現は、多重蛍光免疫染色により同時に測定する。多重蛍光免疫染色は直接法または間接法のいずれでもよい。直接法においては、蛍光を直接標識した一次抗体を複数使用し、標識二次抗体は使用しない。直接法においては、二次抗体による交差反応を避けることができ、また系が簡単で操作時間が短い。間接法においては、一次抗体を複数使用し、それらの一次抗体に対する標識二次抗体を使用します。増幅法の併用などにより、直接法よりも高い感度で検出できるという利点がある。

[0074] 多重蛍光免疫染色において使用する蛍光色素は、励起波長および蛍光波長の蛍光スペクトルを考慮して、選択することができる。

[0075] 本発明のコンパニオン診断方法においては、がんを有する患者において、がんの治療のために治療薬を投与した場合における、改善の有無またはその程度を検査または診断することができる。さらに本発明のコンパニオン診断方法は、本発明のがんワクチン、TCR-T細胞治療薬またはCAR-T細胞治療薬を有効に適用できる治療対象患者の選択や、本発明のがんワクチン、TCR-T細胞治療薬またはCAR-T細胞治療薬による治療効果の予測や判定にも利用することができる。

[0076] <がんの発症リスクの診断方法>

本発明のがんの発症リスクの診断方法は、対象者由来の血液試料における細胞について、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上（即ち、3種、4種または5種）の発現を分析することを含む。

[0077] 好ましくは、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上（即ち、1種、2種、3種、4種または5種）の発現を分析してもよい。

好ましくは、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全ての発現を分析してもよい。

好ましくは、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全ての発現を分析してもよい。

[0078] 本発明のがんの発症リスクの診断方法においては、典型的には、対象者から血液を採取し、そこに含まれる細胞について、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上（即ち、3種、4種または5種）の発現を分析する。上記した共通がん抗原の発現量を検出または測定することにより、がんの罹患の有無またはその程度を検出、検査または診断することができる。

実施例

[0079] 実施例1：免疫組織化学的解析による共通がん抗原の発現解析、多重蛍光免疫染色システムでのコンパニオン診断法の開発

<方法>

様々なヒトがん組織のホルマリン固定パラフィンブロックより、4 μ mのパラフィン切片を作製した。正常組織のマイクロアレイスライドは市販のもの(BioChain社)を使用した。キシレンとエタノールによる脱パラフィンを行い、0.3% H_2O_2 /メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼを不活化した。抗原賦活化はTarget Retrieval Solution, pH9(Agilent社)もしくはAR6(AK0YA BIOSCI

ENCES社)不活化バッファーでのマイクロウェーブもしくは圧力釜による熱処理を行った。ブタ血清によるブロッキングを行った後、各抗原に対する一次抗体を反応させた。GPC3 (BIOMOSICS社, 300倍希釈)、AFP (Agikent社, Ready to Use)、ROB01 (PROTEINTECH社, 300倍希釈)、EPHB4 (Cell Signaling Technology社, 300倍希釈)、CLDN1 (Cell Signaling Technology社, 300倍希釈)、FOXMI (abcam社, 150倍希釈)、HSP105 α (abcam社, 200倍希釈)、SPARC (Santa Cruz Biotechnology社, 250倍希釈)、TGFB1 (abcam社, 100倍希釈)、HLA-ABC (Hokudo社, 200倍希釈)、LAT1 (abcam社, 200倍希釈)。二次抗体にはポリマー試薬(EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-RabbitもしくはEnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse)を用いた。発色にはLiquid DAB+ Substrate Chromogen Systemを使用した。ヘマトキシリンでの対比染色を行った後、エタノールとキシレンによる脱水、透徹処理を行った。プレパラートはNanoZoomer (Hamamatsu Photonics K.K.)によりバーチャルスライド化した。

[0080] 多重蛍光免疫組織化学染色の実施においてはキシレンとエタノールによる脱パラフィンを行い、0.3% H_2O_2 /メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼを不活化した。抗原賦活化はTarget Retrieval Solution, pH9(Agilent社)もしくはAR6(AKOYA BIOSCIENCES社)不活化バッファーでのマイクロウェーブによる熱処理を行った。ブタ血清によるブロッキングを行った後、各抗原に対する一次抗体を反応させた。GPC3 (BIOMOSICS社, 600倍希釈)、ROB01 (PROTEINTECH社, 600倍希釈)、EPHB4 (Cell Signaling Technology社, 300倍希釈)、CLDN1 (Cell Signaling Technology社, 1200倍希釈)、HLA-ABC (Hokudo社, 600倍希釈)、LAT1 (abcam社, 800倍希釈)。二次抗体にはポリマー試薬(EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-RabbitもしくはEnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse)を用いた。蛍光色素にOpal 520, 540, 570, 620, 650, 690(AKOYA BIOSCIENCES社)を各100倍希釈で使用した。DAPIでの核染色を行った後、水溶性封入剤による封入を行い、プレパラートをVectra3 (PerkinElmer)で観察した。

[0081] <結果>

図1は、肝細胞がんなどにおける10種の共通がん抗原の発現を確認するために、パラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学染色を実施した結果を示す。肝細胞がんのがん部においてGPC3, AFP, ROBO1, TGFBI, EPHB4, CLDN1は中程度から高度の発現を認め、非がん部における発現は陰性ないし弱程度のものであった。また、大部分の症例においてHLA-Class Iの細胞膜での発現を認めたことから肝細胞がんが発現している共通がん抗原はTCR-T, CAR-Tおよびがんワクチン療法の標的として優れていることを示した。大腸がん肝転移、中咽頭がん(HPV-)、大腸がん、食道がん、子宮がんにおいてSPARC, HSP105 α , FOXM1, TGFBI, EPHB4, CLDN1, LAT1は同様に中程度から高度の発現をしていることが確認された。

[0082] 図2は、GPC3, EPHB4, CLDN1, LAT1, ROBO1の細胞膜発現型共通がん抗原の各がん種での発現を示す。GPC3は肝細胞がんと小児がんの腎芽腫で共発現を認め、肺がん、食道がんといった扁平上皮がんでは弱から中程度の発現を認めた。EPHB4, CLDN1, ROBO1は肺がん、大腸がん、乳がん、舌がん、肝内胆管がん、腎がん、食道がんでは中程度から高度の発現を認め、LAT1は扁平上皮がんでは強発現している傾向にあった。

[0083] 図3は、神経芽腫、腎芽腫、絨毛がんの小児がんにおける共通がん抗原の発現とHLA-Class Iの発現を示す。細胞核発現型のFOXM1をはじめ、各共通がん抗原の中程度から高度の発現を認めるものの、HLA-Class Iの細胞膜での発現は確認できなかった。一方でGPC3, EPHB4, CLDN1, LAT1, ROBO1の細胞膜発現型の共通がん抗原は、神経芽腫、腎芽腫、絨毛がんのがん細胞の細胞膜にいずれかが中程度から高度の発現をしており、HLA-Class I非拘束性の性質を利用してCAR-T療法に応用できる可能性があることが分かった。

[0084] 図4は、肝細胞がんヒト臨床検体の非がん部における各共通がん抗原の発現を確認した結果を示す。GPC3, AFP, ROBO1, FOXM1, CLDN1は陰性であり、EPHB4とTGFBIは肝実質部の類洞に弱程度の発現を認めた。HLA-Class Iは肝実質細胞の細胞膜に弱程度の発現をみる。

[0085] 図5は、ヒト正常組織マイクロアレイを用いてGPC3, EPHB4, CLDN1, LAT1, ROBO1の31の正常組織における細胞膜発現型共通がん抗原の発現を表に示す。EPHB4とROBO1は弱程度に各種組織におけるシグナルを検出するもののはっきりとした細胞膜発現を確認できなかった。GPC3, CLDN1, LAT1は一部の組織にのみ明らかな発現を認める。

[0086] 図6は、TCR-T, CAR-T, がんワクチン等の免疫療法に、どの共通がん抗原を標的にすると効果的かを判定するために多重蛍光免疫染色を利用した適用診断システム開発の概念を示す。

[0087] 図7においては、PDXは肝細胞がんと肺がん患者由来の標本、ヒト臨床検体には肝細胞がん、肝内胆管がん、中咽頭がん(HPV-)患者の標本を用いてGPC3, EPHB4, CLDN1, LAT1, ROBO1の細胞膜発現型の共通がん抗原とHLA-Class Iを対象に多重蛍光免疫染色を行った。肝細胞がんPDXではGPC3が強発現しており、次いでCLDN1, EPHB4の発現が確認された。肺がんPDXではGPC3, EPHB4, CLDN1, LAT1がいずれかの組み合わせで中程度から高度に発現していた。ヒト臨床検体においては肝細胞がん患者と中咽頭がん(HPV-)患者でGPC3, CLDN1, LAT1だけでなく、HLA-Class Iの発現も認め、CAR-TだけでなくTCR-T, がんワクチンにも適用可能である可能性を示した。肝内胆管がん患者ではLAT1, 次いでEPHB4, CLDN1が適用可能抗原であることが確認された。

[0088] 実施例2：共通がん抗原の遺伝子発現とHLA結合ペプチドの予測

<方法>

図8は、肝細胞がんならびに原発性大腸がんにおける各がん抗原の遺伝子発現を示す。TCGA (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) に登録された肝細胞がん371例(左図)ならびに原発性大腸がん478例(右図)における各がん抗原の遺伝子発現を、ヒートマップで示した。各遺伝子の発現量は、 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ で正規化し、評価した。各がん抗原の名称について、高頻度または高発現を呈する抗原を赤、中頻度または中程度の発現を呈する抗原を緑、低頻度または低発現を呈する抗原を青、ほとんどの症例で発現が認められない抗原を黒で示した。

[0089] 図9は、抗原予測を行った肝細胞がんならびに原発性大腸がんにおける各がん抗原の遺伝子発現を示す。2016年から2023年までに国立がん研究センター東病院で外科的切除を受けた、肝細胞がん43例ならびに大腸がん由来転移性肝がん24例における各がん抗原の遺伝子発現を、ヒートマップで示した。各遺伝子の発現量は、 $\log_2(\text{TPM}+1)$ で正規化し、評価した。肝細胞がんについては、HBV陽性（5例）、HCV陽性（10例）、非ウイルス性（28例）に分類し、示した。

[0090] 図10は、がん抗原由来エピトープペプチドの予測パイプラインを示す。登録した症例の外科的切除検体より腫瘍ならびに正常肝組織を収集し、DNAならびにRNAを抽出し、全エクソンシーケンスならびにRNAシーケンスにより、がんで高発現するネオアンチゲンならびに共通がん抗原を選択した。全エクソンシーケンスの解析から各症例のHLAハプロタイプを決定し、MHC Class I (HLA-A, B, C) に対し高い結合力を持つペプチドを予測した。MHCへの結合力とそれぞれの抗原の発現量を因子として加えた予測器を構築し、がん抗原由来ペプチドの抗原性をSCOREadjとして算出した。

[0091] 図11は、肝細胞がんにおける各がん抗原由来ペプチドのSCOREadjの分布を示す。肝細胞がん1例において予測された各がん抗原由来ペプチドを、SCOREadjで分類（1~2：水色，2~3：オレンジ，3~4：灰色，4~5：黄色，5~6：青色，および6以上：緑色）し、その数を示した（上段、棒グラフ）。各がん抗原遺伝子の発現を、赤($\log_2 \text{TPM}=10$)~青($\log_2 \text{TPM}=1$)で示した。下段の棒グラフには、それぞれのがん抗原由来ペプチドで、SCOREadjが6以上のペプチドのみを抽出し、示した。

[0092] 図12は、肝細胞がん7症例において予測されたがん抗原ペプチドの総数を示す。肝細胞がん7症例について、同様の予測器を用いて各がん抗原由来ペプチドの抗原性を予測した。予測されたペプチドの総数（がん抗原由来でHLA-A、BならびにCに結合が予測されたペプチドの合計数）をSCOREadjで分類し、症例ごとに棒グラフで示した。

[0093] <結果>

肝細胞がんならびに大腸がんにおける12種の共通がん抗原の遺伝子発現を、TCGAに登録されたメタデータ、（肝細胞がん：TCGA-LIHC、大腸がん：TCGA-COAD）を用いて確認した。結果、CLDN1、SPARCならびにTGF β Iについては、ほとんどの症例において発現が確認された。LAT1、FOX M1、EPHB4ならびにHSP 105は、大腸がんでは大部分の症例で発現が認められるが、肝細胞がんでは高頻度で発現は見られるものの、大腸がんに比較し低発現であった。一方、肝細胞がんでは、GPC3またはAFPが高発現を呈する症例が認められるのに対し、大腸がんではこれらのがん抗原の発現は低値もしくは確認できなかった。ROB 01は、肝細胞がんで低い発現を認める症例が散見されるが、大腸がんでは大部分が低発現であった。NY-ESO-1およびWT1は、肝細胞がんならびに大腸がんにおいては、ほとんど発現が認められなかった。次に、我々が収集した肝細胞がんならびに転移性大腸がんの各症例について、腫瘍および正常組織より抽出したDNAまたはRNAを用いて全エクソン解析ならびにRNAシーケンス解析により、遺伝子変異に由来するネオアンチゲンとこれらの共通がん抗原の発現を評価し、がんワクチンの候補となりえるか、検討を行った。その結果、TCGAのメタデータを用いた解析と同様に、肝細胞がんにおいてはCLDN1、GPC3、SPARCならびにTGF β Iが高頻度で発現することが示された。AFPについても、まれに高発現する症例が認められた。転移性大腸がんにおいては、CLDN1、LAT1、HSP105、SPARCならびにTGF β Iが高頻度で発現するのに対し、ROB01、GPC3、AFPといった肝細胞がん特異的ながん抗原発現はほとんど認められず、原発性大腸がんと同様の傾向であった。一方、EPHB4ならびにFOX M1は、転移性大腸がんでは、一部の症例で発現が認められるにとどまっており、原発性大腸がんとのがん抗原発現の差異がある可能性が示された。以上の結果から、NY-ESO-1ならびにWT1を除いたこれらの10種類のがん抗原は、肝細胞がんまたは転移巣を含む大腸がん症例において、固形がんにおける多様性（heterogeneity）を克服する革新的な免疫療法の有望な標的となり得ると考えられる。

[0094] 続いて、実際にこれらのがん抗原を標的とした場合、がんを傷害、排除す

るCD8+T細胞の標的となるがん抗原由来エピトープがどの程度、各症例で存在しうるか、検証した。我々はこれまでに、ブライトパス・バイオ株式会社との共同研究によりnetMHCPan([https:// services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCPan-4.1/](https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCPan-4.1/))ならびにMHCFurry (<https://github.com/openvax/mhcfurry>) といった既存のHLA結合予測とタンパク質のプロテアソーム切断予測アルゴリズムであるNetChop (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetChop-3.1/>) を組み合わせ、さらにがん抗原の発現情報を加味した予測器を開発した。この予測器では、これらの複数の因子を、線形予測関数を用いて、最適化しSCOREadjとして評価を行う。我々は、これまでに、46症例の肝細胞がんまたは転移性大腸がんより予測したネオアンチゲン由来、278ペプチドを用いて、我々の予測器の有用性を検証し、国際誌 (Cancer Sci. 2022 Apr;113(4):1113-1124.) に報告している。これらの一連の予測では各症例における遺伝子発現情報を得ることが可能であるため、ネオアンチゲンのみならず、共通がん抗原の発現も同時に評価が可能である。そこで、実際に発現が高いがん抗原について、抗原性が高いと予測されるペプチドが各症例でどの程度認められるか検証した。肝細胞がん1症例について予測を行ってみたところ、どの抗原に対してもHLAの結合が予測されるペプチド群が抽出できた。SCOREadjが高いペプチドについて抽出した場合にも、期待通り、GPC3やROB01、FOX1、EPHB4などのがん抗原について、エピトープと期待されうるペプチドが30~40程度予測可能であった。ネオアンチゲンを標的とした検証では、強い免疫原性を呈したペプチドが予測したうちの50%程度であったことを考慮すると、がんワクチンの候補とするに十分な数の共通がん抗原由来のペプチドを選択可能であることがわかった。また、SPARCのように発現は高いが予測されたペプチド数が少ない場合や、逆に発現は同程度であるが、ROB01ではペプチド数が多く、逆にCLDN1では少ないといったように、予測されたSCOREadjの高いペプチドの数は抗原の発現量のみには依存せず、HLAへの結合親和性による影響が大きいことが示唆された。同様に、肝細胞がん6症例について検証した結果、どの症例においても100個程度の共通がん抗原由来ペプチドが

んペプチドワクチンの候補として有用であるといった予測がなされた。

[0095] がん抗原の発現量や発現パターンの多様性のみならず、各症例でHLAハプロタイプが異なることから、複数のがん抗原を標的としたカクテルワクチンは、患者ごとに予測された最適なペプチドの組み合わせを処方する個別化がんワクチンとしての開発が望ましい。一方、個別化医療はそのコストや準備や検査のために必要な時間が問題となることが多いが、複数の共通がん抗原由来の効果が期待できるペプチドの予測に加え、これらの10種類の共通がん抗原由来の免疫原性が確認されたペプチドライブラリを実装しオフザシェルフでの提供を可能にすることで、低コストでかつ短期間でより効果が高い、カクテルペプチドワクチンの提供が可能である。

[0096] 実施例3：共通がん抗原由来CTL誘導ペプチドの同定、ペプチドワクチン・ペプチドパルス樹状細胞ワクチンの開発

<方法>

図13においては、10種類の共通がん抗原アミノ酸配列より、ブライトパス・バイオ社との共同研究で確立したアルゴリズムを用いて、HLA-A*24:02拘束性エピトープペプチドを72種類、HLA-A*02:01拘束性エピトープペプチドを73種類予測し、合成した。次世代シーケンサーによる全エクソン解析およびRNAシーケンス解析を行い、得られた遺伝子変異とその発現データから、これらのHLAに結合しうるペプチドをin silicoで予測する。予測した抗原ペプチドがCTLを誘導することができるか、HLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価した。各ペプチドはDimethyl sulfoxide (DMSO, Wako)で10 mg/mlに溶解し、アジュバントとともにHLAトランスジェニックマウスに1週間毎3回免疫した。さらに1週間後に脾臓を摘出してIFN- γ の産生をIFN- γ ELISpot assayで評価した。

[0097] 図16においては、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチド感作樹状細胞(DC)を、トランスジェニックマウスにワクチンすることによって、抗原特異的T細胞が誘導されるか、各HLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価した。各ペプチドはDimethyl sulfoxide (DMS

0, Wako)で10 mg/mlに溶解し、各ペプチドを感作したDCを、1ペプチドあたり 1×10^5 個ずつ作製し、PBSで液量を調製して100 μ lの液量でHLA-A*02:01 TgmもしくはHLA-A*24:02 Tgmの尾根部皮内に27G注射針/1 mlシリンジ (Terumo)を用いて免疫した。免疫は1週ごとに計3回行い、3回目のワクチンから1週間後脾臓を摘出し、IFN- γ の産生をIFN- γ ELISpot assayで評価した。

[0098] DCは、HLA-A*02:01 TgmもしくはHLA-A*24:02 Tgmの大腿骨から採取したものを使用した。 2×10^6 個のDCを10 mlのFinal medium(10% FBS/1% L-glutamin/streptomycin-penicillin/NEAA/10 mM HEPES/Sodium pyruvate/2-ME (Gibco)) + 2-ME(1000倍希釈) + 20 ng/ml rmGM-CSF(PeproTech)に懸濁し、低接着の10 cmペトリディッシュ(AS ONE)に播種して培養を開始した。培養開始から3日目に、10 ml Final medium + 20 ng/ml rmGM-CSFを添加した。6日目に培地を半量コニカルチューブに取り、1,500 rpm, 5 min遠心して上清を除き、ペレットを新しい10 mlのFinal mediumで懸濁して同じディッシュに戻した。8日目に、6日目と同様に半量培地交換を行った。9日目にコニカルチューブにculture medium 10 mLを採取した。穏やかにピペティングして、非接着細胞および緩く接着している細胞を回収し、同じコニカルチューブに採取した。1500 rpm, 5 min遠心後、上清を捨てた。10 mLのserum free RPMIで懸濁し、1500 rpm, 5 minで遠心分離した。これを2回繰り返し (FBSを除くため)、上清を捨て、10 mLのserum free RPMIで懸濁し、maturation cytokine (20 ng/mL TNF α , 1 μ g/mL PGE2, 20 ng/mL IL-4, 0.1 μ M Zometa, 10 μ g/mL antigen peptide or no peptide for negative control)を加え、overnightで培養した。10日目に、各ペプチドで感作したDCをPBSで2回洗浄し、 1×10^5 /100 μ lに懸濁したものをマウスに投与した。

[0099] ELISpot assayは、免疫したマウスのsplenocyteをMACSによってCD8陽性T細胞に単離し、 1×10^5 cells/wellに懸濁したものをエフェクター細胞として使用した。未免疫マウスのsplenocyteをラジエーション(100kV, 10mA, 100Gy)し、各ペプチドを20ug/ml濃度で添加したFinal mediumで、 2×10^6 cells/we

IIの濃度に懸濁したものをターゲット細胞として使用した。

[0100] <結果>

図14、図15、表1においては、10種類の共通がん抗原蛋白質全長のアミノ酸配列から HLA-A*24:02またはHLA-A*02:01に提示が予測されるペプチドを合成し、ヒトの HLA-A*24:02あるいはHLA-A*02:01を全身の細胞に発現するマウスに、週に1回、計3回ペプチドワクチンを投与して、脾細胞中にペプチドに反応するCD8陽性キラーT細胞(CTL)を誘導できるペプチドをスクリーニングによって多数同定した。そのペプチドに反応するCTL誘導率は、HLA-A*24:02拘束性共通がん抗原ショートペプチドで72個中30個、HLA-A*02:01拘束性共通がん抗原ショートペプチドで73個中38個、あわせて145個中68個であった。これらのペプチドは、臨床試験で使用したGPC3ペプチドワクチンのペプチドよりもCTL誘導能に優れており、今後、様々ながんの再発予防、予防に応用可能である。

[0101]

[表1]

Restricted HLA type	Gene name	Peptide-ID	Sequence	Length (mer)	CTL induction	Long peptide reaction	Sequence (3文字版)	long peptide sequence
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 11	FLAELAYDL	9	○	○	Phe-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Tyr-Asp-Leu (配列番号 1)	VKNQLR[FLAELAYDL]DVDDAP (配列番号 6 9)
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 12	ELFDSLFPV	9	○	-	Glu-Leu-Phe-Asp-Ser-Leu-Phe-Pro-Val (配列番号 2)	
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 13	TIHDSIQYV	9	○	○	Thr-Ile-His-Asp-Ser-Ile-Gln-Tyr-Val (配列番号 3)	LLGLFS[TIHDSIQYV]QKNAG (配列番号 7 0)
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 15	VLLGLFSTI	9	○	○	Val-Leu-Leu-Gly-Leu-Phe-Ser-Thr-Ile (配列番号 4)	DMEN[VLLGLFSTI]HDSIQY (配列番号 7 1)
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-10	RIYDME NVLL	10	○	-	Arg-Ile-Tyr-Asp-Met-Glu-Asn-Val-Leu-Leu (配列番号 5)	
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-12	FLIIQNA AV	9	○	✕	Phe-Leu-Ile-Ile-Gln-Asn-Ala-Ala-Val (配列番号 6)	
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-14	STIHDSIQYV	10	○	○	Ser-Thr-Ile-His-Asp-Ser-Ile-Gln-Tyr-Val (配列番号 7)	LLGLF[STIHDSIQYV]QKNAG (配列番号 7 2)
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-18	FFTDVSLYI	9	○	-	Phe-Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile (配列番号 8)	
HLA-A*02:01	HSPH1	CA02 21	FLRRGPFEL	9	○	-	Phe-Leu-Arg-Arg-Gly-Pro-Phe-Glu-Leu (配列番号 9)	

HLA-A*02:01	HSPH1	CA02 24	LLQKIEV PL	9	○	-	Leu-Leu-Gln-Lys-Ile-Glu-Val-Pro-Leu (配列番号 1 0)	
HLA-A*02:01	FOXMI	CA0233	KMKPLL PRV	9	○	-	Lys-Met-Lys-Pro-Leu-Leu-Pro-Arg-Val (配列番号 1 1)	
HLA-A*02:01	FOXMI	CA0235	TMNDS LSKI	9	○	✕	Thr-Met-Asn-Asp-Ser-Leu-Ser-Lys-Ile (配列番号 1 2)	
HLA-A*02:01	SPARC	CA02 52	RLEAGD HPV	9	○	✕	Arg-Leu-Glu-Ala-Gly-Asp-His-Pro-Val (配列番号 1 3)	
HLA-A*02:01	SPARC	CA02 56	FLLCLA GRAL	10	○	✕	Phe-Leu-Leu-Cys-Leu-Ala-Gly-Arg-Ala-Leu (配列番号 1 4)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 81	VLDSL SNV	9	○	-	Val-Leu-Asp-Ser-Leu-Val-Ser-Asn-Val (配列番号 1 5)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 82	HLIDKVI STI	10	○	-	His-Leu-Ile-Asp-Lys-Val-Ile-Ser-Thr-Ile (配列番号 1 6)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 83	SLVSNV NIEL	10	○	○	Ser-Leu-Val-Ser-Asn-Val-Asn-Ile-Glu-Leu (配列番号 1 7)	EVLD[SLVSNVNI EL]LNAL (配列番号 7 3)
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 86	MLVAAI QSA	9	○	✕	Met-Leu-Val-Ala-Ala-Ile-Gln-Ser-Ala (配列番号 1 8)	
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 91	YIIEAFS HA	9	○	-	Tyr-Ile-Ile-Glu-Ala-Phe-Ser-His-Ala (配列番号 1 9)	

HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 92	TVDGST FSV	9	○	-	Thr-Val-Asp-Gly-Ser- Thr-Phe-Ser-Val (配列 番号 2 0)	
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 95	ILMVFSI WL	9	○	○	Ile-Leu-Met-Val-Phe- Ser-Ile-Trp-Leu (配列 番号 2 1)	I[ILMVFSIWL]YR HRK (配列番号 7 4)
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 97	VIADRP PPV	9	○	○	Val-Ile-Ala-Asp-Arg- Pro-Pro-Pro-Val (配列 番号 2 2)	YLEVTD[VIADRP PPV]IRQGP (配 列番号 7 5)
HLA-A*02:01	AFP	CA02 101	FIFHKD LCQA	10	○	✕	Phe-Ile-Phe-His-Lys- Asp-Leu-Cys-Gln-Ala (配列番号 2 3)	
HLA-A*02:01	AFP	CA02 103	FIFHKD LCQ	9	○	✕	Phe-Ile-Phe-His-Lys- Asp-Leu-Cys-Gln (配列 番号 2 4)	
HLA-A*02:01	AFP	CA02 104	DFSGLL EKC	9	○	✕	Asp-Phe-Ser-Gly-Leu- Leu-Glu-Lys-Cys (配列 番号 2 5)	
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 121	GLDEEQ HSV	9	○	○	Gly-Leu-Asp-Glu-Glu- Gln-His-Ser-Val (配列 番号 2 6)	LS[GLDEEQHSV]RTYE (配列番号 7 6)
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 122	YLIGHG TKV	9	○	-	Tyr-Leu-Ile-Gly-His- Gly-Thr-Lys-Val (配列 番号 2 7)	
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 123	RLNDG QFTV	9	○	○	Arg-Leu-Asn-Asp-Gly- Gln-Phe-Thr-Val (配列 番号 2 8)	ALDSFL[RLNDG QFTV]IQ (配列 番号 7 7)
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 126	GQFTVI QLV	9	○	-	Gly-Gln-Phe-Thr-Val- Ile-Gln-Leu-Val (配列 番号 2 9)	

HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 127	FTYEDP NEAV	10	○	-	Phe-Thr-Tyr-Glu-Asp- Pro-Asn-Glu-Ala-Val (配列番号 3 0)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1- A02-2	ALFTGW AAA	9	○	✕	Ala-Leu-Phe-Thr-Gly- Trp-Ala-Ala-Ala (配列 番号 3 1)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1- A02-5	YSYAGD NIV	9	○	-	Tyr-Ser-Tyr-Ala-Gly- Asp-Asn-Ile-Val (配列 番号 3 2)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1- A02-6	LQLLGF LA	9	○	-	Leu-Gln-Leu-Leu-Gly- Phe-Ile-Leu-Ala (配列 番号 3 3)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1- A02-1	QLLTPV PSL	9	○	✕	Gln-Leu-Leu-Thr-Pro- Val-Pro-Ser-Leu (配列 番号 3 4)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1- A02-2	LLTPVP SLV	9	○	-	Leu-Leu-Thr-Pro-Val- Pro-Ser-Leu-Val (配列 番号 3 5)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1- A02-3	KLDVGN IVL	9	○	-	Lys-Leu-Asp-Val-Gly- Asn-Ile-Val-Leu (配列 番号 3 6)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1- A02-4	ILSMIHP QL	9	○	✕	Ile-Leu-Ser-Met-Ile- His-Pro-Gln-Leu (配列 番号 3 7)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1- A02-5	YMLEVY GSL	9	○	✕	Tyr-Met-Leu-Glu-Val- Tyr-Gly-Ser-Leu (配列 番号 3 8)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24- GPC3-06	KYWRE YILSL	10	○	✕	Lys-Tyr-Trp-Arg-Glu- Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu (配列番号 3 9)	

HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-10	FFTDVSLYI	9	○	-	Phe-Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile (配列番号 4 0)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-11	AYYPEDLFI	9	○	✕	Ala-Tyr-Tyr-Pro-Glu-Asp-Leu-Phe-Ile (配列番号 4 1)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-17	AFEFVG EFF	9	○	✕	Ala-Phe-Glu-Phe-Val-Gly-Glu-Phe-Phe (配列番号 4 2)	
HLA-A*24:02	HSPH1	CA24 21	HYAKIA ADF	9	○	✕	His-Tyr-Ala-Lys-Ile-Ala-Ala-Asp-Phe (配列番号 4 3)	
HLA-A*24:02	FOXMI 1	CA24 31	RYLTLDQVF	9	○	✕	Arg-Tyr-Leu-Thr-Leu-Asp-Gln-Val-Phe (配列番号 4 4)	
HLA-A*24:02	FOXMI 1	CA24 32	IYTWIEDHF	9	○	✕	Ile-Tyr-Thr-Trp-Ile-Glu-Asp-His-Phe (配列番号 4 5)	
HLA-A*24:02	FOXMI 1	CA24 34	SYMAMIQFAI	10	○	✕	Ser-Tyr-Met-Ala-Met-Ile-Gln-Phe-Ala-Ile (配列番号 4 6)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 51	MYIFPVHWQF	10	○	✕	Met-Tyr-Ile-Phe-Pro-Val-His-Trp-Gln-Phe (配列番号 4 7)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 52	YIFPVHWQF	9	○	✕	Tyr-Ile-Phe-Pro-Val-His-Trp-Gln-Phe (配列番号 4 8)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 53	TFDSSCHFF	9	○	✕	Thr-Phe-Asp-Ser-Ser-Cys-His-Phe-Phe (配列番号 4 9)	

HLA-A*24:02	SPARC	CA24 54	DYIGPC KYI	9	○	-	Asp-Tyr-Ile-Gly-Pro- Cys-Lys-Tyr-Ile (配列 番号 5 0)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 55	HFFATK CTL	9	○	-	His-Phe-Phe-Ala-Thr- Lys-Cys-Thr-Leu (配列 番号 5 1)	
HLA-A*24:02	TGFBI	CA24 85	KYFTNC KQW	9	○	-	Lys-Tyr-Phe-Thr-Asn- Cys-Lys-Gln-Trp (配列 番号 5 2)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 91	AYLEVT DVI	9	○	-	Ala-Tyr-Leu-Glu-Val- Thr-Asp-Val-Ile (配列 番号 5 3)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 95	KYVCGV TNM	9	○	-	Lys-Tyr-Val-Cys-Val- Gly-Thr-Asn-Met (配列 番号 5 4)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 97	YYICQT LNV	9	○	✖	Tyr-Tyr-Ile-Cys-Gln- Thr-Leu-Asn-Val (配列 番号 5 5)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 98	ILPYCR PTF	9	○	○	Ile-Leu-Pro-Tyr-Cys- Arg-Pro-Thr-Phe (配列 番号 5 6)	LIQED[ILPYCRP TF]PTSN (配列 番号 7 8)
HLA-A*24:02	AFP	CA24 102	DFSGLL EKC	9	○	✖	Asp-Phe-Ser-Gly-Leu- Leu-Glu-Lys-Cys (配列 番号 5 7)	
HLA-A*24:02	AFP	CA24 105	ADFSGL LEKC	10	○	✖	Ala-Asp-Phe-Ser-Gly- Leu-Leu-Glu-Lys-Cys (配列番号 5 8)	
HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 123	AWSYGI VMW	9	○	-	Ala-Trp-Ser-Tyr-Gly- Ile-Val-Met-Trp (配列 番号 5 9)	

HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 124	SYGIVM WEV	9	○	○	Ser-Tyr-Gly-Ile-Val- Met-Trp-Glu-Val (配列 番号 6 0)	[SYGIVMWEV]M SFGER (配列番 号 7 9)
HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 127	IVMWEV MSF	9	○	-	Ile-Val-Met-Trp-Glu- Val-Met-Ser-Phe (配列 番号 6 1)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1- A24-2	WYGNRI VQEF	10	○	✕	Trp-Tyr-Gly-Asn-Arg- Ile-Val-Gln-Glu-Phe (配列番号 6 2)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1- A24-4	YGNRIV QEF	9	○	✕	Tyr-Gly-Asn-Arg-Ile- Val-Gln-Glu-Phe (配列 番号 6 3)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1- A24-5	EFGQAL FTGW	10	○	✕	Glu-Phe-Gly-Gln-Ala- Leu-Phe-Thr-Gly-Trp (配列番号 6 4)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1- A24-7	GWAAA SLCL	9	○	✕	Gly-Trp-Ala-Ala-Ala- Ser-Leu-Cys-Leu (配列 番号 6 5)	
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1- A24-2	CYAELG TTI	9	○	○	Cys-Tyr-Ala-Glu-Leu- Gly-Thr-Thr-Ile (配列番 号 6 6)	VGAL[CYAELGT TI]SKSG (配列番 号 8 0)
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1- A24-5	AYMLEV YGSL	10	○	✕	Ala-Tyr-Met-Leu-Glu- Val-Tyr-Gly-Ser-Leu (配列番号 6 7)	
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1- A24-6	VMSWII PVF	9	○	-	Val-Met-Ser-Trp-Ile- Ile-Pro-Val-Phe (配列 番号 6 8)	

[0102] 図 1 7 及び図 1 8 においては、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来シ
ョートペプチド感作樹状細胞(DC)を、HLA-A*24:02またはHLA-A*02:01トラン
スジェニックマウスにワクチンし、抗原特異的T細胞が誘導されるか、各HLA
遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて評価した。その結果、
多数のペプチドについて、共通がん抗原ペプチド感作樹状細胞ワクチンによ
る抗原特異的なCTLの誘導を I F N - γ ELISpot assayによって確認するこ
とができた。使用したペプチドは、主に肝細胞がんを高発現がみられる抗原の

中で、ペプチドワクチンによってCTLの誘導が高かったペプチドを、各抗原につき3つずつ選択した。選択したペプチドをDCに感作させ、トランスジェニックマウスにワクチンを行い、 $\text{IFN-}\gamma$ ELISpot assayを用いて抗原特異的なCTLの誘導能の評価を行った。

[0103] 図19においては、CTLの誘導が確認された共通がん抗原由来ショートペプチドの配列を含むロングペプチドを用いて、ペプチドが実際に細胞内でプロセシされHLA上に提示されるかを確かめるために、HLA-A*02:01 TgmまたはHLA-A*24:02 Tgmを用いて検証した。ロングペプチドとは、ペプチドに反応するCTLを誘導できた9~10merから成るショートペプチドのアミノ酸配列を含むようにデザインされた長鎖のペプチド(15~21mer)であり、このロングペプチドをワクチンすることにより、実際に細胞内でプロセシングされMHC分子と結合し、HLA上に提示されてペプチド特異的CTLが誘導されるか、 $\text{IFN-}\gamma$ ELISpot assayを用いて評価を行った。HLA-A*24:02拘束性共通がん抗原ロングペプチドワクチンでは、合成されたロングペプチド21個中3個において、その配列に含まれたショートペプチドに反応するCTLの誘導が確認できた。HLA-A*02:01拘束性共通がん抗原ロングペプチドワクチンでは、合成されたロングペプチド21個中9個において、その配列に含まれたショートペプチドに反応するCTLの誘導が確認された。

[0104] 実施例4：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

LNP-Covid-19 Spike mRNAを投与し、抗原特異的 $\text{IFN-}\gamma$ 産生を評価した。

Covid-19(SARS-CoV-2)のSpikeタンパク質全長をコードしたmRNAをLNP(Lipid nano particle)に封入したmRNAワクチン(ARCTURUS therapeutics社, 非特許文献(de Alwis R. et al. A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice. Mol Ther. 2021;29:1970-1983.)のConventional mRNA、以下のmRNAワクチンについても同様に作成)の2 μg あるいは10 μg を、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの大腿直筋へ筋肉内投与(i.m.)、ある

いは尾根部へ皮内投与(i.d.)した。3回投与プロトコールでは、day0、day7、day14に計3回投与し、HLA-A*24:02 TgマウスはDay20に、HLA-A*02:01 TgマウスはDay21に解剖した。2回投与プロトコールでは、day0、day28に投与し、HLA-A*24:02 TgマウスはDay35に、HLA-A*02:01 TgマウスはDay36に解剖した。脾臓と鼠径リンパ節(LN)から細胞を調製し、心臓採血した血液から血清を採取した。BD ELISPOT Mouse I F N- γ SetおよびBD ELISPOT AEC Substrate Set(ともにBD)を用い、推奨プロトコールに従ったELISPOT法によりT細胞からの抗原特異的 I F N- γ 産生を評価した。抗m I F N- γ 抗体をコートした96 well plateに、脾臓細胞は 2×10^6 cells/well, LN細胞は 2×10^5 cells/wellで播種し、PMA(25ng/mL)+Ionomycin($1 \mu\text{g/mL}$)、Covid-19 Spikeタンパク質を網羅するペプチドのmix(3回投与実験ではPepMix S(jpt社 PM-WCPV-S-1)、2回投与実験ではPepTivator SARC-CoV-2 Prot_S (Miltenyi Biotech, 130-127-953)、各ペプチド $1 \mu\text{g/mL}$)、Covid-19 Spikeタンパク質配列から段落 [0094] に記載の予測器で予測後にHLA-A*02:01 TgマウスあるいはHLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的 I F N- γ 産生を確認したペプチドのmixであるP00L1 (各ペプチド $5 \mu\text{g/mL}$)、対応するHLA Tgマウスのナイーブマウスの骨髓からマウスGM-CSF(20ng/mL)で分化誘導し、使用前日にマウスTNF- α (20ng/mL), マウスIL-4(20ng/mL), PGE2($1 \mu\text{g/mL}$)を加えて成熟化させた骨髓由来樹上細胞(BMDC)(2×10^5 cells/well)、同様の成熟化と同時に 1×10^6 cellsあたり $10 \mu\text{g}$ のLNP-Spike mRNAを加えたBMDC(2×10^5 cells/well)をそれぞれ加えて20時間共培養し、I F N- γ の産生を評価した。スポットはエリフォトカウンターAT-X(ミネルヴァテック)で撮影し、スポット数をカウントした。各wellの左下にスポット数を記した。

[0105] 図20は、LNP-Covid-19 Spike mRNA 3回投与の投与方法を示す。

Covid-19のSpikeタンパク質全長をコードしたmRNAをLNPに封入したmRNAワクチン(ARCTURUS therapeutics社)の $2 \mu\text{g}$ あるいは $10 \mu\text{g}$ を、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの大腿直筋への筋肉内投与(i.m.)、あるいは尾根部への皮内投与(i.d.)により、day0、day7、day14に計3回投与し、H

LA-A*24:02 TgマウスはDay20に、HLA-A*02:01 TgマウスはDay21に解剖し、ELISPOT法により抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した。

[0106] 図 2 1 及び図 2 2 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方で I F N - γ を産生するT細胞が誘導されていた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対する I F N - γ の産生はほとんど認められなかったことから、上記 I F N - γ の産生はLNP-Covid-19 Spike mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0107] 図 2 3 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞には、PepMix S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方で I F N - γ を産生するT細胞が誘導されていた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、PepMix S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対する I F N - γ の産生はほとんど認められなかったことから、上記 I F N - γ の産生はLNP-Covid-19 Spike mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0108] 図 2 4 及び図 2 5 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを 1×10^6 cellsあたり1 μ gあるいは10 μ g加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方で I F N - γ を産生するT細胞が強く誘導されていた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスでは、PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対する I F N - γ の産生はわずかであったことから、

上記 I F N - γ の産生は LNP-Covid-19 Spike mRNA の投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0109] 図 26 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を 3 回投与した HLA-A*24:02 Tg マウスの鼠径リンパ節細胞での Spike 抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNA を 3 回投与した HLA-A*24:02 Tg マウスの鼠径リンパ節細胞には、PepMix S、P00L1 に対して、i.m. と i.d. の両方で I F N - γ を産生する T 細胞が誘導されていた。陰性対照である LNP-eGFP mRNA を同様に 3 回投与した HLA-A*24:02 Tg マウスでは、PepMix S、P00L1 に対する I F N - γ の産生はほとんど認められなかったことから、上記 I F N - γ の産生は LNP-Covid-19 Spike mRNA の投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0110] 図 27 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA 2 回投与の投与方法を示す。

Covid-19 の Spike タンパク質全長をコードした mRNA を LNP に封入した mRNA ワクチンの 2 μ g あるいは 10 μ g を、HLA-A*02:01 Tg マウスおよび HLA-A*24:02 Tg マウスの大腿直筋への筋肉内投与 (i.m.)、あるいは尾根部への皮内投与 (i.d.) により、day0、day28 に投与し、HLA-A*24:02 Tg マウスは Day35 に、HLA-A*02:01 Tg マウスは Day36 に解剖し、ELISPOT 法により抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した。

[0111] 図 28 及び図 29 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を 2 回投与した HLA-A*02:01 Tg マウスの脾臓細胞での Spike 抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNA を 2 回投与した HLA-A*02:01 Tg マウスの脾臓細胞には、PepTi S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA を加えた BMDC に対して、i.m. と i.d. の両方で I F N - γ を産生する T 細胞が誘導されていた。陰性対照である LNP-eGFP mRNA を同様に 2 回投与した HLA-A*02:01 Tg マウスでは、PepTi S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA を加えた BMDC に対する I F N - γ の産生はわずかにしか認められなかったことから、上記 I F N - γ の産生は LNP-Covid-19 Spike mRNA の投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0112] 図 30 は、LNP-Covid-19 Spike mRNA を 2 回投与した HLA-A*02:01 Tg マウスの鼠径リンパ節細胞での Spike 抗原特異的 I F N - γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを2回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞には、PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方でIFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。特に、i.d.において高い誘導が認められた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対するIFN- γ の産生はほとんど認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-Covid-19 Spike mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0113] 図31及び図32は、LNP-Covid-19 Spike mRNAを2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞でのSpike抗原特異的IFN- γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、PepTi S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方でIFN- γ を産生するT細胞が強く誘導されていた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に2回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、PepTi S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対するIFN- γ の産生はわずかにしか認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-Covid-19 Spike mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0114] 図33は、LNP-Covid-19 Spike mRNAを2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞でのSpike抗原特異的IFN- γ 産生の結果を示す。

LNP-Covid-19 Spike mRNAを2回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの鼠径リンパ節細胞には、PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対して、i.m.とi.d.の両方でIFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。特に、i.d.において高い誘導が認められた。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスでは、PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNAを加えたBMDCに対するIFN- γ の産生はほとんど認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-Covid-19 Spike mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0115] 図34は、Spikeタンパク質に対する抗体測定の結果を示す。

<方法>

MaxiSorp plate (ThermoFisher)にCovid-19 Spikeリコンビナントタンパク質(Sino Biological, 40589-V08B1)を100ng/50 μ L PBSでコートした。0.05%Tween20を含むPBS(PBS-T)で1回の洗浄後、3% non-fat milkでの室温で1時間ブロッキングした。1% non-fat milkを含むPBSで希釈した血清を加え、37°Cで1時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄し、1% non-fat milkを含むPBS-T中でhorseradish peroxidase(HRP)標識goat anti-mouse IgG (SouthernBiotech, 6000倍希釈)と室温で1時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution(Pierce)を加えて発色させ、1.3N H₂SO₄で反応を止め450nmの吸光度を測定した。

[0116] <結果>

陰性対照であるLNP-eGFP mRNAの投与では抗体は誘導されないが、LNP-Covid-19 Spike mRNAの2 μ gあるいは10 μ gのいずれにおいても、またi.m.とi.d.のいずれにおいても、3回投与、2回投与のいずれにおいてもCovid-19 Spikeタンパク質に対するIgG抗体が誘導されていた。概して、2 μ gよりも10 μ gの方が、またi.m.よりもi.d.の方が誘導されるIgG抗体は高い傾向にあった。特に、10 μ g i.d.の2回投与において高い抗体誘導が認められた。

[0117] 実施例5：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

LNP-hGPC3 mRNA、LNP-hROB01 mRNA、LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEphB4 mRNA、LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA、LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNAを投与し、抗原特異的IFN- γ 産生を評価した。

hGPC3 isoform 2 (RefSeq: NP_004475)、hROB01 isoform X5 (RefSeq: XP_006713340)、hCLDN1 (RefSeq: NP_066924)、hEphB4 (RefSeq: NP_004435)、TGFB1 (RefSeq: NP_000349)、hSPARC isoform 1 (NP_003109)、hAFP isoform 1 (NP_001125)、hHSP1 isoform 1 (NP_006635)それぞれのタンパク質全長をコードしたmRNA、hCLDN1 (RefSeq: NP_066924) タンパク質全長をコードしたmRNAとhEphB4 (RefSeq: NP_004435) タンパク質全長をコードしたmRNAの等質

量混合物、Luciferaseタンパク質全長をコードしたmRNA、eGFPタンパク質全長をコードしたmRNAをLNP(Lipid nano particle、ARCTURUS therapeutics社)に封入したmRNAワクチン(ARCTURUS therapeutics社)を、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの大腿直筋へ筋肉内投与(i.m.)、あるいは尾根部へ皮内投与(i.d.)した。脾臓と鼠径リンパ節(LN)から細胞を調製した。BD ELISPOT Mouse IFN- γ SetおよびBD ELISPOT AEC Substrate Set(ともにBD)を用い、推奨プロトコールに従ったELISPOT法によりT細胞からの抗原特異的IFN- γ 産生を評価した。抗mIFN- γ 抗体をコートした96 well plateに、脾臓細胞は 2×10^6 cells/well, LN細胞は 2×10^5 cells/wellで播種し、PMA(25ng/mL)+Ionomycin($1 \mu\text{g/mL}$)、対応するHLA Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られた短鎖ペプチドのmix(各ペプチド $10 \mu\text{g/mL}$)、対応するHLA Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られた長鎖ペプチドのmix(各ペプチド $10 \mu\text{g/mL}$)、対応するHLAのHLA-HHD(h β 2M-linker-[HLAの α 1+ α 2ドメイン]-[H-2D^bの α 3~C末端ドメイン]のキメラタンパク質)を発現するマウスがん細胞(MC38あるいはMCA205、 2×10^5 cells/well)、対応するHLAのHLA-HHDと対応するがん抗原を発現するマウスがん細胞(MC38あるいはMCA205、 2×10^5 cells/well)、対応するHLA Tgマウスのナイーブマウスの骨髄からマウスGM-CSF(20ng/mL)で分化誘導し、使用前日にマウスTNF- α (20ng/mL)、マウスIL-4(20ng/mL)、PGE2($1 \mu\text{g/mL}$)を加えて成熟化させた骨髄由来樹上細胞(BMDC)(2×10^5 cells/well)、同様の成熟化と同時に 5×10^6 cellsあたり $11 \mu\text{g}$ の対応するがん抗原mRNAをトランスフェクトしたBMDC(2×10^5 cells/mL)をそれぞれ加えて20時間共培養し、IFN- γ の産生を評価した。スポットはエリフォトカウンターAT-X(ミネルヴァテック)で撮影した。短鎖ペプチドのmixとして以下のペプチドを加えた。

[0118] hGPC3 HLA-A*02:01: CA02 11, CA02 13, CA02 15, A02-GPC3-10, A02-GPC3-12, A02-GPC3-14, A02-GPC3-18

hGPC3 HLA-A*24:02: A24-GPC3-06, A24-GPC3-10, A24-GPC3-11, A24-GPC3-17

hROB01 HLA-A*02:01: CA02 91, CA02 92, CA02 95, CA02 97

hROB01 HLA-A*24:02: CA24 95, CA24 97, CA24 98

hCLDN1 HLA-A*02:01: CLDN1-A02-2, CLDN1-A02-5, CLDN1-A02-6

hCLDN1 HLA-A*24:02: CLDN1-A24-2, CLDN1-A24-4, CLDN1-A24-5, CLDN1-A24-7

hEPHB4 HLA-A*02:01: CA02 121, CA02 122, CA02 123, CA02 126, CA02 127

hEPHB4 HLA-A*24:02: CA24 123, CA24 124, CA24 127

hTGFB1 HLA-A*02:01: CA02 81, CA02 82, CA02 83, CA02 86

hTGFB1 HLA-A*24:02: CA24 85

hSPARC HLA-A*02:01: CA02 52, CA02 56

hSPARC HLA-A*24:02: CA24 51, CA24 52, CA24 53

hAFP HLA-A*02:01: CA02 101, CA02 103, CA02 104

hAFP HLA-A*24:02: CA24 102, CA24 105

hHSP105 α HLA-A*02:01: CA02 21, CA02 24

hHSP105 α HLA-A*24:02: CA24 22, CA24 23, CA24 24, CA24 25

hHSP105 α HLA-A*24:02 short peptide

CA24 22: PFSKVLTFI

CA24 23: KLCGPYEKF

CA24 24: PYPEAKIGRF

CA24 25: NYGIYKQDL

[0119] 長鎖ペプチドのmixとして以下のペプチドを加えた。

hGPC3 HLA-A*02:01: CA02 11_L, CA02 15_L, A02-GPC3-14_L

hGPC3 HLA-A*24:02: A24-GPC3-06_L, A24-GPC3-11_L, A24-GPC3-17_L

hROB01 HLA-A*02:01: CA02 95_L, CA02 97_L

hROB01 HLA-A*24:02: CA24 97_L, CA24 98_L

hCLDN1 HLA-A*02:01: CLDN1-A02-2_L, CLDN1-A02-5_L

hCLDN1 HLA-A*24:02: CLDN1-A24-2_L, CLDN1-A24-4_L, CLDN1-A24-5_L, CLDN1-A24-7_L

hEPHB4 HLA-A*02:01: CA02 121_L, CA02 123_L

hEPHB4 HLA-A*24:02: CA24 124_L

hTGFB1 HLA-A*02:01: CA02 83_L, CA02 86_L

hSPARC HLA-A*02:01: CA02 56_L

hSPARC HLA-A*24:02: CA24 51_L, CA24 53_L

hAFP HLA-A*02:01: 02 103_L

hAFP HLA-A*24:02: 24 105_L

hHSP105 α HLA-A*02:01: A2-7_L

hHSP105 α HLA-A*24:02: A24-1_L, A24-7_L

hHSP105 α HLA-A*02:01 long peptide

A2-7_L: VGLNCL[RLMNDMTAV]ALNYG

hHSP105 α HLA-A*24:02 long peptide

A24-1_L: KNAVE[EYVVEFRDKL]CGPYE

A24-7_L: AVAL[NYGIYKQDL]PSLDEK

[0120] 図35は、LNP-hGPC3 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

LNP-hGPC3 mRNAの2 μ gあるいは10 μ g、あるいはLNP-Luciferase mRNAの10 μ gを、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの大腿直筋へのi.m.、あるいは尾根部へのi.d.により、day0、day7、day14に計3回投与し、HLA-A*24:02 TgマウスはDay20に、HLA-A*02:01 TgマウスはDay22に解剖し、ELISPOT法により抗原特異的IFN- γ の産生を評価した。

[0121] 図36～図39は、上記の結果を示す。

図36及び図37に示す通り、LNP-hGPC3 mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhGPC3短鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhGPC3長鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01HHDとhGPC3を発現するがん細胞MC38、hGPC3 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。i.m.に比べてi.d.の方が産生されるIFN- γ は多く、特

に2 μ gで3回のi.d.によって強いIFN- γ 誘導が認められた。HLA-A*02:01HHDとhGPC3を発現するがん細胞MC38 A02HHD hGPC3に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hGPC3を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-Luciferase mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hGPC3 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0122] 図38及び図39に示す通り、LNP-hGPC3 mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhGPC3短鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhGPC3長鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02HHDとhGPC3を発現するがん細胞MC38、hGPC3 mRNAをトランスフェクトしたBMDcに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。i.m.に比べてi.d.の方が産生されるIFN- γ は多い傾向があり、特に10 μ gで3回のi.d.によって強いIFN- γ 誘導が認められた。HLA-A*24:02HHDとhGPC3を発現するがん細胞MC38 A24HHD hGPC3に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*24:02HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A24HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hGPC3を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-Luciferase mRNAを同様に3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hGPC3 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0123] 実施例6：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

図40は、LNP-hROB01 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

LNP-hROB01 mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAの10 μ gを、HLA-A*02:01 Tgマウ

スおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの大腿直筋への筋肉内投与(i.m.)、あるいは尾根部への皮内投与(i.d.)により、day0、day7、day14に計3回投与し、Day21に解剖し、ELISPOT法により抗原特異的IFN- γ の産生を評価した。

[0124] 図4 1 及び図4 2 は、上記の結果を示す。

図4 1 に示す通り、LNP-hROB01 mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhROB01短鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhROB01長鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01HHDとhROB01を発現するがん細胞MC38、hROB01 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。i.m.、i.d.ともにHLA-A*02:01HHDとhROB01を発現するがん細胞MC38 A02HHD hROB01に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hROB01を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hROB01 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0125] 図4 2 に示す通り、LNP-hROB01 mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhROB01短鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhROB01長鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02HHDとhROB01を発現するがん細胞MC38、hROB01 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。i.m.、i.d.ともにHLA-A*24:02HHDとhROB01を発現するがん細胞MC38 A24HHD hROB01に対するIFN- γ 産生は、HLA-A2402HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A24HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hROB01を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導

されたことがわかる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hROB01 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0126] 実施例7：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

図43は、LNP-hCLDN1 mRNA およびLNP-hEPHB4 mRNA 3回投与の投与方法を示す。

LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAの10 μ gを、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの尾根部への皮内投与(i.d.)により、day0、day7、day14に計3回投与し、Day21に解剖し、ELISPOT法により抗原特異的IFN- γ の産生を評価した。

[0127] 図44および図45は、上記の結果を示す。

図44に示す通り、LNP-hCLDN1 mRNAあるいはLNP-hEPHB4 mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhCLDN1あるいはhEPHB4の短鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhCLDN1あるいはhEPHB4の長鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MC38あるいはHLA-A*02:01HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205、hCLDN1 mRNAあるいはhEPHB4 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*02:01HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MC38 A02HHD hCLDN1あるいはHLA-A*02:01HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205 A02HHD hEPHB4に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A02HHD mockあるいはMCA205 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hCLDN1あるいはhEPHB4を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hCLDN1

1 mRNAあるいはLNP-hEPHB4 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0128] 図45に示す通り、LNP-hCLDN1 mRNAあるいはLNP-hEPHB4 mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhCLDN1あるいはhEPHB4の短鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的IFN- γ 産生が見られたhCLDN1あるいはhEPHB4の長鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MC38あるいはHLA-A*24:02HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205、hCLDN1 mRNAあるいはhEPHB4 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*24:02HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MC38 A24HHD hCLDN1あるいはHLA-A*24:02HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205 A24HHD hEPHB4に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*24:02HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A24HHD mockあるいはMCA205 A24HHD mockに対するものと比べて高かったことから、hCLDN1あるいはhEPHB4を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。MC38 A24HHD mockあるいはMCA205 A24HHD mockに対するIFN- γ 産生は、マウスのCLDN1あるいはEPHB4由来のペプチドがHLA-A*24:02HHDに提示されたためと考えられる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生はわずかしき認められなかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hCLDN1 mRNAあるいはLNP-hEPHB4 mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0129] 実施例8：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

図46は、LNP-hTGFB1 mRNA およびLNP-hSPARC mRNA 3回投与の投与方法を示す。

LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAの10 μ gを、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの尾根部への皮内投与(i.d.)により、day0、day7、day14に計3回投与し、Day21に解剖し、ELISPOT法に

より抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した。

[0130] 図 4 7 および図 4 8 は、上記の結果を示す。

図 4 7 に示す通り、LNP-hTGFB1 mRNAあるいはLNP-hSPARC mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的 I F N - γ 産生が見られたhTGFB1あるいはhSPARCの短鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的 I F N - γ 産生が見られたhTGFB1あるいはhSPARCの長鎖ペプチドのmix、HLA-A*02:01HHDとhTGFB1を発現するがん細胞MCA205あるいはHLA-A*02:01HHDとhSPARCを発現するがん細胞MCA205、hTGFB1 mRNAあるいはhSPARC mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、I F N - γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*02:01HHDとhTGFB1を発現するがん細胞MCA205 A02HHD hTGFB1あるいはHLA-A*02:01HHDとhSPARCを発現するがん細胞MCA205 A02HHD hSPARCに対するI F N - γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MCA205 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hTGFB1あるいはhSPARCを発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもI F N - γ の産生は少なかったことから、上記I F N - γ の産生はLNP-hTGFB1 mRNAあるいはLNP-hSPARC mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0131] 図 4 8 に示す通り、LNP-hTGFB1 mRNAあるいはLNP-hSPARC mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的 I F N - γ 産生が見られたhTGFB1あるいはhSPARCの短鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02 Tgマウスへのペプチド免疫でペプチド特異的 I F N - γ 産生が見られたhTGFB1あるいはhSPARCの長鎖ペプチドのmix、HLA-A*24:02HHDとhTGFB1を発現するがん細胞MCA205あるいはHLA-A*24:02HHDとhSPARCを発現するがん細胞MCA205、hTGFB1 mRNAあるいはhSPARC mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、I F N - γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*02:01HHDとhTGFB1を発現するがん細胞MCA205 A02HHD hTGFB1は、HLA

-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MCA205 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hTGFB1を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。LNP-hSPARC mRNA投与マウスでのMCA205 A24HHD mockに対するIFN- γ 産生は、マウスのSPARC由来のペプチドがHLA-A*24:02HHDに提示されたためと考えられる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生は少なかったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-hTGFB1 mRNAあるいはLNP-hSPARC mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0132] 実施例9：共通がん抗原mRNAワクチンの開発

図49は、LNP-hAFP mRNA およびLNP-hHSP105 α mRNA 3回投与の投与方法を示す。

LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA、あるいはLNP-eGFP mRNAの10 μ gを、HLA-A*02:01 TgマウスおよびHLA-A*24:02 Tgマウスの尾根部への皮内投与(i.d.)により、day0、day7、day14に計3回投与し、Day21に解剖し、ELISPOT法により抗原特異的IFN- γ の産生を評価した。

[0133] 図50および図51は、上記の結果を示す。

図50に示す通り、LNP-hAFP mRNAあるいはLNP-hHSP105 α mRNAを3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞には、HLA-A*02:01HHDとhAFPを発現するがん細胞MC38あるいはHLA-A*02:01HHDとhHSP105 α を発現するがん細胞MC38、hAFP mRNAあるいはhHSP105 α mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*02:01HHDとhAFPを発現するがん細胞MC38 A02HHD hAFPあるいはHLA-A*02:01HHDとhHSP105 α を発現するがん細胞MC38 A02HHD hHSP105 α に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MC38 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hAFPあるいはhHSP105 α を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。陰性対照であるLNP-eGFP mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、1個体でMC38に

対する I F N - γ の産生が高かったが、抗原 mRNA をトランスフェクトした BMD C 対しての I F N - γ の産生は少なく、抗原 mRNA をトランスフェクトした BMD C 対しての I F N - γ の産生は LNP-hAFP mRNA あるいは LNP-hHSP105 α mRNA の投与によって特異的に誘導されたと考えられる。

[0134] 図 5 1 に示す通り、LNP-hAFP mRNA あるいは LNP-hHSP105 α mRNA を 3 回投与した HLA-A*24:02 Tg マウスの脾臓細胞には、HLA-A*24:02HHD と hAFP を発現するがん細胞 MC38 あるいは HLA-A*24:02HHD と hHSP105 α を発現するがん細胞 MC38、hAFP mRNA あるいは hHSP105 α mRNA をトランスフェクトした BMD C に対して、I F N - γ を産生する T 細胞が誘導されていた。HLA-A*24:02HHD と hAFP を発現するがん細胞 MC38 A24HHD hAFP に対する I F N - γ 産生は、HLA-A*24:02HHD と空ベクターを導入したがん細胞 MC38 A24HHD mock に対するものと比べて有意に高かったことから、hAFP を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃する T 細胞が誘導されたことがわかる。HLA-A*24:02HHD と hHSP105 α を発現するがん細胞 MC38 A24HHD hHSP105 α に対する I F N - γ 産生と同程度に MC38 A24HHD mock に対する I F N - γ 産生が認められたのは、マウスの HSP105 α 由来のペプチドが HLA-A*24:02HHD に提示されたためと考えられる。陰性対照である LNP-eGFP mRNA を同様に 3 回投与した HLA-A*24:02 Tg マウスでは、いずれに対しても I F N - γ の産生は少なかったことから、上記 I F N - γ の産生は LNP-hAFP mRNA あるいは LNP-hHSP105 α mRNA の投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0135] 実施例 10：共通がん抗原 mRNA ワクチンの開発

図 5 2 は、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA 3 回投与の投与方法を示す。

LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA の 10 μ g あるいは 20 μ g、あるいは LNP-Luciferase mRNA の 20 μ g を、HLA-A*02:01 Tg マウスおよび HLA-A*24:02 Tg マウスの尾根部への皮内投与 (i.d.) により、day0、day7、day14 に計 3 回投与し、Day21 に解剖し、ELISPOT 法により抗原特異的 I F N - γ の産生を評価した。

[0136] 図 5 3 から図 5 6 は、上記の結果を示す。

図 5 3 および図 5 4 に示す通り、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA を 3 回投与した

HLA-A*02:01 Tgマウスの脾臓細胞および鼠径リンパ節には、HLA-A*02:01HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MCA205あるいはHLA-A*02:01HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205、hCLDN1 mRNAあるいはhEPHB4 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*02:01HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205 A02HHD hEPHB4に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*02:01HHDと空ベクターを導入したがん細胞MCA205 A02HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hEPHB4を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。HLA-A*02:01HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MCA205 A02HHD hCLDN1に対するIFN- γ 産生と同程度にMCA205 A02HHD mockに対するIFN- γ 産生が認められたのは、マウスのCLDN1あるいはEPHB4由来のペプチドがHLA-A*02:01HHDに提示されたためと考えられる。陰性対照であるLNP-Luciferase mRNAを同様に3回投与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生は比較的低かったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0137] 図55および図56に示す通り、LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNAを3回投与したHLA-A*24:02 Tgマウスの脾臓細胞および鼠径リンパ節には、HLA-A*24:02HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MCA205あるいはHLA-A*24:02HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205、hCLDN1 mRNAあるいはhEPHB4 mRNAをトランスフェクトしたBMDCに対して、IFN- γ を産生するT細胞が誘導されていた。HLA-A*24:02HHDとhEPHB4を発現するがん細胞MCA205 A24HHD hEPHB4に対するIFN- γ 産生は、HLA-A*24:02HHDと空ベクターを導入したがん細胞MCA205 A24HHD mockに対するものと比べて有意に高かったことから、hEPHB4を発現するがん細胞を特異的に認識して攻撃するT細胞が誘導されたことがわかる。HLA-A*24:02HHDとhCLDN1を発現するがん細胞MCA205 A24HHD hCLDN1に対するIFN- γ 産生と同程度にMCA205 A02HHD mockに対するIFN- γ 産生が認められたのは、マウスのCLDN1あるいはEPHB4由来のペプチドがHLA-A*24:02HHDに提示されたためと考えられる。陰性対照であるLNP-Luciferase mRNAを同様に3回投

与したHLA-A*02:01 Tgマウスでは、いずれに対してもIFN- γ の産生は比較的低かったことから、上記IFN- γ の産生はLNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNAの投与によって特異的に誘導されたことがわかる。

[0138] <mRNA用アミノ酸配列>

>hGPC3_isoform_2_ NP_004475 (配列番号 81)

MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGLKWVPETPVPGSDLQVCLPKG
P
TCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMEKFLIIQNAAVFQEAFEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTP
Q
AFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDDMVNELFDSLFPVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFG
N
FPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCN
V
VMQGCMAGVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLTTTIGKLC
A
HSQQRQYRSAYYPEDLFIDKKVLKVAHVEHEETLSSRRRELQKLKSFISFYALPGYICSHSPAEND
T
LCWNGQELVERYSQKAARNGMKNQFNLHELKMGPEPVVSQIIDKLKHINQLLRMSMPKGRVLDKNLD
E
EGFESGDCGDEDECIGSGDGMIVKNQLRFLAELAYDLDDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVH
S
PLKLLTSMASVVCFFFLVH

[0139] >hROB01_isoform_X5_ XP_006713340(hROB01の細胞質内型) (配列番号 82)

MIAEPAHFYLFGLICLCSGSRLRQEDFPPIVEHPSDLIVSKGEPATLNCKAEGRPPTIEWYKGGERV
E
TDKDDPRSHRMLLPSGSLFFLRIVHGRKSRPDEGVYVCVARNYLGEAVSHNASLEVAILRDDFRQNPSD
V
MVAVGEPAVMECQPPRGHPEPTISWKKDGSPLDDKDERITIRGGKLMITYTRKSDAGKYVCVGTNMVGE

R

ESEVAELTVLERPSFVKRPSNLAVTVDDSAEFKCEARGDPVPTVRWRKDDGELPKSRYEIRDDHTLKIR

K

VTAGDMGSYTCVAENMVGKAEASATLTVQVGSEPPHFVVKPRDQVVALGRTVTFQCEATGNPQPAIFWR

R

EGSQNLLFSYQPPQSSSRFSVSQTGDLTITNVQRSDVGYYICQTLNVAGSIITKAYLEVTDVIADRPPP

V

IRQGPVNQTVAVDGTFLSCVATGSPVPTILWRKDGVLVSTQDSRIKQLENGVLQIRYAKLGDTGRYTC

I

ASTPSGEATWSAYIEVQEFGVPVQPPRPTDNLIPSAPSKPEVTDVSRNTVTLQPNLNSGATPTSII

I

EAFSHASGSSWQTVAENVKTETSAIKGLKPNAIYFLVRAANAYGISDPSQISDPVKTQDVLPTSQGV

H

KQVQRELGNAVLHLHNPTVLSSSSIEVHWTVDQQSQYIQGYKILYRPSGANHGESDWLVFEVTRPAKNS

V

VIPDLRKGVNVEIKARPFNEFQGADSEIKFAKLEEAPSAPPQGVTVSKNDGNGTAILVSWQPPPEDT

Q

NGMVQEYKVVCLGNETRYHINKTVDGSTFSVVIPFLVPGIRYSVEVAASTGAGSGVKSEPQFIQLDAHG

N

PVSPEDQVSLAQQISDVVKQPAFIAGIGAACWIILMVFSIWLYRHRKKRNGLTSTYAGIRKVPSFTFTP

T

VTYQRGGEAVSSGGRPGLLNISEPAAQPWLADTWPNTGNNHNDCSISCCTAGNGNSDSNLTTYSRPADC

I

ANYNNQLDNKQTNLMLPESTVYGDVDLSNKINEMKTFNSPNLKDGRFVNPSGQPTPYATTQLIQSNLSN

N

MNNGSGDSGEKHWKPLGQQKQEVAPVQYNIVEQNKLNDYRANDTVPPTIPYNQSYDQNTGGSYNSSDR

G

SSTSGSQGHKKGARTPKVPKQGGMNWADLLPPPPAHPPPHSNSEEYNISVDESYPDQEMPCPVPPARMYL

Q

QDELEEEEDERGPTPPVRGAASSPAAVSYSHQSTATLTPSPQEELQPMLQDCPEETGHMQHQPDRRRQP

V

SPPPPRPISPPTHYGYISGPLVSDMDTDAPEEEEDMEVAKMQTRRLLLRGLEQTPASSVGDLESS

V

TGSMINGWGSASEEDNISSGRSSVSSSDGSFFTDADFAQAVAAAAEYAGLKVARRQMQDAAGRRHFHAS

Q

CPRPTSPVSTDSNMSAAVMQKTRPAKKLKHQPGHLRRETYTDDLPPPPVPPPAIKSPTAQSKTQLEVRP

V

VVPKLPSMDARTDRSSDRKGSSYKGREVL DGRQVVD MRTNPGDPREAEQQNDGKGRGNKAAKRDLP

K

THLIQEDILPYCRPTFPTSNNPRDPSSSSSMSSRGSGSRQREQANVGRRNIAEMQVLGGYERGEDNNEE

L

EETES

[0140] >hR0B01_isoform_a_ NP_002932(hR0B01の膜局在型) (配列番号 8 3)

MKWKHVPFLVMISLLSLSPNHLFLAQLIPDPEDVERGNDHGTP IPTSDNDDNSLGYTGSRLRQEDFPPR

I

VEHPSDLIVSKGEPATLNCKAEGRPPTIEWYKGGERVETDKDDPRSHRMLLP SGLFFLRIVHGRKSR

P

DEGVYVCVARNYLGEAVSHNASLEVAILRDDFRQNPSDVMVAVGEPVMECQPPRGHPEPTISWKKDGS

P

LDDKDERITIRGGKLMITYTRKSDAGKYVCVGTNMVGERESEVAELTVLERPSFVKRPSNLAVTVDDSA

E

FKCEARGDPVPTVRWRKDDGELPKSRYEIRDDHTLKIRKVTAGDMGSYTCVAENMVGKAEASATLTVQE

P

PHFVVKPRDQVVALGRTVTFQCEATGNPQPAIFWRREGSQNLLFSYQPPQSSSRFSVSQTGDLTITNVQ

R

SDVGYIICQTLNVAGSIITKAYLEVTDVIADRPPPVIRQGPVNQTVAVDGTFLSCVATGSPVPTILWR

K

DGVLVSTQDSRIKQLENGVLQIRYAKL GDTGRYTCIASTPSGEATWSAYIEVQEF GVPVQPPRPTDPNL

I

PSAPSKPEVTDVSRNTVTL SWQPNLNSGATPTSII EAFSHASGSSWQTVAENVKTETSAIKGLKPNAI

Y

LFLVRAANAYGISDPSQISDPVKTQDVLPTSQGV DHKQVQRELGN AVLHLHNPTVLSSSSIEVHWTVDQ

Q

SQYIQGYKILYRPSGANHGESDWLVFEV RTPAKNSVVIPDLRKGVNYEIKAR PFFNEFQGADSEIKFAK

T

LEEAPSAPPQGVTVSKNDGNGTAILVSWQPP PEDTQNGMVQEYK VWCLGNETRYHINKTVDGSTFSVVI

P

FLVPGIRYSVEVAASTGAGSGVKSEPQFIQL DAHGPNVSPEDQVSLAQQISDVVKQPAFIAGIGAACWI

I

LMVFSIWLYRHRKKRNGLTSTYAGIRK VPSFTFTPTVTYQRGGEAVSSGGRPGLLNISEPAAQ PWLADT

W

PNTGNNHNDCSISCCTAGNGNSDSNL TTYSR PADCIANYNNQLDNKQTNLMLPESTVYGDVDLSNKINE

M

KTFNSPNLKDGRFVNPSGQPTPYATTQLI QSNLSNNMNGSGDSGEKHWKPLGQQKQEVAPVQYNIVEQ

N

KLNKDYRANDTVPPTIPYNQSYDQNTGGSY NSSDRGSSTSGSQGHKKGARTPKVVPKQGGMNWADLLPPP

P

AHPPPHSNSEEYNISVDES YDQEMPCPVPPARMYLQQDELEEEEDERGPTPPVRGAASSPAAVSYSHQS

T

ATLTPSPQEELQPMLQDCPEETGHMQHPDR RRQPVSPPPPPRPISPPHTYGYISGPLVSDMDTDAPEE

E

EDEADMEVAKMQTRRLLLRGLEQTPASSVGD LESSVTGSMINGWGSASEEDNISSGRSSVSSSDGSFFT

D

ADFAQAVAAAAEYAGLKVARRQMQDAAGRRHF HASQCPRPTSPVSTDSNMSAAVMQKTRPAKKLKHQPG

H

LRRETYTDDLPPPPVPPPAIKSPTAQSKTQLEVRPVVVPKLPMSDARTDRSSDRKGSSYKGREVL DGRQ

V

VDMRTNPGDPREAEQQNDGKGGRGNKAAKRDLPKATHLIQEDILPYCRPTFPTSNNPRDPSSSSSMSS

R

GSGSRQREQANVGRRNIAEMQVLGGYERGEDNNEELEETES

[0141] >hEPHB4_ NP_004435 (配列番号 8 4)

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVC DVQRAPGQ

A

HWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVD

T

VAAEHLTRKRPGAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLA FQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPE

T

VPRELVPVAGSCVVDAPVAPGPSPLYCREDGQWAEQPV TGCSCAPGFEEAEGNTKCRACAQGT FKPL

S

GEGSCQPCPANSHTIGSAVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES

G

GREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGGDLTFDPGPRDLVEPVVVVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGP

V

PFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSE

N

RAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLDESEGWREQLALIAGTAVVGVVLVLVVIVVA

V

LCLRKQSNGREAEYSKHKQYLIGHGTKVYIDPFTYEDPNEAVREFAKEIDVSYVKIEEVIGAGEFGEV

C

RGRLKAPGKKESCVAIKTLKGGYTERQRREFLSEASIMGQFEHPNIIRLEGVVTNSMPVMILTEFMENG

A

LDSFLRLNDGQFTVIQLVGMLRGIASGMRYLAEMSYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEENS

S

DPTYTSSLGGKIPRWTAPEAIAFRKFTSASDAWSYGIVMWEVMSFGERPYWMSNQDVINAIEQDYRL

P

PPDCPTSLHQLMLDCWQKDRNARPRFPQVVSALDKMIRNPASLKIVARENGGASHPLLDQRQPHYSAF

G

SVGEWLRAIKMGRYEESFAAAGFGSFELVSQISAEDLLRIGVTLAGHQKKILASVQHMKSQAKPGTPGG

T

GGPAPQY

[0142] >hCLDN1_NP_066924 (配列番号 8 5)

MANAGLQLLGFILAFLGWIGAIVSTALPQWRIYSYAGDNIVTAQAMYEGLWMSCVSQSTGQIQCKVFDS

L

LNLSSLQATRALMVVGILLGVIAIFVATVGMKCMKCLEDDEVQKMRMAVIGGAIFLLAGLAILVATAW

Y

GNRIVQEFYDPMTPVNARYEFGQALFTGWAAASLCLLGGALLCCSCPRKTTSYPTPRPYKPAOSSGKD

Y

V

[0143] >hSLC7A5_NP_003477 (配列番号 8 6)

MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIVGTIIGSGIF

V

TPTGVLKEAGSPGLALVVAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYMLEVYGSPLAFLKLWIELLI

I

RPSSQYIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAAKLVAACLCVLLLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALA

L

IILLGFVQIGKGDVSNLDPNFSFEGTKLDVGNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAII

I

SLPIVTLVYVLTNLAYFTTLSTEQMLSSEAVAVDFGNHYHLGVMSWIIPVFVGLSCFGSVNGSLFTSSRL

F

FVGSREGHLPSILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIIGMIWLR

H

RKPELERPIKVNALALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWWKNKPKWLLQGI

F

STTVLCQKLMQVVPQET

[0144] >hAFP_isoform_1_NP_001125 (配列番号 8 7)

MKWVESIFLIFLLNFTESTRHRNEYGIASILDSYQCTAEISLADLATIFFAQFVQEATYKEVSKMVKD

A

LTAIEKPTGDEQSSGCLLENQLPAFLEELCHEKEILEKYGHSDCCSQSEEGRHNCFLAHKKPTPASIPLF

Q

VPEPVTSCAEYEEDRETFMNKFIYEIARRHPFLYAPTILLWAARYDKIIPSCCKAENAVECFQTKAATV

T

KELRESSLLNQHACAVMNFGTRTFQAITVTKLSQKFTKVNFTIQLVLVDVAHVHEHCCRGDVLDCLO

D

GEKIMSYICSQQDTLSNKITECKLTTLERGQCIIHAENDEKPEGLSPNLNRFLGDRDFNQFSSGEKNI

F

LASFVHEYSRRHPQLAVSVILRVAKGYQELLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLF

Q

KLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIGHLCIRHE

M

TPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFSDDKFIHKLDCQAQGVALQTMKQEFILNLVKQ

K

PQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRAALGV

[0145] >hTGFB1_NP_000349 (配列番号 8 8)

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVLQHSRLRGRQHGPNVCAVQKVIGTNRKYFTNCKQWY

Q

RKICGKSTVISYECCPGYEKVPGEKGCPAALPLSNLYETLGVVGSTTTQLYTDRTKLRPEMEGPGSFT

I

FAPSNEAWASLPAEVLDSLVSNNIELLNALRYHMGRRVLTDELKHGMTLTSMYQNSNIQIHHPNGI

V

TVNCARLLKADHHATNGVVHLIDKVISTITNNIQQIIEIEDTFETLRAAVAASGLNTMLEGNGQYTLLA

P

TNEAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLLNNHILKSAMCAEAIVAGLSVETLEGTTLEVGCSDMLTINGK

A

IISNKDILATNGVIHYIDELLIPDSAKTLFELAAESDVSTAIDLFRQAGLGNHLSGSERLTLLAPLNSV

F

KDGTPPIDAHTRNLLRNHIIKDQLASKYLYHGQTLETGGKKLRVVFYRNSLCIENS CIAAHDKRGRYG

T

LFTMDRVLTTPMGTVMDVLKGDNRFSMLVAAIQSAGLTETLNREGVYTVFAPTNEAFRALPPRERSRL

G

DAKELANILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKEVSLKNNVSVNKEPVAEPDIMATNGVVHVIT

N

VLQPPANRPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMKH

[0146] >hSPARC_isoform_1_NP_003109 (配列番号 89)

MRAWIFFLLCLAGRALAAPQQEALPDETEVVEETVAEVTEVSVGANPVQVEVGEFDDGAEETEEVVAE

N

PCQNHCKKHGKVCELDENNTPMCVCQDPTSCPAPIGEFEKVCSDNKNKTFDSSCHFFATKCTLEGTKKGH

K

LHLDYIGPCKYIPPCLDSELTEFPLMRDWLKNVLVTLYERDEDNLLTEKQKLRVKKIHENEKRLEAG

D

HPVELLARDFEKNYNMYIFPVHWQFGQLDQHPIDGYLSHTELAPLRAPLIPMEHCTTRFFETCDLDNDK

Y

IALDEWAGCFGIKQKDIDKDLVI

[0147] >hFOXM1_isoform_2_NP_068772 (配列番号 90)

MKTSPRRPLILKRRRLPLPVQNAPSETSEEEPKRSPAQQESNQAEASKEVAESNSCKFPAGIKIINHPT

M

PNTQVVAIPNNANIHSIITALTAGKESGSSGPNKFILISCGGAPTQPPGLRPQTQTSYDAKRTEVTLE

T
LGPKPAARDVNLPRPPGALCEQKRETCADGEAAGCTINNSLSNIQWLRKMSSDGLGSRSIKQEMEKEN
C
HLEQRQVKVEEPSRPSASWQNSVSRPPYSYMIQFAINSTERKRMTLKDITYWIEDHFPYFKHIAKP
G
WKNSIRHNLSLHDMFVRETSANGKVSFWTIHPSANRYLTLDQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRPNP
R
RNMTIKTELPLGARRKMKPLLPRVSSYLVP IQFPVNQSLVLQPSVKVPLPLAASLMSEELARHSKR
VRI
A
PKVLLAEEGIAPLSSAGPGKEEKLLFGEGFSPLLVPQTIKEEEIQPGEEMPHLARPIKVESPPLEEWPS
P
APSFKEESSHSEDSSQSPTPRPKKSYSGLRSPTRCVSEMLVIQHRERRERSRSRRKQHLLPPCVDEPE
L
LFSEGPSTSRWAAELPFPADSSDPASQLSYSQEVGGPFKTPIKETLPISSTPSKSVLPRTPE
SWRLTPP
A
KVGGLDFSPVQTSQGASDPLPDPLGLMDLSTTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVPFGNSSPS
DIDV
P
KPGSPEPQVSGLAANRSLTEGLVLDTMNDSLSKILLDISFPGLDEDPLGPDNINWSQFIPELQ

[0148] >hHSPH1_isoform_1_NP_006635 (配列番号 9 1)

MSVVGLDVGSQSCYIAVARAGGIETIANEFSDRCTPSVISFGSKNRTIGVAAKNQQITHANNTV
SNFKR
F
HGRAFNDFPIQKEKENLSYDLVPLKNGGVGIKVMYMGEHLFSVEQITAMLLTKLKETAENSLKKP
VTD
C
VISVPSFFTDARRSVLDAAQIVGLNCLRLMNDMTAVALNYGIYKQDLPSLDEKPRIVVFVDMGH
SAFQ
V
SACAFNKGKLVLTAFDPFLGGKNFDEKLVEHFCAEFKTKYKLDKSKIRALLRLYQECEKLKKLM
SS
N
STDLPNIECFMNDKDVSGKMNRSQFEELCAELLQKIEVPLYSLLEQTHLKVEDVSAVEIVGGAT
RIPA

V
KERIAKFFGKDISTTLNADEAVARGCALQCAILSPAFAKREFSVTDVFPFISLIWNHDSDETEGVHEV
F
SRNHAAPFSKVLTFLLRGPFELEAFYSDPQGVYPYPAKIGRFVVQNVSAQKDGEKSRVKVKVRVNTHGI
F
TISTASMVEKVPTEENEMSSEADMECLNQRPPENPDTDKNVQQDNSEAGTQPQVQTDAQQTSSPPSPE
L
TSEENKIPDADKANEEKKVDQPPEAKKPKIKVVNVELPIEANLVWQLGKDLLNMYIETEGKMIMQDKLEK
E
RNDAKNAVEEYVVEFRDKLCGPYEKFICEQDHQNFLRLLTETEDWLYEEGEDQAKQAYVDKLEELMKIG
T
PVKVRFQEAERPCKMFEELGQRLQHYAKIAADFRNKDEKYNHIDESEMKKVEKSVNEVMEWMNNVMNAQ
A
KKSLDQDPVVRAQEIKTKIKELNNTCEPVVTQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLEDKNNFGAEP
H
QNGECYPNEKNSVNMDLD

[0149] <mRNAワクチン コドン最適化前元配列>

>hGPC3_var2_NM_004484 (配列番号 92)

ATGGCCGGGACCGTGCGCACCGCGTGCTTGGTGGTGGCGATGCTGCTCAGCTTGGACTTCCCGGGACAG
G
CGCAGCCCCCGCCGCCGCCGGACGCCACCTGTCACCAAGTCCGCTCCTTCTTCCAGAGACTGCAGC
C
CGGACTCAAGTGGGTGCCAGAACTCCCGTGCCAGGATCAGATTTGCAAGTATGTCTCCCTAAGGGCCC
A
ACATGCTGCTCAAGAAAGATGGAAGAAAAATACCAACTAACAGCACGATTGAACATGGAACAGCTGCTT
C
AGTCTGCAAGTATGGAGCTCAAGTTCTTAATTATTCAGAATGCTGCGGTTTTCCAAGAGGCCTTTGAAA
T

TGTTGTTGCCATGCCAAGAACTACACCAATGCCATGTTCAAGAACAACCTACCCAAGCCTGACTCCACA
A
GCTTTTGAGTTTGTGGGTGAATTTTTCACAGATGTGTCTCTCTACATCTTGGGTTCTGACATCAATGTA
G
ATGACATGGTCAATGAATTGTTTGACAGCCTGTTTCCAGTCATCTATACCCAGCTAATGAACCCAGGCC
T
GCCTGATTGAGCCTTGGACATCAATGAGTGCCTCCGAGGAGCAAGACGTGACCTGAAAGTATTTGGGAA
T
TTCCCAAGCTTATTATGACCCAGGTTTCCAAGTCACTGCAAGTCACTAGGATCTTCCTTCAGGCTCTG
A
ATCTTGGAATTGAAGTGATCAACACAACCTGATCACCTGAAGTTCAGTAAGGACTGTGGCCGAATGCTCA
C
CAGAATGTGGTACTGCTCTTACTGCCAGGGACTGATGATGGTTAAACCCTGTGGCGGTTACTGCAATGT
G
GTCATGCAAGGCTGTATGGCAGGTGTGGTGGAGATTGACAAGTACTGGAGAGAATACATTCTGTCCCTT
G
AAGAACTTGTGAATGGCATGTACAGAATCTATGACATGGAGAACGTACTGCTTGGTCTCTTTTCAACAA
T
CCATGATTCTATCCAGTATGTCCAGAAGAATGCAGGAAAAGCTGACCACCACTATTGGCAAGTTATGTGC
C
CATTCTCAACAACGCCAATATAGATCTGCTTATTATCCTGAAGATCTCTTTATTGACAAGAAAGTATTA
A
AAGTTGCTCATGTAGAACATGAAGAAACCTTATCCAGCCGAAGAAGGGAACCTAATTCAGAAGTTGAAGT
C
TTTCATCAGCTTCTATAGTGCTTTGCCTGGCTACATCTGCAGCCATAGCCCTGTGGCGGAAAACGACAC
C
CTTTGCTGGAATGGACAAGAACTCGTGGAGAGATACAGCCAAAAGGCAGCAAGGAATGGAATGAAAAAC
C

AGTTCAATCTCCATGAGCTGAAAATGAAGGGCCCTGAGCCAGTGGTCAGTCAAATTATTGACAACTGA
A
GCACATTAACCAGCTCCTGAGAACCATGTCTATGCCCAAAGGTAGAGTTCTGGATAAAAACCTGGATGA
G
GAAGGGTTTGAAAGTGGAGACTGCGGTGATGATGAAGATGAGTGCATTGGAGGCTCTGGTGATGGAATG
A
TAAAAGTGAAGAATCAGCTCCGCTTCCTTGACAGAACTGGCCTATGATCTGGATGTGGATGATGCGCCTG
G
AAACAGTCAGCAGGCAACTCCGAAGGACAACGAGATAAGCACCTTTCACAACCTCGGGAACGTTCAATC
C
CCGCTGAAGCTTCTCACCAGCATGGCCATCTCGGTGGTGTGCTTCTTCTCCTGGTGCACTGA

[0150] >hROB01_varX6_cloned_from_SW480(細胞質内型) (配列番号 9 3)

ATGATTGCGGAGCCCGCTCACTTTTACCTGTTTGGATTAATATGTCTCTGTTCAAGGCTCCCGTCTTCGT
CAGGAAGATTTTCCACCTCGCATTGTTGAACACCCCTTCAGACCTGATTGTCTCAAAAGGAGAACCTGCA
ACTTTGAACTGCAAAGCTGAAGGCCGCCCCACACCCACTATTGAATGGTACAAAGGGGGAGAGAGAGTG
GAGACAGACAAAGATGACCCTCGCTCACACCGAATGTTGCTGCCGAGTGGATCTTTATTTTTCTTACGT
ATAGTACATGGACGGAAAAGTAGACCTGATGAAGGAGTCTATGTCTGTGTAGCAAGGAATTACCTTGGA
GAGGCTGTGAGCCACAATGCATCGCTGGAAGTAGCCATACTTCGGGATGACTTCAGACAAAACCTTCG
GATGTCATGGTTGCAGTAGGAGAGCCTGCAGTAATGGAATGCCAACCTCCACGAGGCCATCCTGAGCCC
ACCATTTTCATGGAAGAAAGATGGCTCTCCACTGGATGATAAAGATGAAAGAATAACTATACGAGGAGGA
AAGCTCATGATCACTTACACCCGTAAAAGTGACGCTGGCAAATATGTTTGTGTTGGTACCAATATGGTT
GGGGAACGTGAGAGTGAAGTAGCCGAGCTGACTGTCTTAGAGAGACCATCATTTGTGAAGAGACCCAGT
AACTTGGCAGTAACTGTGGATGACAGTGCAGAATTTAAATGTGAGGCCCGAGGTGACCCTGTACCTACA
GTACGATGGAGGAAAGATGATGGAGAGCTGCCCAAATCCAGATATGAAATCCGAGATGATCATACCTTG
AAAATTAGGAAGGTGACAGCTGGTGACATGGGTTTCATACACTTGTGTTGCAGAAAATATGGTGGGCAAA
GCTGAAGCATCTGCTACTCTGACTGTTCAAGTTGGGTCTGAACCTCCACATTTTGTGTGAAACCCCGT
GACCAGGTTGTTGCTTTGGGACGGACTGTAACCTTTTCAAGTGTGAAGCAACCGGAAATCCTCAACCAGCT
ATTTTCTGGAGGAGAGAAGGGAGTCAGAATCTACTTTTCTCATATCAACCACCACAGTCATCCAGCCGA

TTTTCAGTCTCCAGACTGGCGACCTCACAATTACTAATGTCCAGCGATCTGATGTTGGTTATTACATC
TGCCAGACTTTAAATGTTGCTGGAAGCATCATCACAAAGGCATATTTGGAAGTTACAGATGTGATTGCA
GATCGGCCTCCCCAGTTATTCGACAAGGTCCTGTGAATCAGACTGTAGCCGTGGATGGCACTTTCGTC
CTCAGCTGTGTGGCCACAGGCAGTCCAGTGCCACCATTCCTGTGGAGAAAGGATGGAGTCCTCGTTTCA
ACCCAAGACTCTCGAATCAAACAGTTGGAGAATGGAGTACTGCAGATCCGATATGCTAAGCTGGGTGAT
ACTGGTCGGTACACCTGCATTGCATCAACCCCCAGTGGTGAAGCAACATGGAGTGCTTACATTGAAGTT
CAAGAATTTGGAGTTCAGTTCAGCCTCCAAGACCTACTGACCCAAATTTAATCCCTAGTGCCCCATCA
AAACCTGAAGTGACAGATGTCAGCAGAAATACAGTCACATTATCGTGGCAACCAAATTTGAATTCAGGA
GCAACTCCAACATCTTATATTATAGAAGCCTTCAGCCATGCATCTGGTAGCAGCTGGCAGACCGTAGCA
GAGAATGTGAAAACAGAAACATCTGCCATTAAGGACTCAAACCTAATGCAATTTACCTTTTCCTTGTG
AGGGCAGCTAATGCATATGGAATTAGTGATCCAAGCCAAATATCAGATCCAGTGAAAACACAAGATGTC
CTACCAACAAGTCAGGGGGTGGACCACAAGCAGGTCCAGAGAGAGCTGGGAAATGCTGTTCTGCACCTC
CACAACCCACCGTCCTTTCTTCTCTTCATCGAAGTGCACTGGACAGTAGATCAACAGTCTCAGTAT
ATACAAGGATATAAAATTCTCTATCGGCCATCTGGAGCCAACCACGGAGAATCAGACTGGTTAGTTTTT
GAAGTGAGGACGCCAGCCAAAAACAGTGTGGTAATCCCTGATCTCAGAAAGGGAGTCAACTATGAAATT
AAGGCTCGCCCTTTTTTTAATGAATTTCAAGGAGCAGATAGTGAAATCAAGTTTGCCAAAACCCTGGAA
GAAGCACCCAGTGCCCCACCCAAGGTGTAAGTGTATCCAAGAATGATGGAAACGGAAGTCAATTCTA
GTTAGTTGGCAGCCACCTCCAGAAGACACTCAAAATGGAATGGTCCAAGAGTATAAGGTTTGGTGTCTG
GGCAATGAAACTCGATACCACATCAACAAAACAGTGGATGGTTCCACCTTTTCCGTGGTCATTCCCTTT
CTTGTTCTGGAATCCGATACAGTGTGGAAGTGGCAGCCAGCACTGGGGCTGGGTCTGGGGTAAAGAGT
GAGCCTCAGTTCATCCAGCTGGATGCCATGGAAACCCTGTGTACCTGAGGACCAAGTCAGCCTCGCT
CAGCAGATTTTCAAGTGTGGTGAAGCAGCCGGCCTTCATAGCAGGTATTGGAGCAGCCTGTTGGATCATC
CTCATGGTCTTCAGCATCTGGCTTTATCGACACCGCAAGAAGAGAAACGGACTTACTAGTACCTACGCG
GGTATCAGAAAAGTCCCGTCTTTTACCTTCACACCAACAGTAACTTACCAGAGAGGAGGCGAAGCTGTC
AGCAGTGGAGGGAGGCCTGGACTTCTCAACATCAGTGAACCTGCCGCGCAGCCATGGCTGGCAGACAG
TGGCCTAATACTGGCAACAACCACAATGACTGCTCTATCAGCTGCTGCACGGCAGGCAATGGAAACAGC
GACAGCAACCTCACTACCTACAGTCGCCAGCTGATTGTATAGCAAATTATAACAACCAACTGGATAAC
AAACAAACAAATCTGATGCTCCCTGAGTCAACTGTTTATGGTGATGTGGACCTTAGTAACAAAATCAAT

GAGATGAAAACCTTCAATAGCCCAAATCTGAAGGATGGGCGTTTTGTCAATCCATCAGGGCAGCCTACT
CCTTACGCCACCACTCAGCTCATCCAGTCAAACCTCAGCAACAACATGAACAATGGCAGCGGGGACTCT
GGCGAGAAGCACTGGAAACCACTGGGACAGCAGAAACAAGAAGTGGCACCAGTTCAGTACAACATCGTG
GAGCAAAACAAGCTGAACAAAGATTATCGAGCAAATGACACAGTTCCTCCAACCTATCCCATAACAACAA
TCATACGACCAGAACACAGGAGGATCCTACAACAGCTCAGACCGGGGCGAGTAGTACATCTGGGAGTCAG
GGGCACAAGAAAGGGGCAAGAACACCCAAGGTACCAAAACAGGGTGGCATGAACTGGGCAGACCTGCTT
CCTCCTCCCCCAGCACATCCTCCTCCACACAGCAATAGCGAAGAGTACAACATTTCTGTAGATGAAAGC
TATGACCAAGAAATGCCATGTCCCGTGCCACCAGCAAGGATGTATTTGCAACAAGATGAATTAGAAGAG
GAGGAAGATGAACGAGGCCCCACTCCCCCTGTTGCGGGAGCAGCTTCTTCTCCAGCTGCCGTGTCCTAT
AGCCATCAGTCCACTGCCACTCTGACTCCCTCCCCACAGGAAGAACTCCAGCCCATGTTACAGGATTGT
CCAGAGGAGACTGGCCACATGCAGCACCAGCCCCGACAGGAGACGGCAGCCTGTGAGTCTCCTCCACCA
CCACGGCCGATCTCCCCTCCACATACCTATGGCTACATTTCAGGACCCCTGGTCTCAGATATGGATACG
GATGCGCCAGAAGAGGAAGAAGACGAAGCCGACATGGAGGTAGCCAAGATGCAAACCAGAAGGCTTTTG
TTACGTGGGCTTGAGCAGACACCTGCCTCCAGTGTTGGGGACCTGGAGAGCTCTGTCACGGGGTCCATG
ATCAACGGCTGGGGCTCAGCCTCAGAGGAGGACAACATTTCCAGCGGACGCTCCAGTGTTAGTTCTTCG
GACGGCTCCTTTTTCACTGATGCTGACTTTGCCAGGCAGTCGCAGCAGCGGCAGAGTATGCTGGTCTG
AAAGTAGCACGACGGCAAATGCAGGATGCTGCTGGTCTGCGACATTTTCATGCGTCTCAGTGCCCTAGG
CCCACAAGTCCCGTGTCTACAGACAGCAACATGAGTGCCGCCGTAATGCAGAAAACCAGACCAGCCAAG
AAACTGAAACACCAGCCAGGACATCTGCGCAGAGAAACCTACACAGATGATCTTCCACCACCTCCTGTG
CCGCCACCTGCTATAAAGTCACCTACTGCCCAATCCAAGACACAGCTGGAAGTACGACCTGTAGTGGTG
CCAAAACCTCCCTTCTATGGATGCAAGAACAGACAGATCATCAGACAGAAAAGGAAGCAGTTACAAGGGG
AGAGAAGTGTTGGATGGAAGACAGGTTGTTGACATGCGAACAAATCCAGGTGATCCCAGAGAAGCACAG
GAACAGCAAAATGACGGGAAAGGACGTGGAAACAAGGCAGCAAAACGAGACCTTCCACCAGCAAAGACT
CATCTCATCCAAGAGGATATTCTACCTTATTGTAGACCTACTTTTCCAACATCAAATAATCCCAGAGAT
CCCAGTTCCTCAAGCTCAATGTCATCAAGAGGATCAGGAAGCAGACAAAGAGAACAAGCAAATGTAGGT
CGAAGAAATATTGCAGAAATGCAGGTACTTGGAGGATATGAAAGAGGAGAAGATAATAATGAAGAATTA
GAGGAAACTGAAAGCTGA

[0151] >hROB01_var1_NM_002941(膜局在型) (配列番号 94)

ATGAAATGGAAACATGTTCTTTTTTGGTCATGATATCACTCCTCAGCTTATCCCCAAATCACCTGTTT
C
TGGCCCAGCTTATTCCAGACCCTGAAGATGTAGAGAGGGGGAACGACCACGGGACGCCAATCCCCACCT
C
TGATAACGATGACAATTCGCTGGGCTATACAGGCTCCCGTCTTCGTCAGGAAGATTTTCCACCTCGCAT
T
GTTGAACACCCTTCAGACCTGATTGTCTCAAAAGGAGAACCTGCAACTTTGAACTGCAAAGCTGAAGGC
C
GCCCCACACCCACTATTGAATGGTACAAAGGGGGAGAGAGAGTGGAGACAGACAAAGATGACCCTCGCT
C
ACACCGAATGTTGCTGCCGAGTGGATCTTTATTTTTCTTACGTATAGTACATGGACGGAAAAGTAGACC
T
GATGAAGGAGTCTATGTCTGTGTAGCAAGGAATTACCTTGGAGAGGCTGTGAGCCACAATGCATCGCTG
G
AAGTAGCCATACTTCGGGATGACTTCAGACAAAACCTTCGGATGTCATGGTTGCAGTAGGAGAGCCTG
C
AGTAATGGAATGCCAACCTCCACGAGGCCATCCTGAGCCCACCATTTTCATGGAAGAAAGATGGCTCTCC
A
CTGGATGATAAAGATGAAAGAATAACTATACGAGGAGGAAAGCTCATGATCACTTACACCCGTAAAAGT
G
ACGCTGGCAAATATGTTTGTGTTGGTACCAATATGGTTGGGGAACGTGAGAGTGAAGTAGCCGAGCTGA
C
TGTCTTAGAGAGACCATCATTTGTGAAGAGACCCAGTAACTTGGCAGTAACTGTGGATGACAGTGCAGA
A
TTTAAATGTGAGGCCCGAGGTGACCCTGTACCTACAGTACGATGGAGGAAAGATGATGGAGAGCTGCCC
A
AATCCAGATATGAAATCCGAGATGATCATACCTTGAAAATTAGGAAGGTGACAGCTGGTGACATGGGTT
C

ATACACTTGTGTTGCAGAAAATATGGTGGGCAAAGCTGAAGCATCTGCTACTCTGACTGTTCAAGAACC
T
CCACATTTTGTGTGAAACCCCGTGACCAGGTTGTTGCTTTGGGACGGACTGTAACTTTTCAGTGTGAA
G
CAACCGGAAATCCTCAACCAGCTATTTTCTGGAGGAGAGAAGGGAGTCAGAATCTACTTTTCTCATATC
A
ACCACCACAGTCATCCAGCCGATTTTCAGTCTCCCAGACTGGCGACCTCACAATTACTAATGTCCAGCG
A
TCTGATGTTGGTTATTACATCTGCCAGACTTTAAATGTTGCTGGAAGCATCATCACAAAGGCATATTTG
G
AAGTTACAGATGTGATTGCAGATCGGCCTCCCCAGTTATTCGACAAGGTCCTGTGAATCAGACTGTAG
C
CGTGGATGGCACTTTTCGTCCTCAGCTGTGTGGCCACAGGCAGTCCAGTGCCCACCATTCTGTGGAGAAA
G
GATGGAGTCCTCGTTTCAACCCAAGACTCTCGAATCAAACAGTTGGAGAATGGAGTACTGCAGATCCGA
T
ATGCTAAGCTGGGTGATACTGGTCGGTACACCTGCATTGCATCAACCCCCAGTGGTGAAGCAACATGGA
G
TGCTTACATTGAAGTTCAAGAATTTGGAGTTCCAGTTCAGCCTCCAAGACCTACTGACCCAAATTTAAT
C
CCTAGTGCCCCATCAAAACCTGAAGTGACAGATGTCAGCAGAAATACAGTCACATTATCGTGGCAACCA
A
ATTTGAATTCAGGAGCAACTCCAACATCTTATATTATAGAAGCCTTCAGCCATGCATCTGGTAGCAGCT
G
GCAGACCGTAGCAGAGAATGTGAAAACAGAAACATCTGCCATTAAAGGACTCAAACCTAATGCAATTTA
C
CTTTTCCTTGTGAGGGCAGCTAATGCATATGGAATTAGTGATCCAAGCCAAATATCAGATCCAGTGAAA
A

CACAAGATGTCCTACCAACAAGTCAGGGGGTGGACCACAAGCAGGTCCAGAGAGAGCTGGGAAATGCTG
T
TCTGCACCTCCACAACCCACCGTCCTTTCTTCCTCTTCCATCGAAGTGCACTGGACAGTAGATCAACA
G
TCTCAGTATATACAAGGATATAAAATTCTCTATCGGCCATCTGGAGCCAACCACGGAGAATCAGACTGG
T
TAGTTTTTGAAGTGAGGACGCCAGCCAAAAACAGTGTGGTAATCCCTGATCTCAGAAAGGGAGTCAACT
A
TGAAATTAAGGCTCGCCCTTTTTTTAATGAATTTCAAGGAGCAGATAGTGAAATCAAGTTGCCAAAC
C
CTGGAAGAAGCACCCAGTGCCCCACCCCAAGGTGTAAGTGTATCCAAGAATGATGGAAACGGAAGTCA
A
TTCTAGTTAGTTGGCAGCCACCTCCAGAAGACACTCAAAATGGAATGGTCCAAGAGTATAAGGTTTGGT
G
TCTGGGCAATGAAACTCGATACCACATCAACAAAACAGTGGATGGTTCCACCTTTTCCGTGGTCATTCC
C
TTTCTTGTTCTGGAATCCGATACAGTGTGGAAGTGGCAGCCAGCACTGGGGCTGGGTCTGGGGTAAAG
A
GTGAGCCTCAGTTCATCCAGCTGGATGCCCATGGAAACCTGTGTACCTGAGGACCAAGTCAGCCTCG
C
TCAGCAGATTTTCAAGTGTGGTGAAGCAGCCGGCCTTCATAGCAGGTATTGGAGCAGCCTGTTGGATCAT
C
CTCATGGTCTTCAGCATCTGGCTTTATCGACACCGCAAGAAGAGAAACGGACTTACTAGTACCTACGCG
G
GTATCAGAAAAGTCCCGTCTTTTACCTTCACACCAACAGTAACTTACCAGAGAGGAGGCGAAGCTGTCA
G
CAGTGGAGGGAGGCCTGGACTTCTCAACATCAGTGAACCTGCCGCGCAGCCATGGCTGGCAGACACGTG
G

CCTAATACTGGCAACAACCACAATGACTGCTCCATCAGCTGCTGCACGGCAGGCAATGGAAACAGCGAC
A
GCAACCTCACTACCTACAGTCGCCCAGCTGATTGTATAGCAAATTATAACAACCAACTGGATAACAAAC
A
AACAAATCTGATGCTCCCTGAGTCAACTGTTTATGGTGATGTGGACCTTAGTAACAAAATCAATGAGAT
G
AAAACCTTCAATAGCCCAAATCTGAAGGATGGGCGTTTTGTCAATCCATCAGGGCAGCCTACTCCTTAC
G
CCACCACTCAGCTCATCCAGTCAAACCTCAGCAACAACATGAACAATGGCAGCGGGGACTCTGGCGAGA
A
GCACTGGAAACCACTGGGACAGCAGAAACAAGAAGTGGCACCAGTTCAGTACAACATCGTGGAGCAAAA
C
AAGCTGAACAAAGATTATCGAGCAAATGACACAGTTCCTCCAATATCCCATACAACCAATCATACGAC
C
AGAACACAGGAGGATCCTACAACAGCTCAGACCGGGGCAGTAGTACATCTGGGAGTCAGGGGCACAAGA
A
AGGGGCAAGAACACCCAAGGTACCAAAACAGGGTGGCATGAACTGGGCAGACCTGCTTCCTCCTCCCC
A
GCACATCCTCCTCCACACAGCAATAGCGAAGAGTACAACATTTCTGTAGATGAAAGCTATGACCAAGAA
A
TGCCATGTCCCGTGCCACCAGCAAGGATGTATTTGCAACAAGATGAATTAGAAGAGGAGGAAGATGAAC
G
AGGCCCCACTCCCCCTGTTGCGGGAGCAGCTTCTTCTCCAGCTGCCGTGTCCTATAGCCATCAGTCCAC
T
GCCACTCTGACTCCCTCCCCACAGGAAGAACTCCAGCCCATGTTACAGGATTGTCCAGAGGAGACTGGC
C
ACATGCAGCACCAGCCCCGACAGGAGACGGCAGCCTGTGAGTCCTCCTCCACCACCACGGCCGATCTCCC
C

TCCACATACCTATGGCTACATTTTCAGGACCCCTGGTCTCAGATATGGATACGGATGCGCCAGAAGAGGA
A
GAAGACGAAGCCGACATGGAGGTAGCCAAGATGCAAACCAGAAGGCTTTTGTTACGTGGGCTTGAGCAG
A
CACCTGCCTCCAGTGTTGGGGACCTGGAGAGCTCTGTACGGGGTCCATGATCAACGGCTGGGGCTCAG
C
CTCAGAGGAGGACAACATTTCCAGCGGACGCTCCAGTGTTAGTTCTTCGGACGGCTCCTTTTTCACTGA
T
GCTGACTTTGCCAGGCAGTCGCAGCAGCGGCAGAGTATGCTGGTCTGAAAGTAGCACGACGGCAAATG
C
AGGATGCTGCTGGCCGTCGACATTTTCATGCGTCTCAGTGCCCTAGGCCACAAAGTCCCGTGTCTACAG
A
CAGCAACATGAGTGCCGCCGTAATGCAGAAAACCAGACCAGCCAAGAAACTGAAACACCAGCCAGGACA
T
CTGCGCAGAGAAACCTACACAGATGATCTTCCACCACCTCCTGTGCCGCCACCTGCTATAAAGTCACCT
A
CTGCCCAATCCAAGACACAGCTGGAAGTACGACCTGTAGTGGTGCCAAAACCTCCCTTCTATGGATGCAA
G
AACAGACAGATCATCAGACAGAAAAGGAAGCAGTTACAAGGGGAGAGAAGTGTTGGATGGAAGACAGGT
T
GTTGACATGCGAACAAATCCAGGTGATCCCAGAGAAGCACAGGAACAGCAAAATGACGGGAAAGGACGT
G
GAAACAAGGCAGCAAAACGAGACCTTCCACCAGCAAAGACTCATCTCATCCAAGAGGATATTCTACCTT
A
TTGTAGACCTACTTTTCCAACATCAAATAATCCCAGAGATCCCAGTTCCTCAAGCTCAATGTCATCAAG
A
GGATCAGGAAGCAGACAAAGAGAACAAGCAAATGTAGGTGGAAGAAATATTGCAGAAATGCAGGTACTT
G

GAGGATATGAAAGAGGAGAAGATAATAATGAAGAATTAGAGGAAACTGAAAGCTGA

[0152] >hEPHB4_cloned_from_SKmel23 (配列番号 9 5)

ATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTGGAAGAGACCCTGCTGAACACA
AAATTGAAACTGCTGATCTGAAGTGGGTGACATTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGC
GGCCTGGATGAGGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCCCCGGGCCAG
GCCCCTGGCTTCGCACAGGTTGGGTCCCACGGCGGGGCGCCGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTC
ACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCTGCCTCGGGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTCACCGTCTTCTAC
TATGAGAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTGGATGGAGAACCCTACATCAAGGTG
GACACGGTGGCCGCGGAGCATCTACCCGGAAGCGCCCTGGGGCCGAGGCCACCGGAAGGTGAATGTC
AAGACGCTGCGTCTGGGACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCAGGACCAGGGTGCCTGC
ATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAAGTGCGCCAGCTGACTGTGAACCTGACTCGATTG
CCGGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCCCGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCC
CCTGGCCCCAGCCCCAGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTCACGGGCTGC
AGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGCCGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTC
AAGCCCCTGTCAGGAGAAGGGTCCTGCCAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCA
GCCGTCTGCCAGTGCCGCGTGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCCGGGGTGACCCTGCACCACC
CCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGGCTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCC
CCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGAGGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCCGACCCGGAGGC
TCCTGTGCGCCCTGCGGGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGCCCCCGGGACCTGGTGGAGCCCTGGGTG
GTGGTTCGAGGGCTACGTCTGACTTCACCTATACCTTTGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCC
TTAGCCACGGGGCCCGTCCCATTTGAGCCTGTCAATGTCACCACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTG
TCCGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGCTGTTCCCCGGGCACCC
AGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCATGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCCAGCAGCGTGCGG
TTCCTGAAGACGTCAGAAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTGCAG
GTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACATCACAGCCAGACCCAACCTGGAT
GAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGCTGGCCCTGATTGCGGGCACGGCAGTCGTGGGTGTGGTCCTGGTC
CTGGTGGTCATTGTGGTCGCAGTTCTCTGCCTCAGGAAGCAGAGCAATGGGAGAGAAGCAGAATATTGG
GACAAACACGGACAGTATCTCATCGGGCATGGTACTAAGGTCTACATCGACCCCTTCACTTATGAAGAC

CCTAATGAGGCTGTGAGGGAATTTGCAAAAGAGATCGATGTCTCCTACGTCAAGATTGAAGAGGTGATT
GGTGCAGGTGAGTTTGGCGAGGTGTGCCGGGGGCGGCTCAAGGCCCCAGGGAAGAAGGAGAGCTGTGTG
GCAATCAAGACCCTGAAGGGTGGCTACACGGAGCGGCAGCGCGTGAGTTTCTGAGCGAGGCCTCCATC
ATGGGCCAGTTCGAGCACCCCAATATCATCCGCCTGGAGGGCGTGGTCACCAACAGCATGCCCCGTCATG
ATTCTCACAGAGTTCATGGAGAACGGCGCCCTGGACTCCTTCCTGCGGCTAAACGACGGACAGTTCACA
GTCATCCAGCTCGTGGGCATGCTGCGGGGCATGCCTCGGGCATGCGGTACCTTGCCGAGATGAGCTAC
GTCCACCGAGACCTGGCTGCTCGCAACATCCTAGTCAACAGCAACCTCGTCTGCAAAGTGTCTGACTTT
GGCCTTTCCCGATTCTGGAGGAGAACTCTTCCGATCCACCTACACGAGCTCCCTGGGAGGAAAGATT
CCCATCCGATGGACTGCCCCGGAGGCCATTGCCTTCGGGAAGTTCATTCCGCCAGTGATGCCTGGAGT
TACGGGATTGTGATGTGGGAGGTGATGTCATTTGGGGAGAGGCCGTACTGGGACATGAGCAATCAGGAC
GTGATCAATGCCATTGAACAGGACTACCGGCTGCCCCGCCCCCAGACTGTCCACCTCCCTCCACCAG
CTCATGCTGGACTGTTGGCAGAAAGACCGGAATGCCCGGCCCGCTTCCCCAGGTGGTCAGCGCCCTG
GACAAGATGATCCGGAACCCCGCCAGCCTCAAAATCGTGGCCCGGGAGAATGGCGGGGCCTCACACCCT
CTCCTGGACCAGCGGCAGCCTCACTACTCAGCTTTTGGCTCTGTGGGCGAGTGGCTTCGGGCCATCAAA
ATGGGAAGATACGAAGAAAGTTTCGCAGCCGCTGGCTTTGGCTCCTTCGAGCTGGTCAGCCAGATCTCT
GCTGAGGACCTGCTCCGAATCGGAGTCACTCTGGCGGGACACCAGAAGAAAATCTTGGCCAGTGCCAG
CACATGAAGTCCCAGGCCAAGCCGGGAACCCCGGGTGGGACAGGAGGACCGGCCCGCAGTACTGA

[0153] >hCLDN1_NM_021101 (配列番号 9 6)

ATGGCCAACGCGGGGCTGCAGCTGTTGGGCTTCATTCTCGCCTTCCTGGGATGGATCGGCGCCATCGTC
A
GCACTGCCCTGCCCCAGTGGAGGATTTACTCCTATGCCGGCGACAACATCGTGACCGCCCAGGCCATGT
A
CGAGGGGCTGTGGATGTCCTGCGTGTGCGAGAGCACCGGGCAGATCCAGTGCAAAGTCTTTGACTCCTT
G
CTGAATCTGAGCAGCACATTGCAAGCAACCCGTGCCTTGATGGTGGTTGGCATCCTCCTGGGAGTGATA
G
CAATCTTTGTGGCCACCGTTGGCATGAAGTGTATGAAGTGCTTGGGAAGACGATGAGGTGCAGAAGATGA
G

GATGGCTGTCATTGGGGGTGCGATATTTCTTCTTGCAGGTCTGGCTATTTTAGTTGCCACAGCATGGTA
T
GGCAATAGAATCGTTCAAGAATTCTATGACCCTATGACCCCAGTCAATGCCAGGTACGAATTTGGTCAG
G
CTCTCTTCACTGGCTGGGCTGCTGCTTCTCTCTGCCTTCTGGGAGGTGCCCTACTTTGCTGTTCCCTGTC
C
CCGAAAAACAACCTCTTACCCAACACCAAGGCCCTATCCAAAACCTGCACCTTCCAGCGGGAAAGACTA
C
GTGTGA

[0154] >hSLC7A5_NM_003486 (配列番号 9 7)

ATGGCGGGTGC GG GCGCCGAAGCGGCGCGCGCTAGCGGCGCCGGCGGCCGAGGAGAAGGAAGAGGCGCGG
G
AGAAGATGCTGGCCGCCAAGAGCGCGGACGGCTCGGCGCCGGCAGGCGAGGGCGAGGGCGTGACCCTGC
A
GCGGAACATCACGCTGCTCAACGGCGTGCCATCATCGTGGGGACCATTATCGGCTCGGGCATCTTCGT
G
ACGCCCACGGGCGTGCTCAAGGAGGCAGGCTCGCCGGGGCTGGCGCTGGTGGTGTGGGCCGCGTGCGGC
G
TCTTCTCCATCGTGGGCGCGCTCTGCTACGCGGAGCTCGGCACCACCATCTCCAAATCGGGCGGCGACT
A
CGCCTACATGCTGGAGGTCTACGGCTCGCTGCCCCGCTTCCTCAAGCTCTGGATCGAGCTGCTCATCAT
C
CGGCCTTCATCGCAGTACATCGTGGCCCTGGTCTTCGCCACCTACCTGCTCAAGCCGCTCTTCCCCACC
T
GCCCGGTGCCCCGAGGAGGCAGCCAAGCTCGTGGCCTGCCTCTGCGTGCTGCTGCTCACGGCCGTGAAC
G
CTACAGCGTGAAGGCCGCCACCCGGGTCCAGGATGCCTTTGCCGCCGCCAAGCTCCTGGCCCTGGCCCT
G

ATCATCCTGCTGGGCTTCGTCCAGATCGGGAAGGGTGATGTGTCCAATCTAGATCCCAACTTCTCATTT
G
AAGGCACCAAACCTGGATGTGGGGAACATTGTGCTGGCATTATACAGCGGCCTCTTTGCCTATGGAGGAT
G
GAATTACTTGAATTTCTGTACAGAGGAAATGATCAACCCCTACAGAAACCTGCCCCTGGCCATCATCAT
C
TCCCTGCCCATCGTGACGCTGGTGTACGTGCTGACCAACCTGGCCTACTTCACCACCCTGTCCACCGAG
C
AGATGCTGTCTGTCGAGGCCGTGGCCGTGGAATTCTGGGAACTATCACCTGGGCGTCATGTCCTGGATCA
T
CCCCGTCTTCGTGGGCCTGTCCTGCTTCGGCTCCGTCAATGGGTCCCTGTTACATCCTCCAGGCTCTT
C
TTCGTGGGGTCCCGGGAAGGCCACCTGCCCTCCATCCTCTCCATGATCCACCCACAGCTCCTCACCCCC
G
TGCCGTCCCTCGTGTTACGTGTGTGATGACGCTGCTCTACGCCTTCTCCAAGGACATCTTCTCCGTCA
T
CAACTTCTTCAGCTTCTTCAACTGGCTCTGCGTGGCCCTGGCCATCATCGGCATGATCTGGCTGCGCCA
C
AGAAAGCCTGAGCTTGAGCGGCCCATCAAGGTGAACCTGGCCCTGCCTGTGTTCTTCATCCTGGCCTGC
C
TCTTCCTGATCGCCGTCTCCTTCTGGAAGACACCCGTGGAGTGTGGCATCGGCTTCACCATCATCCTCA
G
CGGGCTGCCCGTCTACTTCTTCGGGGTCTGGTGGAAAAACAAGCCCAAGTGGCTCCTCCAGGGCATCTT
C
TCCACGACCGTCCTGTGTCAGAAGCTCATGCAGGTGGTCCCCCAGGAGACATAG

[0155] >hAFP_var1_ BC027881 (配列番号 98)

ATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTTAATTTTCCTACTAAATTTTACTGAATCCAGAACACTGCATAGA
AATGAATATGGAATAGCTTCCATATTGGATTCTTACCAATGTACTGCAGAGATAAGTTTAGCTGACCTG

GCTACCATATTTTTGCCCAGTTTGTTCAAGAAGCCACTTACAAGGAAGTAAGCAAAATGGTGAAAGAT
GCATTGACTGCAATTGAGAAACCCACTGGAGATGAACAGTCTTCAGGGTGTITAGAAAACCAGCTACCT
GCCTTTCTGGAAGAACTTTGCCATGAGAAAGAAATTTTGGAGAAGTACGGACATTCAGACTGCTGCAGC
CAAAGTGAAGAGGGAAGACATAACTGTTTTCTTGACACAAAAAGCCCACTCCAGCATCGATCCCACTT
TTCCAAGTTCCAGAACCTGTCACAAGCTGTGAAGCATATGAAGAAGACAGGGAGACATTCATGAACAAA
TTCATTTATGAGATAGCAAGAAGGCATCCCTTCCTGTATGCACCTACAATTCTTCTTTGGGCTGCTCGC
TATGACAAAATAATTCCATCTTGCTGCAAAGCTGAAAATGCAGTTGAATGCTTCCAAACAAAGGCAGCA
ACAGTTACAAAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTGTTAAATCAACATGCATGTGCAGTAATGAAAAATTTT
GGGACCCGAACCTTTCCAAGCCATAACTGTTACTAACTGAGTCAGAAGTTTACCAAAGTTAATTTTACT
GAAATCCAGAACTAGTCCTGGATGTGGCCCATGTACATGAGCACTGTTGCAGAGGAGATGTGCTGGAT
TGTCTGCAGGATGGGGAAAAATCATGTCCTACATATGTTCTCAACAAGACACTCTGTCAAACAAAATA
ACAGAATGCTGCAAAGTACCACGCTGGAACGTGGTCAATGTATAATTCATGCAGAAAATGATGAAAA
CCTGAAGGTCTATCTCAAATCTAAACAGGTTTTTAGGAGATAGAGATTTTAACCAATTTTCTTCAGGG
GAAAAAATATCTTCTTGCAAGTTTTGTTTATGAATATTCAAGAAGACATCCTCAGCTTGCTGTCTCA
GTAATTCTAAGAGTTGCTAAAGGATACCAGGAGTTATTGGAGAAGTGTTCAGACTGAAAACCCTCTT
GAATGCCAAGATAAAGGAGAAGAAGATTACAGAAATACATCCAGGAGAGCCAAGCATTGGCAAAGCGA
AGCTGCGGCCTCTTCCAGAACTAGGAGAATATTACTTACAAAATGCGTTTCTCGTTGCTTACACAAAG
AAAGCCCCCAGCTGACCTCGTCGGAGCTGATGGCCATCACCAGAAAAATGGCAGCCACAGCAGCCACT
TGTTGCCAACTCAGTGAGGACAACTATTGGCCTGTGGCGAGGGAGCGGCTGACATTATTATCGGACAC
TTATGTATCAGACATGAAATGACTCCAGTAAACCCTGGTGTGGCCAGTGCTGCACTTCTTCATATGCC
AACAGGAGGCCATGCTTCAGCAGCTTGGTGGTGGATGAAACATATGTCCCTCCTGCATTCTCTGATGAC
AAGTTCAATTTCCATAAGGATCTGTGCCAAGCTCAGGGTGTAGCGCTGCAAACGATGAAGCAAGAGTTT
CTCATTAACCTTGTGAAGCAAAAGCCACAAATAACAGAGGAACAACCTTGAGGCTGTCATTGCAGATTTT
TCAGGCCTGTTGGAGAAATGCTGCCAAGGCCAGGAACAGGAAGTCTGCTTTGCTGAAGAGGGACAAAA
CTGATTTCAAAAACCTCGTGCTGCTTTGGGAGTTTAA

[0156] >hTGFI_M77349 (配列番号 99)

ATGGCGCTCTTCGTGCGGCTGCTGGCTCTCGCCCTGGCTCTGGCCCTGGGCCCCGCCGCGACCCTGGCG
GGTCCCGCCAAGTCGCCCTACCAGCTGGTGTGCAGCACAGCAGGCTCCGGGGCCGCCAGCACGGCCCC

AACGTGTGTGCTGTGCAGAAGGTTATTGGCACTAATAGGAAGTACTTCACCAACTGCAAGCAGTGGTAC
CAAAGGAAAATCTGTGGCAAATCAACAGTCATCAGCTACGAGTGCTGTCCTGGATATGAAAAGGTCCCT
GGGGAGAAGGGCTGTCCAGCAGCCCTACCACTCTCAAACCTTTACGAGACCCTGGGAGTCGTTGGATCC
ACCACCACTCAGCTGTACACGGACCGCACGGAGAAGCTGAGGCCTGAGATGGAGGGGCCCCGGCAGCTTC
ACCATCTTCGCCCCTAGCAACGAGGCCTGGGCCTCCTTGCCAGCTGAAGTGCTGGACTCCCTGGTCAGC
AATGTCAACATTGAGCTGCTCAATGCCCTCCGCTACCATATGGTGGGCAGGCGAGTCCTGACTGATGAG
CTGAAACACGGCATGACCCTCACCTCTATGTACCAGAATTCCAACATCCAGATCCACCACTATCCTAAT
GGGATTGTAAGTGTGAAGTGTGCCCCGGCTCCTGAAAGCCGACCACCATGCAACCAACGGGGTGGTGCAC
CTCATCGATAAGGTCATCTCCACCATCACCAACAACATCCAGCAGATCATTGAGATCGAGGACACCTTT
GAGACCCTTCGGGCTGCTGTGGCTGCATCAGGGCTCAACACGATGCTTGAAGGTAACGGCCAGTACACG
CTTTTGGCCCCGACCAATGAGGCCTTCGAGAAGATCCCTAGTGAGACTTTGAACCGTATCCTGGGCGAC
CCAGAAGCCCTGAGAGACCTGCTGAACAACCACATCTTGAAGTCAGCTATGTGTGCTGAAGCCATCGTT
GCGGGGCTGTCTGTAGAGACCCTGGAGGGCAGGACACTGGAGGTGGGCTGCAGCGGGGACATGCTCACT
ATCAACGGGAAGGCGATCATCTCCAATAAAGACATCCTAGCCACCAACGGGGTGATCCACTACATTGAT
GAGCTACTCATCCCAGACTCAGCCAAGACACTATTTGAATTGGCTGCAGAGTCTGATGTGTCCACAGCC
ATTGACCTTTTCAGACAAGCCGGCCTCGGCAATCATCTCTCTGGAAGTGAGCGGTTGACCCTCCTGGCT
CCCCTGAATTCTGTATTCAAAGATGGAACCCCTCCAATTGATGCCATACAAGGAATTTGCTTCGGAAC
CACATAATTAAGACCAGCTGGCCTCTAAGTATCTGTACCATGGACAGACCCTGGAACTCTGGGCGGC
AAAAAACTGAGAGTTTTTGTATCGTAATAGCCTCTGCATTGAGAACAGCTGCATCGCGGCCACGAC
AAGAGGGGGAGGTACGGGACCCTGTTACGATGGACCGGGTGCTGACCCCCCAATGGGGACTGTCATG
GATGTCCTGAAGGGAGACAATCGCTTTAGCATGCTGGTAGCTGCCATCCAGTCTGCAGGACTGACGGAG
ACCCTCAACCGGAAGGAGTCTACACAGTCTTTGCTCCACAAATGAAGCCTTCCGAGCCCTGCCACCA
AGAGAACGGAGCAGACTCTTGGGAGATGCCAAGGAACTTGCCAACATCCTGAAATACCACATTGGTGAT
GAAATCCTGGTTAGCGGAGGCATCGGGGCCCTGGTGCGGCTAAAGTCTCTCCAAGGTGACAAGCTGGAA
GTCAGCTTGAAAAACAATGTGGTGAGTGTCAACAAGGAGCCTGTTGCCGAGCCTGACATCATGGCCACA
AATGGCGTGGTCCATGTCATCACCAATGTTCTGCAGCCTCCAGCCAACAGACCTCAGGAAAGAGGGGAT
GAACTTGACAGACTCTGCGCTTGAGATCTTCAAACAAGCATCAGCGTTTTCCAGGGCTTCCAGAGGTCT
GTGCGACTAGCCCCTGTCTATCAAAAGTTATTAGAGAGGATGAAGCATTAG

[0157] >hSPARC_var1_NM_003118 (配列番号 1 O O)

ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCCTTGGCAGCCCCTCAGCAAGAAGCC
CTGCCTGATGAGACAGAGGTGGTGAAGAACTGTGGCAGAGGTGACTGAGGTATCTGTGGGAGCTAAT
CCTGTCCAGGTGGAAGTAGGAGAATTTGATGATGGTGCAGAGGAAACCGAAGAGGAGGTGGTGGCGGAA
AATCCCTGCCAGAACCACCACTGCAAACACGGCAAGGTGTGCGAGCTGGATGAGAACAACACCCCCATG
TGCGTGTGCCAGGACCCACCACTGCCCAGCCCCATTGGCGAGTTTGAGAAGGTGTGCAGCAATGAC
AACAAGACCTTCGACTCTTCTGCTGCTTCTTTGCCACAAAGTGCACCCTGGAGGGCACCAAGAAGGGC
CACAAGCTCCACCTGGACTACATCGGGCCTTGCAAATACATCCCCCTTGCCTGGACTCTGAGCTGACC
GAATTCCCCCTGCGCATGCGGGACTGGCTCAAGAACGTCCTGGTCACCCTGTATGAGAGGGATGAGGAC
AACAACCTTCTGACTGAGAAGCAGAAGCTGCGGGTGAAGAAGATCCATGAGAATGAGAAGCGCCTGGAG
GCAGGAGACCACCCCGTGGAGCTGCTGGCCCGGGACTTCGAGAAGAACTATAACATGTACATCTTCCCT
GTACACTGGCAGTTGCGCCAGCTGGACCAGCACCCATTGACGGGTACCTCTCCACACCGAGCTGGCT
CCACTGCGTGTCTCCCTCATCCCCATGGAGCATTGCACCACCCGCTTTTTCGAGACCTGTGACCTGGAC
AATGACAAGTACATCGCCCTGGATGAGTGGGCCGGCTGCTTCGGCATCAAGCAGAAGGATATCGACAAG
GATCTTGTGATCTAA

[0158] >hFOXM1_var2_cloned_from_AsPC1 (配列番号 1 O 1)

ATGAAACTAGCCCCGTCGGCCACTGATTCTCAAAAGACGGAGGCTGCCCTTCCTGTTCAAAATGCC
CCAAGTGAAACATCAGAGGAGGAACCTAAGAGATCCCCTGCCAACAGGAGTCTAATCAAGCAGAGGCC
TCCAAGGAAGTGGCAGAGTCCAACCTTTGCAAGTTTCCAGCTGGGATCAAGATTATTAACCACCCACC
ATGCCAACACGCAAGTAGTGGCCATCCCCAACAAATGCTAATATTCACAGCATCATCACAGCACTGACT
GCCAAGGGAAAAGAGAGTGGCAGTAGTGGGCCAACAAATTCATCCTCATCAGCTGTGGGGGAGCCCCA
ACTCAGCCTCCAGGACTCCGGCCTCAAACCCAAACCAGCTATGATGCCAAAAGGACAGAAGTGACCCTG
GAGACCTTGGGACCAAAACCTGCAGCTAGGGATGTGAATCTTCCTAGACCACCTGGAGCCCTTTGCGAG
CAGAAACGGGAGACCTGTGCAGATGGTGAAGCAGCAGGCTGCACTATCAACAATAGCCTATCCAACATC
CAGTGGCTTCGAAAGATGAGTTCTGATGGACTGGGCTCCCGCAGCATCAAGCAAGAGATGGAGGAAAAG
GAGAATTGTCACCTGGAGCAGCGACAGGTTAAGGTTGAGGAGCCTTCGAGACCATCAGCGTCCTGGCAG
AACTCTGTGTCTGAGCGGCCACCCTACTCTTACATGGCCATGATACAATTCGCCATCAACAGCACTGAG
AGGAAGCGCATGACTTTGAAAGACATCTATACGTGGATTGAGGACCACTTTCCTACTTTAAGCACATT

GCCAAGCCAGGCTGGAAGAACTCCATCCGCCACAACCTTTCCCTGCACGACATGTTTGTCCGGGAGACG
TCTGCCAATGGCAAGGTCTCCTTCTGGACCATTACCCCAGTGCCAACCGCTACTTGACATTGGACCAG
GTGTTTAAGCCACTGGACCCAGGGTCTCCACAATTGCCCGAGCACTTGGAATCACAGCAGAAACGACCG
AATCCAGAGCTCCGCCGGAACATGACCATCAAAACCGAACTCCCCCTGGGCGCACGGCGGAAGATGAAG
CCACTGCTACCACGGGTCAGCTCATACCTGGTACCTATCCAGTTCCCGGTGAACCAGTCACTGGTGTG
CAGCCCTCGGTGAAGGTGCCATTGCCCTGGCGGCTTCCCTCATGAGCTCAGAGCTTGCCCGCCATAGC
AAGCGAGTCCGCATTGCCCCAAGGTGCTGCTAGCTGAGGAGGGGATAGCTCCTCTTTCTTCTGCAGGA
CCAGGGAAAGAGGAGAACTCCTGTTTGGAGAAGGGTTTTCTCCTTTGCTTCCAGTTCAGACTATCAAG
GAGGAAGAAATCCAGCCTGGGGAGGAAATGCCACACTTAGCGAGACCCATCAAAGTGGAGAGCCCTCCC
TTGGAAGAGTGGCCCTCCCGGCCCCATCTTTCAAAGAGGAATCATCTCACTCCTGGGAGGATTCTGCC
CAATCTCCCACCCCAAGACCCAAGAAGTCCTACAGTGGGCTTAGGTCCCCAACCCGGTGTGTCTCGGAA
ATGCTTGTGATTCAACACAGGGAGAGGAGGGAGAGGAGCCGGTCTCGGAGGAAACAGCATCTACTGCCT
CCCTGTGTGGATGAGCCGGAGCTGCTCTTCTCAGAGGGGCCAGTACTTCCCGCTGGGCCGCAGAGCTC
CCGTTCCAGCAGACTCCTCTGACCCTGCCTCCAGCTCAGCTACTCCAGGAAGTGGGAGGACCTTTT
AAGACACCCATTAAGGAAACGCTGCCATCTCCTCCACCCCGAGCAAATCTGTCTCCCCAGAACCCCT
GAATCCTGGAGGCTCACGCCCCAGCCAAAGTAGGGGGACTGGATTTAGCCCAGTACAAACCCCCAG
GGTGCCTCTGACCCCTTGCTGACCCCTGGGGCTGATGGATCTCAGCACCACTCCCTTGCAAAGTGCT
CCCCCCTTGAATCACCGCAAAGGCTCCTCAGTTCAGAACCCCTTAGACCTCATCTCCGTCCCCTTTGGC
AACTCTTCTCCCTCAGATATAGACGTCCCCAAGCCAGGCTCCCGGAGCCACAGGTTTCTGGCCTTGCA
GCCAATCGTTCTCTGACAGAAGGCCTGGTCTGGACACAATGAATGACAGCCTCAGCAAGATCCTGCTG
GACATCAGCTTTCTGGCCTGGACGAGGACCCACTGGGCCCTGACAACATCAACTGGTCCCAGTTTATT
CCTGAGCTACAGTAG

[0159] >hHSPH1_var1_NM_006644 (配列番号 1 O 2)

ATGTCGGTGGTGGGGTTGGACGTGGGCTCGCAGAGCTGCTACATCGCGGTAGCCCGGGCCGGGGGCATC
GAGACCATGCCAATGAGTTCAGCGACCGGTGCACCCCGTCAGTCATATCATTTGGATCAAAAAATAGA
ACAATCGGAGTTGCAGCCAAAAATCAGCAAATCACTCATGCAAACAATACGGTGTCTAACTTCAAAGA
TTTCATGGCCGAGCATTCAATGACCCCTTCATTCAAAGGAGAAGGAAAACTTGAGTTACGATTTGGTT
CCATTGAAAAATGGTGGAGTTGGAATAAAGGTAATGTACATGGGTGAAGAACATCTATTTAGTGTGGAG

CAGATAACAGCCATGTTGTTGACTAAGCTGAAGGAACTGCTGAAAACAGCCTCAAGAAACCAGTAACA
GATTGTGTTATTTTCAGTCCCCTCCTTCTTTACAGATGCTGAGAGGCGATCTGTGTTAGATGCTGCACAG
ATTGTTGGCCTAAACTGTTTAAGACTTATGAATGACATGACAGCTGTTGCTTTGAATTACGGAATTTAT
AAGCAGGATCTCCCAAGCCTGGATGAGAAACCTCGGATAGTGGTTTTTGTGATATGGGACATTCAGCT
TTTCAAGTGTCTGCTTGTGCTTTTAACAAGGGAAAATTGAAGGTACTGGGAACAGCTTTTGATCCTTTC
TTAGGAGGAAAAAACTTCGATGAAAAGTTAGTGGAACATTTTTGTGCAGAATTTAAAACTAAGTACAAG
TTGGATGCAAAATCCAAAATACGAGCACTCCTACGTCTGTATCAGGAATGTGAAAACTGAAAAAGCTA
ATGAGCTCTAACAGCACAGACCTTCCACTGAATATCGAATGCTTTATGAATGATAAAGATGTTTCCGGA
AAGATGAACAGGTCACAATTTGAAGAACTCTGTGCTGAACTTCTGCAAAAGATAGAAGTACCCCTTTAT
TCACTGTTGGAACAACTCATCTCAAAGTAGAAGATGTGAGTGCAGTTGAGATTGTTGGAGGCGCTACA
CGAATTCAGCTGTGAAGGAAAGAATTGCCAAATCTTTGGAAAAGATATTAGCACAACACTCAATGCA
GATGAAGCAGTAGCCAGAGGATGTGCATTACAGTGTGCAATACTTTCCCCGGCATTAAAGTTAGAGAA
TTTTCCGTACAGATGCAGTTCCTTTTCCAATATCTCTGATCTGGAACCATGATTCAGAAGATACTGAA
GGTGTTCATGAAGTCTTTAGTCGAAACCATGCTGCTCCTTTCTCCAAAGTTCTCACCTTTCTGAGAAGG
GGGCCTTTTGAGCTAGAAGCTTTCTATTCTGATCCCCAAGGAGTTCCATATCCAGAAGCAAAAATAGGC
CGCTTTGTAGTTCAGAATGTTTCTGCACAGAAAGATGGAGAAAAATCTAGAGTAAAAGTCAAAGTGCGA
GTCAACACCCATGGCATTTCACCATCTCTACGGCATCTATGGTGGAGAAAGTCCCAACTGAGGAGAAT
GAAATGTCTTCTGAAGCTGACATGGAGTGTCTGAATCAGAGACCACCAGAAAACCCAGACACTGATAAA
AATGTCCAGCAAGACAACAGTGAAGCTGGAACACAGCCCCAGGTACAAACTGATGCTCAACAAACCTCA
CAGTCTCCCCCTTCACCTGAACTTACCTCAGAAGAAAAACAAAATCCCAGATGCTGACAAAGCAAATGAA
AAAAAAGTTGACCAGCCTCCAGAAGCTAAAAAGCCCCAAAATAAAGGTGGTGAATGTTGAGCTGCCTATT
GAAGCCAACCTTGGTCTGGCAGTTAGGGAAAGACCTTCTTAACATGTATATTGAGACAGAGGGTAAGATG
ATAATGCAAGATAAATTGGAAAAAGAAAGGAATGATGCTAAAAATGCAGTTGAGGAATATGTGTATGAG
TTCAGAGACAAGCTGTGTGGACCATATGAAAAATTTATATGTGAGCAGGATCATCAAAATTTTTTGAGA
CTCCTCACAGAACTGAAGACTGGCTGTATGAAGAAGGAGAGGACCAAGCTAAACAAGCATATGTTGAC
AAGTTGGAAGAATTAATGAAAATTGGCACTCCAGTTAAAGTTCGGTTTCAGGAAGCTGAAGAACGGCCA
AAAATGTTTGAAGAACTAGGACAGAGGCTGCAGCATTATGCCAAGATAGCAGCTGACTTCAGAAATAAG
GATGAGAAATACAACCATATTGATGAGTCTGAAATGAAAAAGTGGAGAAGTCTGTTAATGAAGTGATG

GAATGGATGAATAATGTCATGAATGCTCAGGCTAAAAAGAGTCTTGATCAGGATCCAGTTGTACGTGCT
CAGGAAATTAACAAAAATCAAGGAATTGAACAACACATGTGAACCCGTTGTAAACACAACCGAAACCA
AAAATTGAATCACCCAACTGGAAAGAACTCCAAATGGCCCAAATATTGATAAAAAGGAAGAAGATTTA
GAAGACAAAAACAATTTTGGTGCTGAACCTCCACATCAGAATGGTGAATGTTACCCTAATGAGAAAAAT
TCTGTTAATATGGACTTGGACTAG

[0160] 実施例 1 1 : 共通がん抗原由来ペプチドを標的とするTCR-T細胞療法、カクテルTCR-T細胞療法の開発

<方法>

図 5 7 は、CD8分子のMHCへの結合阻害による高親和性T細胞クローンの選別法を示す。

図 5 7 のAは、抗CD8抗体存在下でのデキストラマーとTCR分子の相互作用を示す。デキストラマーに結合したMHC分子／がん抗原ペプチド複合体とTCR分子が結合する場合に、抗CD8抗体をあらかじめ加えておくことで、ペプチド非特異的なCD8分子とMHC分子との結合を防ぎ、より結合力の強いTCR分子を持つT細胞クローンのみが染色される。

図 5 7 のBは、CD8結合阻害の有無によるデキストラマー染色の比較を示す。T細胞クローン AおよびBは、CD8結合阻害を行わない場合には、ほぼ等しいデキストラマーでの染色性を示すが、CD8分子の結合を阻害すると、クローンAはクローンBに比較し強い染色性を示した。

図 5 7 のCは、CD8結合阻害による高親和性クローンの選別。上記の原理を利用し、がん抗原ペプチドを認識するT細胞をデキストラマー染色により精製することで、がん抗原ペプチドに対しより高親和性のTCR遺伝子を持つT細胞クローンを樹立することができる。

[0161] <結果>

MHC・ペプチド複合体とTCRの結合には、T細胞上のCD8分子が補助的にはたらく、その結合を増強することが知られている。本法ではデキストラマー染色を行う前に抗CD8抗体を用いてCD8分子のMHC分子への結合を阻害することで、CD8分子の結合に依存した非特異的染色を減弱し、かつ単独で強い結合力を

持つTCR遺伝子を持つクローンを検出することに成功した。実際に、GPC3ペプチドに反応するT細胞クローン2種類をCD8阻害なしの条件下でデキストラマー染色を行った場合、Clone AとClone Bの染色強度は同程度であるが、CD8阻害条件下では明らかな染色性の違いが認められた。本課題では、同様の原理に基づき、患者末梢血から、抗親和性を持つペプチド反応性TCR遺伝子を発現するT細胞を選択するため、CD8阻害を併用したデキストラマーによる染色法を用いた。

[0162] 図58は、GPC3ペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド特異的CTLクローンの樹立を示す。GPC3由来ペプチドを用いたがんペプチドワクチンを受けた患者末梢血よりCD8結合阻害条件下で、デキストラマー陽性T細胞をシングルソーティングし、アロフィーダー細胞上で培養し、T細胞クローンを樹立した。

[0163] 図60のAおよびBは、HLA-A2拘束性GPC3特異的T細胞クローンのデキストラマー染色によるTCRの結合力の評価を示す。A. CD8結合阻害なし。B. CD8結合阻害ありで比較、検討した。

[0164] 図60のCおよびDは、HLA-A24拘束性GPC3特異的T細胞クローンのデキストラマー染色によるTCRの結合力の評価を示す。C. CD8結合阻害なし。D. CD8結合阻害ありで比較、検討した。

[0165] 図60のEは、HLA-A24拘束性GPC3特異的T細胞クローンの抗原特異的IFN- γ 産生能の評価を示す。樹立したT細胞クローンを、GPC3陽性HepG2肝がん細胞株、GPC3陰性SK-Hep細胞株(SK-vec)ならびにGPC3強制発現細胞株(SK-GPC3)と20時間共培養し、IFN- γ 産生をELISPOT法により評価した。ペプチドワクチンに用いたGPC3由来ペプチド(GPC3 A24 prp.)をTAP欠損細胞株であるT2-A24細胞に外来性に結合させた細胞を陽性コントロール、HIV由来ペプチドを結合させた細胞を陰性コントロールとして、抗原特異性を評価した。

[0166] <結果>

GPC3ペプチド特異的TCR遺伝子を単離する目的で、GPC3ペプチドワクチンを受けたHLA-A2ハプロタイプの患者ならびにHLA-A24ハプロタイプの患者から提

供された末梢血リンパ球をペプチドで刺激培養後、CD8阻害を併用したデキストラマーによる染色法により、抗親和性T細胞を選択、T細胞クローンを樹立した。樹立した。樹立した各クローンのデキストラマー結合性をCD8阻害の有無で比較したところ、A2拘束性クローンについては、全体的に染色強度が低下するものの、染色性はどのクローンでも維持されていたのに対し、A24拘束性クローンでは、e1D8クローンに見られるように顕著に染色性が低下するクローンが確認された。以上の結果から、CD8阻害の有無により影響されずより高いデキストラマー染色性を示すT細胞クローンを選択することで、親和性の高いTCR遺伝子を効率よく同定できると考えられる。続いて、樹立したHLA-A24拘束性T細胞クローンのIFN- γ 産生能を評価した。いずれのT細胞クローンも外来性にペプチドを結合させたT2-A24細胞と共培養させた場合には、強いIFN- γ 産生を示した。一方で、内在性にGPC3を発現する強制発現細胞株（SK-GPC3）およびHepG2細胞株と共培養した場合には、各クローンで反応性の差異が顕著に見られた。また、そのIFN- γ 産生能は、必ずしもデキストラマー染色とは一致せず、先に述べたe1D8は、デキストラマー染色性は低いものの、内在性GPC3発現細胞に対し、強いIFN- γ 産生を示す一方で、eC7クローンはデキストラマー染色強度は高いが、内在性GPC3発現細胞株との共培養によるIFN- γ 産生能は低いという結果であった。これは、T細胞のIFN- γ 産生能が、TCRの結合力のみならず、クローンごとの細胞内の様々な機能の違いによって決まるためであると考えられる。内在性抗原を認識し腫瘍を排除可能なTCR遺伝子の選択には、治療に用いるTCR-T細胞を構築し、再度、その機能を評価することが必要である。表に、各クローンから単離したTCR遺伝子のアミノ酸配列ならびに遺伝子配列を示した。

[0167]

[表2]

表2：GPC3由来ペプチド（FVGEFFTDV）を認識するHLA-A2拘束性T細胞受容体のアミノ酸配列

C l o n e	Sequence TRA	Sequence TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
⑤ 2 B 1 1	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKQ EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNS AFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSS GNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAQRIVMEYGNKLVFG AGTILRVKS (配列番号103)	MDTWLVCWAIIFSLKAGLTEPEVTQ TPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLVF YWYRQILGQKVEFLVSFYNNSEIKSE IFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLED SAMYFCASSEGAEEFFGQGTRLTVV (配列番号104)	135	130
⑧ 2 D 9	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKQKEVE QNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFF WYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAV NMDGNRNLAFGKGNQVWVIP (配列 番号105)	MRSWPGPEMGTRLFFYVALCLLWTGH MDAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTE NHRYMYWYRQDPGHGLRIHYSYGVKD TDKGEVSDGYSVSRKTEDFLLTLESATSS QTSVYFCASVYGSEAFFGQGTRLTVV (配列番号106)	132	137
i 2 B 7	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSV AQ PEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNP YLFWVYQYPNRLQFLKYITGDNLV KGSYGFEAEFNKSQTSFHLKKPSALV SDSALYFCAVNPTGGGNKLTFGTGT QLKVEL (配列番号107)	MATRLCCVVLCLLGEELIDARVTQTP RDKVTEMGQEVTMRCQPILGHNTV FWYRQTMMQGLELLAYFRNRAPLD DSGMPKDRFSAEMPDATLATLKIQP SEPRDSAVYFCASGLGGNQPHFGD GTRLSIL (配列番号108)	133	132
⑥ 2 C 7	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQP SDSATYLCAVKGTRRALTFGSGTRL QVQP (配列番号109)	MGCRLCCAVLCLLGAVIDTEVTQT PKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHR AMYWYKQKAKKPELMFVYSYEKLSI NESVPSRFSPECNSSLNLHLHALQP EDSALYLCASSQSGVGNTAEFFGQGT RLTVV (配列番号110)	132	133

⑨	MLLELIPLLGIHFVLRARAQSVTQPD	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQ	133	131
5	IHITVSEGASLELRNYSYGATPYLFW	NPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEY		
C	YVQSPGQGLQLLLKYFSGDTLVQGIK	MSWYRQDPGLGLRQJYYSMNVEVT		
6	GFEAEFKRSQSSFNLKPSVHWSDA	DKGDVPEGYKVSKEKRNFLILESPS		
	AEYFCAVGSPSGYSTLTFGKGTMLLV	PNQTSLYFCASSPTRFYEQYFGPGTRL		
	SP (配列番号 1 1 1)	TVT (配列番号 1 1 2)		

[0168]

[表3]

表3 : G P C 3 由来ペプチド (F V G E F F T D V) を認識する H L A - A 2 拘束性 T 細胞受容体の遺伝子配列

c	Sequence TRA	Sequence TRB	T	
			R	R
l			A	B
			(	(
o			b	b
			p	p
n			)	)
e				
⑤	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTACTGGTGATC	ATGGATACCTGGCTCGTATGCTGGGCAATTTT	4	3
2	CTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAA	AGTCTCTTGAAAGCAGGACTCACAGAACCTGAA	0	9
B	CAGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCACT	GTCACCCAGACTCCCAGCCATCAGGTCACACAG	5	0
1	CAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAA	ATGGGACAGGAAGTGATCTTGCGCTGTGTCCC		
1	CTGCACTTACAGCAACAGTGCTTTTCAATACTTC	CATCTCTAATCACTTATACTTCTATTGGTACAGA		
	ATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCT	CAAATCTTGGGGCAGAAAGTCGAGTTTCTGGTT		
	GAGTTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGTAAC	TCCTTTTATAATAATGAAATCTCAGAGAAGTCT		
	AAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGGTCGA	GAAATATTCGATGATCAATTCTCAGTTGAAAGG		
	TAAATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAGA	CCTGATGGATCAAATTTCACTCTGAAGATCCGG		
	GACTCACAGCCCAGTGATTCAGCCACCTACCTC	TCCACAAAGCTGGAGGACTCAGCCATGTACTTC		
	TGTGCCCAAAGAATTGTCATGGAATATGGAAAC	TGTGCCAGCAGTGAGGGGGCTGAAGCTTTCTTT		
	AAGCTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCTGAG	GGACAAGGCACCAGACTCACAGTTGTA (配列		
	AGTCAAGTCC (配列番号113)	番号114)		
⑧	ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTG	ATGAGATCCTGGCCTGGACCTGAAATGGGCAC	3	4
2	TGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGGAGCCAACA	AAGGTTGTTCTTCTATGTGGCCCTTTGTCTCCTG	9	1
D	GAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCA	TGGACAGGACACATGGATGCTGGAATCACCCA	6	1
9	GTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACT	GAGCCCAAGACACAAGGTCACAGAGACAGGAA		
	GCACTTACAGTGACCGAGGTTCCAGTCCTTCT	CACCAGTGACTCTGAGATGTCATCAGACTGAGA		
	TCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTG	ACCACCGCTATATGTACTGGTATCGACAAGACC		
	AGTTGATAATGTTTCATATACTCCAATGGTGACA	CGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCA		
	AAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAAT	TATGGTGTTAAAGATACTGACAAAGGAGAAGT		
	AAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGA	CTCAGATGGCTATAGTGTCTCTAGATCAAAGAC		

	GACTCCCAGCCCAGTGATTGAGCCACCTACCTC TGTGCCGTGAACATGGACGGGAACAACAGACT CGCTTTTGGGAAGGGGAACCAAGTGGTGGTCA TACCA (配列番号 1 1 5)	AGAGGATTTCTCTCTACTCTGGAGTCCGCTAC CAGCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAG CGTTTACGGGTCTGAAGCTTTCTTTGGACAAGG CACCAGACTCACAGTTGTA (配列番号 1 1 6)		
i	ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTTGCGATG	ATGGCCACCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGTTCTT	3	3
2	CTCTTCACATTGAGTGGGCTGAGAGCTCAGTCA	TGTCTCCTGGGAGAAGAGCTTATAGATGCTAG	9	9
B	GTGGCTCAGCCGGAAGATCAGGTCAACGTTGC	AGTACCCAGACACCAAGGGACAAGGTGACAG	9	6
7	TGAAGGGAATCCTCTGACTGTGAAATGCACCTA TTCAGTCTCTGGAAACCCTTATCTTTTTTGGTAT GTTCAATACCCCAACCGAGGCTCCAGTTCCTTC TGAAATACATCACAGGGGATAACCTGGTTAAA GGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAACAAG AGCCAAACCTCCTTCACCTGAAGAAACCATCT GCCCTTGTGAGCGACTCCGCTTGTACTTCTGT GCTGTGAACCCACGGGAGGAGGAAACAACT CACCTTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTGG AACTC (配列番号 1 1 7)	AGATGGGACAAGAAGTAACAATGAGATGTCAG CCAATTTTAGGCCACAATACTGTTTTCTGGTACA GACAGACCATGATGCAAGGACTGGAGTTGCTG GCTTACTTCCGCAACCGGGCTCCTCTAGATGAT TCGGGGATGCCGAAGGATCGATTCTCAGCAGA GATGCCTGATGCAACTTTAGCCACTCTGAAGAT CCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTA TTTTTGTGCTAGTGGTTTGGGGGAAATCAGCC CCAGCATTTTGGTGATGGGACTCGACTCTCCAT CCTA (配列番号 1 1 8)		
6	ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTG	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTC	3	3
2	TGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGGAGCCAACA	TGTCTCCTGGGAGCAGTTCCTATAGACACTGAA	9	9
C	GAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCA	GTTACCCAGACACCAAAACACCTGGTCATGGGA	6	9
7	GTGTTCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACT GCACTTACAGTGACCGAGGTTCCAGTCCTTCT TCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTG AGTTGATAATGTTTCACTCAATGGTGACA AAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAAT AAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGA GACTCCCAGCCCAGTGATTGAGCCACCTACCTC TGTGCCGTGAAGGGGACGGGAGGAGAGCAC TTACTTTTGGGAGTGGAACAAGACTCCAAGTGC AACCA (配列番号 1 1 9)	ATGACAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAA CATATGGGGCACAGGGCTATGTATTGGTACAA GCAGAAAGCTAAGAAGCCACCGGAGCTCATGT TTGTCTACAGCTATGAGAACTCTCTATAAATG AAAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCC CCAACAGCTCTCTTAAACCTTCACCTACACGC CCTGCAGCCAGAAGACTCAGCCCTGTATCTCTG CGCCAGCAGCCAAAGTGGGGTGGGGAACACTG AAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAAGTCAAG TTGTA (配列番号 1 2 0)		

⑨	ATGCTCCTGGAGCTTATCCCACTGCTGGGGATA	ATGGGCCCCCAGCTCCTTGGCTATGTGGTCCTT	3	3
5	CATTTTGTCTGAGAACTGCCAGAGCCCAGTCA	TGCCTTCTAGGAGCAGGCCCCCTGGAAGCCCA	9	9
C	GTGACCCAGCCTGACATCCACATCACTGTCTCT	AGTGACCCAGAACCCAAGATACCTCATCACAGT	9	3
6	GAAGGAGCCTCACTGGAGTTGAGATGTAAC	GACTGGAAAGAAGTTAACAGTGACTTGTCTCA		
	TTCCTATGGGGCAACACCTTATCTCTTCTGGTAT	GAATATGAACCATGAGTATATGTCCTGGTATCG		
	GTCCAGTCCCCCGGCCAAGGCCTCCAGCTGCTC	ACAAGACCCAGGGCTGGGCTTAAGGCAGATCT		
	CTGAAGTACTTTTCAGGAGACACTCTGGTTCAA	ACTATTCAATGAATGTTGAGGTGACTGATAAGG		
	GGCATTAAAGGCTTTGAGGCTGAATTTAAGAG	GAGATGTTCTGAAGGGTACAAAGTCTCTCGA		
	GAGTCAATCTTCCTTCAATCTGAGGAAACCCTCT	AAAGAGAAGAGGAATTTCCCCCTGATCCTGGA		
	GTGCATTGGAGTGATGCTGCTGAGTACTTCTGT	GTCGCCCAGCCCCAACCAGACCTCTCTGTACTTC		
	GCTGTGGGTTTCGCTTCAGGATACAGCACCCCTC	TGTGCCAGCAGCCCCACTAGGTTCTACGAGCAG		
	ACCTTTGGGAAGGGGACTATGCTTCTAGTCTCT	TACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCAC		
	CCA (配列番号1 2 1)	A (配列番号1 2 2)		

[0169]

[表4]

表4: GPC3由来ペプチド(EYILSLEEL)を認識するHLA-A24拘束性T細胞受容体のアミノ酸配列

cl o n e	Sequence TRA	Sequence TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
8	MVLKFSVSILWQLAWVSTQLLEQSPQFL SIQEGENLTVYCNSSVFSSLQWYRQEPG EGPVLLVTVTGGEVKKLKRLTFQFGDAR KDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGRYSSASKI IFGSGTRLIRP (配列番号123)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSVGGGAPNEQFFGPGTRL TVL (配列番号124)	129	133
G 9	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPA ALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ DPGKGLTSLLIQSSQREQTSGRLNASLDK SSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVTRRALT FGSGTRLQVQP (配列番号125)	MGRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQ TPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVS WYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG NFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELG DSALYLCASSVTSGRTHDTQYFGPG TRLTVL (配列番号126)	128	135
(4 6) 2 A 6	MMISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVE QDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSF FWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFT AQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCKISG GYNKLIFGAGTRLAVHP (配列番号127)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSVGGGLGTEAFFGQGTRL TVV (配列番号128)	131	133
i1 2 G 6	MRQVARVIVFLTSLSLAKTTQPISMD YEGQEVNITCSHNNIATNDYITWYQQFP SQGPRFIIQGYKTKVTNEVASLFIPADRKS STLSLPRVSLSDTAVYYCLVGHSGNTPLVF GKGTRLVIA (配列番号129)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSVGGGAGNTIYFGECSWL TVV (配列番号131)	127	133

	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSF YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNTG RRALTFGSGTRLQVQP (配列番号 1 30)		130	
e C 1	MAGIRALFMYLWLQLDWVSRGESVGLH LPTLSVQEGDNSHINCAYSNSASDYFWYK QESGKGPPQFIIDIRSNMDKRQGQRTVL LNKTVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAGRT GFQKLVFGTGTRLLVSP (配列番号 1 32)	MGFRLLCCVAFCLLGGAGPVDSGV TPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVY WYQQLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSVGGGLYNEQFFGPGTRL TVL (配列番号 133)	131	133
e C 7	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDP QALSIQEGENATMNCYSKTSINNQLQWYR QNSGRGLVHLIRSNEREKHSGRRLVTL TSKSSSLITASRAADTASYFCVRYSSAS KIIFGSGTRLSIRP (配列番号 134)	MGFRLLCCVAFCLLGGAGPVDSGV TPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVY WYQQLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSAGGGSNNEQFFGPGTRL TVL (配列番号 135)	131	133
e D 3	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSF YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKGG NNFNKFYFGSGTKLVKP (配列番号 136)	MSIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQ TPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNH NSMYWYRQDPGMGLRLIYYSASEGT TDKGEVPNGYNVSRNLKREFSLRLES AAPSQTSVYFCASSHRVNSNQPHF GDGTRLSIL (配列番号 137)	132	133
i7 E 6	MKPTLISVLVIIFILRGTRAQRVTQPEKLLS VFKGAPVELKCNYSYSGSPELFWYVQYSR QRLQLLLRHISRESIKGFTADLNKGETSFH LKKPFAQEEDSAMYYCALANQAGTALIF GKGTTLSVSS (配列番号 138)	MGFRLLCCVAFCLLGGAGPVDSGV TPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVY WYQQLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSPGGGASSPLHFGNGTRL TVT (配列番号 140)	128	133
	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPA ALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQ		132	

	DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDK SSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVKKRAA GNKLTFGGGTRVLVKP (配列番号 1 39)			
i2 F 3	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNKS WGKLQFGAGTQVWVTP (配列番号 1 41)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSSELGD SALYFCASSAGTSGNEQFFGPGTRLT VL (配列番号 142)	130	132
i3 C 2	MWGVFLLYVSMKMGTTGQNIDQPT MTATEGAIVQINCTYQTS GFNGLFWYQ QHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLS RSKGYSYLLKELQMKDSASYLCAVRVW KAAGNKLTFGGGTRVLVKP (配列番号 143)	MLLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSWVI CKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYR QFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGV EKDKFLINHASLTSLTLTVSAHPEDSS FYICSARRLAGGGNEQFFGPGTRLT L (配列番号 144)	129	131
i6 E 9	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLG NYGQNFVFGPGTRLSVLP (配列番号 145)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSSELGD SALYFCASSVGGGLSNEQFFGPGTRL TVL (配列番号 146)	132	133
e 1 D 8	MKTFAGFSFLWLQDCMSRGEDVEQ SLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYK QEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVL LNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAENH SSASKIIFRCGCGPAE (配列番号 14 7)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVY WYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKG NILERFSAQQFPDLHSELNLSSELGD SALYFCASSVGSGRNYEQYFGPGTRL TVT (配列番号 148)	130	133

[0170]

[表5]

表5 : GPC3由来ペプチド(EYILSLEEL)を認識するHLA-A*24:01拘束性T細胞受容体の遺伝子配列

c	Sequence TRA	Sequence TRB	T	T
			R	R
l			A	B
			(	(
o			b	b
			p	p
n			)	)
8	ATGGTCCTGAAATCTCCGTGTCCATTCTTTGGA TTCAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAGCTGCTG GAGCAGAGCCCTCAGTTTCTAAGCATCCAAGA GGGAGAAAATCTCACTGTGTACTGCAACTCCTC AAGTGTTTTTCCAGCTTACAATGGTACAGACA GGAGCCTGGGGAAGGTCTGTCTCTCTGGTGA CAGTAGTTACGGGTGGAGAAGTGAAGAAGCT GAAGAGACTAACCTTTCAGTTTGGTGATGCAA GAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCC AGCCTGGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAG GCCGGTACAGCAGTGCTTCCAAGATAATCTTTG GATCAGGGACCAGACTCAGCATCCGGCCAA (配列番号149)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGATTCTGG AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT CTGTGCCAGCAGCGTAGGCGGGGGGGCACCC AATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCT CACCGTGCTA (配列番号150)	3 8 8	3 9 9
G	ATGGAGACCCTCTTGGGCCTGCTTATCCTTTGG	ATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTGCTGCTT	3	4
9	CTGCAGCTGCAATGGGTGAGCAGCAAACAGGA GGTGACACAGATTCTGCAGCTCTGAGTGCTCC AGAAGGAGAGAAACTTGGTTCTCAACTGCAGTTT CACTGATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGTT TAGGCAGGACCCTGGGAAAGGTCTCACATCTC TGTTGCTTATTCAGTCAAGTCAGAGAGAGCAAA CAAGTGGAAGACTTAATGCCTCGCTGGATAAA TCATCAGGACGTAGTACTTTATACATTGCAGCT	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTAAAGGCTGG AGTCACTCAAACCTCAAGATATCTGATCAAAAC GAGAGGACAGCAAGTGACACTGAGCTGCTCCC CTATCTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACC AACAGACCCAGGACAGGGCCTTCAGTTCCTCT TTGAATACTTCAGTGAGACACAGAGAAACAAA GGAAACTTCCCTGGTCGATTCTCAGGGCGCCA GTTCTCTAACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAG	8 5	0 5

	TCTCAGCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTCTGT GCTGTTACCAGGAGAGCACTTACTTTTGGGAGT GGAACAAGACTCCAAGTGCAACCAA (配列番 号151)	CACCTTGGAGCTGGGGGACTCGGCCCTTATCT TTGCGCCAGCAGCGTAACTAGCGGGAGAACAC ACACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCC GGCTGACAGTGCTC (配列番号152)		
(	ATGATGATATCCTTGAGAGTTTACTGGTGATC	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
4	CTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGATTCTGG	9	9
6	CGGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCCTT	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	4	9
)	CAATGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAA	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
2	CTGTACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTC	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
A	TTCTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACC	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
6	TAAGTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGTAA	ATTGAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	TGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	GAGCCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAG	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	ACTCCAAGCTCAGTGATTGAGCCACCTACCTCT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	GTAAGATTTCTGGTGGCTACAATAAGCTGATTT	CTGTGCCAGCAGCGTAGGTGGGGGTTTAGGGA		
	TTGGAGCAGGGACCAGGCTGGCTGTACACCCA	CTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCA		
	T (配列番号153)	CAGTTGTA (配列番号154)		
i	ATGAGGCAAGTGGCGAGAGTGATCGTGTCCT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
1	GACCCTGAGTACTTTGAGCCTTGCTAAGACCAC	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGATTCTGG	8	9
2	CCAGCCCATCTCCATGGACTCATATGAAGGACA	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	2	9
G	AGAAGTGAACATAACCTGTAGCCACAACAACA	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
b	TTGCTACAAATGATTATATCACGTGGTACCAAC	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
-	AGTTTCCAGCCAAGGACCACGATTTATTATTC	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
1	AAGGATACAAGACAAAAGTTACAAACGAAGTG	ATTGAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	GCCTCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGAAAGTCC	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	AGCACTCTGAGCCTGCCCCGGGTTTCCCTGAGC	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	GCACTGCTGTGTACTACTGCCTCGTGGGACAT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	TCAGGAAACACACCTCTTGTCTTTGGAAAGGGC	CTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGGGGAGCTGGA		
	ACAAGACTTTCTGTGATTGCAA (配列番号1 55)	AACACCATATATTTGGAGAGGGGAAGTTGGCT CACTGTTGTA (配列番号156)		

i	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTGATCCTG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
1	TGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAACG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAAGTGGATTCTGG	9	9
2	GAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCTTCA	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	0	9
G	ATGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTCAACT	AAGTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
b	GTACTIONACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTCTT	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
-	CTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACCTA	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
2	AGTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGTAATG	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	AAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAGA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	GCCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGAC	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	TCCAAGCTCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	GTGGTGAACACGGGCAGGAGAGCACTTACTTT	CTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGGGGAGCTGGA		
	TGGGAGTGGAACAAGACTCCAAGTGCAACCA	AACACCATATATTTTGGAGAGGGAAAGTTGGCT		
	(配列番号157)	CACTGTTGTA (配列番号158)		
e	ATGGCAGGCATTGAGCTTTATTTATGTACTTG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
C	TGGCTGCAGCTGGACTGGGTGAGCAGAGGAG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAAGTGGATTCTGG	9	9
1	AGAGTGTGGGGCTGCATCTTCTACCTGAGTG	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	3	9
	TCCAGGAGGGTGACAACCTATTATCAACTGTG	AAGTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
	CTTATTCAAACAGCGCCTCAGACTACTTCATTTG	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
	GTACAAGCAAGAATCTGGAAAAGGTCCTCAAT	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
	TCATTATAGACATTGTTCAAATATGGACAAAA	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	GGCAAGGCCAAAGAGTCACCGTTTTATTGAAT	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	AAGACAGTGAAACATCTCTCTGCAAAATTGCA	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	GCTACTCAACCTGGAGACTCAGCTGTCTACTTT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	TGTGCAGGGCGAACAGGCTTTCAGAACTTGT	CTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGGGGGCTCTACA		
	ATTTGGAAGTGGCACCCGACTTCTGGTCAGTCC	ATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTC		
	A (配列番号159)	ACCGTGCTA (配列番号160)		
e	ATGGAAACTCTCCTGGGAGTGCTTTGGTGATT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
C	CTATGGCTTCAACTGGCTAGGGTGAACAGTCA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAAGTGGATTCTGG	9	9
7	ACAGGGAGAAGAGGATCCTCAGGCCTTGAGCA	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	4	9
	TCCAGGAGGGTGAAAATGCCACCATGAACTGC	AAGTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
	AGTTACAAAAGTAGTATAAACAATTTACAGTGG	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
	TATAGACAAAATTCAGGTAGAGGCCTTGTCAC	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		

	CTAATTTTAATACGTTCAAATGAAAGAGAGAAAA CACAGTGGAAGATTAAGAGTCACGCTTGACAC TTCCAAGAAAAGCAGTTCCTTGTTGATCACGGC TTCCCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTACTTCTG TGCTGTGAGGTACAGCAGTGCTTCCAAGATAAT CTTTGGATCAGGGACCAGACTCAGCATCCGGC CAA (配列番号 161)	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT CTGTGCCAGCAGCGCAGGAGGGGGTAGTAAC AATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCT CACCGTGCTA (配列番号 162)		
e	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTGATCCTG	ATGAGCATCGGGCTCCTGTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
D	TGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAACG	TCTCTCCTGTGGGCAAGTCCAGTGAATGCTGGT	9	9
3	GAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCCCTCA ATGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAACT GTACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCTT CTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACCTA AGTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGTAATG AAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAGA GCCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGAC TCCAAGCTCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGT GTGGTGAAAGGTGGGAACAACCTCAACAAATT TTACTTTGGATCTGGGACCAAACTCAATGTAAA ACCAA (配列番号 163)	GTCACCTCAGACCCCAAAATTCAGGTCCTGAAG ACAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCCA GGATATGAACCATAACTCCATGTACTGGTATCG ACAAGACCCAGGCATGGGACTGAGGCTGATTT ATTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACTGACAAAG GAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGAT TAAACAAACGGGAGTTCTCGCTCAGGCTGGAG TCGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCT GTGCCAGCAGCCACAGGGTTAATAGCAATCAG CCCCAGCATTTTGGTGATGGGACTCGACTCTCC ATCCTA (配列番号 164)	7	9
i	ATGAAGCCCACCCTCATCTCAGTGCTTGTGATA	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
7	ATATTTATACTCAGAGGAACAAGAGCCCAGAG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAGTGGATTCTGG	8	9
E	AGTGACTCAGCCCGAGAAGCTCCTCTGTCTT	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	5	9
6	TAAAGGGGCCCCAGTGGAGCTGAAGTGCAACT	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
-	ATTCCTATTCTGGGAGTCCTGAACCTTCTGGTA	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
1	TGTCCAGTACTCCAGACAACGCCTCCAGTTACT CTTGAGACACATCTCTAGAGAGAGCATCAAAG GCTTCACTGCTGACCTTAACAAAGGCGAGACAT CTTCCACCTGAAGAAACCATTTGCTCAAGAGG AAGACTCAGCCATGTATTACTGTGCTCTTGCCA ACCAGGCAGGAACCTGCTCTGATCTTTGGGAAG	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT CTGTGCCAGCAGCCCGGTGGAGGGGCGAGT		

	GGAACCACCTTATCAGTGAGTTCCA (配列番号165)	TCACCCCTCCACTTTGGGAATGGGACCAGGCTC ACTGTGACA (配列番号166)		
i	ATGGAGACCCTCTGGGCCTGCTTATCCTTTGG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
7	CTGCAGCTGCAATGGGTGAGCAGCAACAGGA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAGTGGATTCTGG	9	9
E	GGTGACACAGATTCTGCAGCTCTGAGTGCCC	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	7	9
6	AGAAGGAGAAAACCTGGTTCTCAACTGCAGTTT	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
-	CACTGATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGTT	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTAAGTGGTACC		
2	TAGGCAGGACCCTGGGAAAGGTCTCACATCTC	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
	TGTTGCTTATTCAGTCAAGTCAGAGAGAGCAAA	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	CAAGTGGAAGACTTAATGCCTCGCTGGATAAA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	TCATCAGGACGTAGTACTTTATACATTGCAGCT	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	TCTCAGCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTCTGT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	GCTGTGAAACGACGAGCTGCAGGCAACAAGCT	CTGTGCCAGCAGCCCGGTGGAGGGGCGAGT		
	AACTTTTGAGGAGGAACAGGGTGCTAGTTA	TCACCCCTCCACTTTGGGAATGGGACCAGGCTC		
	AACCAA (配列番号167)	ACTGTGACA (配列番号168)		
i	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTGATCCTG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
2	TGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAACG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAGTGGATTCTGG	9	9
F	GAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCCTTCA	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	1	6
3	ATGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAACT	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
	GTACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCTT	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTAAGTGGTACC		
	CTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACCTA	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
	AGTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGTAATG	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	AAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAGA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	GCCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGAC	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	TCCAAGCTCAGTGATTACAGCCACCTACCTCTGT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	GTGGTGAACAAGAGCTGGGGGAAATTGCAGTT	CTGTGCCAGCAGCGCCGGGACTAGCGGAAATG		
	TGGAGCAGGGACCCAGGTTGTGGTCACCCAG	AGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACC		
	(配列番号169)	GTGCTA (配列番号170)		
i	ATGTGGGGAGTTTTCTTCTTTATGTTTCATGA	ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGGCCAGGC	3	3
3	AGATGGGAGGCACTACAGGACAAAACATTGAC	TCCGGGCTTGGTGCTGTCGTCTCTCAACATCCG	8	9
	CAGCCCACTGAGATGACAGCTACGGAAGGTGC	AGCTGGGTATCTGTAAGAGTGGAACCTCTGT	8	3

C	CATTGTCCAGATCAACTGCACGTACCAGACATC	GAAGATCGAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAGGC		
2	TGGGTTCAACGGGCTGTTCTGGTACCAGCAAC	CACAACTATGTTTTGGTATCGTCAGTCCCCGAA		
	ATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTGTCTTACA	ACAGAGTCTCATGCTGATGGCAACTTCCAATGA		
	ATGTTCTGGATGGTTTGGAGGAGAAAGGTCGT	GGGCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCG		
	TTTTCTTCATTCTTAGTCGGTCTAAAGGGTACA	AGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCC		
	GTTACCTCCTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAG	TGACCTTGTCCTACTCTGACAGTGACCAGTGCCC		
	ACTCTGCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGAGTGT	ATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTG		
	GGAAAGCTGCAGGCAACAAGCTAACTTTTGA	CTAGAAGGCTAGCGGGAGGAGGGAATGAGCA		
	GGAGGAACCAGGGTGCTAGTTAAACCA (配 列番号171)	GTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCGTGC TA (配列番号172)		
i	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTGATCCTG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
6	TGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAACG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGATTCTGG	9	9
E	GAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCCTTCA	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	7	9
9	ATGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAACT	AAGTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
	GTACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCTT	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
	CTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACCTA	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
	AGTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGTAATG	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	AAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAGA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	GCCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGAC	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		
	TCCAAGCTCAGTGATTGAGCCACCTACCTCTGT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT		
	GTGGTGAACCTCGGGAACATATGGTCAGAATTTT	CTGTGCCAGCAGCGTAGGGGGGGGCTAAGC		
	GTCTTTGGTCCCGGAACCAGATTGTCCGTGCTG	AATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCT		
	CCCT (配列番号173)	CACCGTGCTA (配列番号174)		
E	ATGAAGACATTTGCTGGATTTTCGTTCTGTTTT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	3	3
1	TGTGGCTGCAGCTGGACTGTATGAGTAGAGGA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGATTCTGG	9	9
D	GAGGATGTGGAGCAGAGTCTTTTCTGAGTGT	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	0	9
8	CCGAGAGGGAGACAGCTCCGTTATAAACTGCA	AAGTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC		
	CTTACACAGACAGCTCCTCCACCTACTTATACTG	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC		
	GTATAAGCAAGAACCTGGAGCAGGTCTCCAGT	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTC		
	TGCTGACGTATATTTTTTCAAATATGGACATGA	ATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAA		
	AACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGAATA	AGGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACA		
	AAAAGGATAAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAG	GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAG		

ACACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACTTCT	CTCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTT
GTGCAGAGAACCACAGCAGTGCTTCCAAGATA	CTGTGCCAGCAGCGTAGGGTCGGGACGAAATT
ATCTTTCGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAA	ACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTC
(配列番号 175)	ACGGTCACA (配列番号 176)

[0171] 図59は、F0XM1ペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド特異的CTLクローンの樹立を示す。F0XM1由来ペプチドを用いたがんペプチドワクチンを受けた患者末梢血よりCD8結合阻害条件下で、デキストラマー陽性T細胞をシングルソーティングし、アロフィーダー細胞上で培養し、T細胞クローンを樹立した。

[0172] 図59のAおよびBは、HLA-A24拘束性F0XM1特異的T細胞クローンのデキストラマー染色によるTCRの結合力の評価を示す。A. CD8結合阻害なし。B. CD8結合阻害ありで比較、検討した。

[0173] <結果>

F0XM1ペプチドワクチンを受けた患者末梢血をペプチド存在下で刺激培養し、HLA-A24デキストラマー染色により、反応性クローンを樹立した。デキストラマー染色により樹立したF0XM1特異的反応性T細胞クローンのTCRの結合力を評価した結果、4つのクローンのうち、3つのクローンはCD8阻害条件下においても良好な染色性を確認できたが、21E7クローンについては、CD8阻害により顕著な染色性の低下が認められた。表に、各クローンから単離したTCR遺伝子のアミノ酸配列ならびに遺伝子配列を示した。

[0174]

[表6]

表6：FOXMI由来ペプチド (IYTWIEDHF) を認識するHLA-A24拘束性T細胞受容体のアミノ酸配列

C	SequenCe TRA	SequenCe TRB	T	T
I			R	R
o			A	B
n			(	(
e			b	b
			p	p
			)	)
F	MALQSTLGAVWLGLLLNSLWKVAESKDQVFQP	MGCRLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMG	1	1
5	STVASSEGAVVEIFCNHSVSNAYNFFWYLHFPG	MTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPEL	3	3
	CAPRLLVKGSKPSQQGRYNMTYERFSSSLILQV	MFVYSYEKLSINESVPSRFSPECNSSLNLHLHAL	0	7
	READAAVYYCAVNQAGTALIFGKGTLSVSS	QPEDSALYLCASSQERTSGRSADTQYFGPGTRLT		
	(配列番号177)	VLE (配列番号178)		
②	MLLLIPVLGMIFALRDARAQSVSQHNHHVILSE	MLLLLLLPGISLLLPGSLAGSGLGAVVSQHPSW	1	1
1	AASLELGCNYSYGGTVNLFWYVQYPGQHLQLL	VICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSL	3	3
E	KYFSGDPLVKIGKFEAEFIKSKFSNLRKPSVQ	MLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTST	5	9
7	WSDTAEYFCAVRHGGTGTASKLTFGTGTRLQV	LTVTSAHPEDSSFYICARALGGYTFGSGTRLTVVE		
	TL (配列番号179)	(配列番号180)		
②	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPG	MGSRLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTR	1	1
1	PLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRK	GQQVTLSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEY	3	3
D	GPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLIR	FSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLEL	2	1
5	DSQPSDSATYLCAMSGHFNKFYFGSGTKLNVKP	GDSALYLCASSLRAGELFFGEGSRLTVLE (配列		
	(配列番号181)	番号182)		
1	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEAL	MGRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITAT	1	1
F	RLQEGESSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGP	GQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQY	3	3
5	EFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKP	YNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELG	3	2
	EDSATYLCAASNSSGGSNYKLTFGKGTLLTVNP	DSALYFCASSVDGKGTQYFGPGTRLTVLE (配列		
	(配列番号183)	番号184)		

[0175]

[表7]

表7: FOXM1由来ペプチド(IYTWIEDIIF)を認識するHLA-A24拘束性T細胞受容体の遺伝子配列

C	SequenCe TRA	SequenCe TRB	T	T
I			R	R
o			A	B
n			(	(
e			b	b
			p	p
			)	)
F	ATGGCTTTCAGAGCACTCTGGGGGCGGTGTG	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTC	3	4
5	GCTAGGGCTTCTCCTCAACTCTCTGGAAGGT	TGTCTCCTGGGAGCAGTTCCCATAGACACTGAA	9	0
	TGCAGAAAGCAAGGACCAAGTGTTCAGCCTTC	GTTACCCAGACACCAAAACACCTGGTCATGGGA	1	8
	CACAGTGGCATCTTCAGAGGGAGCTGTGGTGG	ATGACAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAA		
	AAATCTTCTGTAATCACTCTGTGTCCAATGCTTA	CATATGGGGCACAGGGCTATGTATTGGTACAA		
	CAACTTCTTCTGGTACCTTCACTTCCCGGGATGT	GCAGAAAGCTAAGAAGCCACCGGAGCTCATGT		
	GCACCAAGACTCCTTGTTAAAGGCTCAAAGCCT	TTGTCTACAGCTATGAGAACTCTCTATAAATG		
	TCTCAGCAGGGACGATACAACATGACCTATGAA	AAAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCC		
	CGGTTCTTTCATCGTCTCATCTCCAGGTGC	CCAACAGCTCTCTTTAAACCTTCACTACACGC		
	GGGAGGCAGATGCTGCTGTTTACTACTGTGCTG	CCTGCAGCCAGAAGACTCAGCCCTGTATCTCTG		
	TTAACCAGGCAGGAAGTCTCTGATCTTTGGGA	CGCCAGCAGCCAAGAGCGGACTAGCGGGAGG		
	AGGGAACCACTTATCAGTGAGTTCCA (配列番号185)	TCGGCAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACC		
		CGGCTGACAGTGCTC (配列番号186)		
②	ATGCTCCTGTTGCTCATACCACTGCTGGGGATG	ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGGCCAGGT	4	4
1	ATTTTGGCCTGAGAGATGCCAGAGCCCAGTCT	ATAAGCCTCCTTCTACCTGGGAGCTTGGCAGGC	0	1
E	GTGAGCCAGCATAACCACCACGTAATTCTCTCT	TCCGGGCTTGGTGCTGTCGTCTCTCAACATCCG	6	4
7	GAAGCAGCCTCACTGGAGTTGGGATGCAACTA	AGCTGGGTATCTGTAAGAGTGGAACCTCTGTG		
	TTCTATGGTGGAAGTGTAAATCTTCTGCTGAT	AAGATCGAGTGCCGTTCCCTGGACTTTTCAAGCC		
	GTCCAGTACCCTGGTCAACACCTTCAGCTTCTCC	ACAACTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCCCGAAA		
	TCAAGTACTTTTCAAGGGATCCACTGGTTAAAG	CAGAGTCTCATGCTGATGGCAACTTCCAATGAG		
	GCATCAAGGGCTTTGAGGCTGAATTTATAAAG	GGCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA		
	AGTAAATTCTCCTTAATCTGAGGAAACCTCTG	GAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCT		

	TGCAGTGGAGTGACACAGCTGAGTACTTCTGT GCCGTGAGGCACGGCGGTACCGGCACTGCCAG TAAACTCACCTTTGGGACTGGAACAAGACTTCA GGTCACGCTCG (配列番号187)	GACCTTGCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCCA TCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGC TAGAGCTTTAGGAGGCTACACCTTCGGTTCGGG GACCAGGTTAACC GTTGT A (配列番号188)		
②	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTACTGGTGATC	ATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTGCTGCTT	3	3
1	CTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGAGCCAA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTAAAGGCTGG	9	9
D	CAGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCACT	AGTCACTCAAACCTCAAGATATCTGATCAAAAC	7	0
5	CAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAA CTGCACTTACAGCAACAGTGCTTTTCAATACTTC ATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCC TGAGTTGCTGATGTACATACTCCAGTGGTAA CAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGGTCG ATAAATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAG AGACTCACAGCCCAGTGATTACGCCACCTACCT CTGTGCAATGAGCGGTCACTTCAACAAATTTTA CTTTGGATCTGGGACCAAACCTCAATGTAAAACC AA (配列番号189)	GAGAGGACAGCAAGTGACACTGAGCTGCTCCC CTATCTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACC AACAGACCCCAGGACAGGGCCTTCAGTTCCTCT TTGAATACTTCAGTGAGACACAGAGAAACAAA GGAAACTTCCCTGGTCGATTCTCAGGGCGCCAG TTCTCTAACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAGC ACCTTGGAGCTGGGGGACTCGGCCCTTTATCTT TGCGCCAGCAGCTTGCGGGCCGGGGAGCTGTT TTTTGGAGAAGGCTCTAGGCTGACCGTACTG (配列番号190)		
1	ATGGAGAAAATGTTGGAGTGTGCATTCATAGT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	4	3
F	CTTGTGGCTTCAGCTTGGCTGGTTGAGTGGAGA	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGATTCTGG	0	9
5	AGACCAGGTGACGCAGAGTCCCGAGGCCCTGA GACTCCAGGAGGGAGAGAGTAGCAGTCTCAAC TGCAGTTACACAGTCAGCGGTTTAAGAGGGCT GTTCTGGTATAGGCAAGATCCTGGGAAAGGCC CTGAATTCCTCTTCACCTGTATTAGCTGGGGA AGAAAAGGAGAAAGAAAGGCTAAAAGCCACA TTAACAAGAAGGAAAGCTTTCTGCACATCACA GCCCCTAACCTGAAGACTCAGCCACTTATCTCT GTGCTGCCTCCAATAGTGGAGGTAGCAACTATA AACTGACATTTGGAAGGAACTCTCTTAACCG TGAATCCAA (配列番号191)	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCAGTTCCTCA TTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAA GGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACAG TTCCTGACTTGCACTCTGAACATAACCTGAGCT CTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTCT GTGCCAGCAGCGTAGACGGGAAGGGGACCCA GTAATTGGGGCCAGGCACGCGGCTCCTGGTGC TC (配列番号192)	0	3

[0176] 図60は、HSP105ペプチドワクチンを受けた患者末梢血からのペプチド特異的CTLクローンの樹立を示す。HSP105-HLA-A2デキストラマーは染色性が不

十分であり、結合を示すT細胞の検出に使用できなかった。そのため、HSP105由来ペプチドを用いたがんペプチドワクチンを受けた患者末梢血を抗原存在下で刺激し、脱顆粒反応を示すCD8T細胞をCD107aアッセイで検出した。CD107a陽性CD8T細胞をシングルソーティングし、アロフィーダー細胞上で培養し、T細胞クローンを樹立した。

[0177] 図6OのAは、HLA-A2拘束性HSP105特異的T細胞クローンのIFN- γ 産生をELISPOT法による反応性の評価を示す。樹立した各T細胞クローンを、HSP105由来ペプチドを外来性に結合させた標的細胞（T2細胞）と20時間、共培養し、抗原刺激依存的なIFN- γ 産生を評価した。HIV由来ペプチドを結合させた細胞を陰性コントロールとして、抗原特異性を評価した。

[0178] 図6OのBおよびCは、HLA-A2拘束性HSP105特異的T細胞クローンの細胞傷害活性を示す。標的細胞を蛍光色素(カルセイン)で標識し、T細胞クローンと4時間共培養し、蛍光の減衰を指標に標的細胞に対する細胞傷害活性を評価した。B. 外来性にペプチドを結合させたT2細胞を標的とした。ペプチドワクチンに用いたHSP105由来ペプチド(HSPA-7)をTAP欠損細胞株であるT2細胞に外来性に結合させた細胞を陽性コントロール、HIV由来ペプチド(HIVA2)を結合させた細胞を陰性コントロールとして、抗原特異性を評価した。C. 内在性にHSP105を発現するがん細胞株を標的とし、細胞傷害活性を評価した。Caski細胞およびSiHa-A2細胞はHSP105陽性、SW620細胞株およびHepG2細胞株はHSP105陰性細胞株として用いた。11B9クローンの細胞傷害活性は未評価。

[0179] <結果>

HSP105のペプチドワクチンを受けたHLA-A2ハプロタイプを持つ患者から、HSP105ペプチド反応性を持つT細胞クローンを樹立した。HLA-A2-HSP105デキストラマーは、染色性が不十分であり、デキストラマー染色による反応性クローンの検出が困難であったため、本検討では、あらかじめペプチドで刺激培養した患者末梢血単核球を、再度、ペプチド存在下でA2発現K562細胞株と共培養し、抗原を認識し脱顆粒を示す（脱顆粒を示した場合、通常、細胞内に存在するCD107a分子が細胞表面に露出することを利用した脱顆粒評価法によ

る) T細胞をソーティングにより分取し、反応性T細胞クローンを樹立した。樹立した5つのT細胞クローンの抗原特異的IFN- γ 産生能を評価したところ、いずれのクローンでもペプチド存在下でHLA-A2 T2細胞との共培養によりIFN- γ 産生を認めたが、特に7B9, 10G7, 10C9は強いIFN- γ 産生能を示した。11B9クローンについては、他のクローンに比較し、顕著に反応性が低かったことから、7B9, 8D4, 10G7ならびに10C9について、続いて細胞傷害性テストを実施した。これら4つのクローンのいずれも、ペプチドを外来性に結合させたT2細胞に対し傷害活性を示し、特に7B9、8D4クローンは強い傷害活性を示した。さらに、内在性にHSP105を発現するこれらクローンのがん細胞株に対する細胞傷害活性を評価した結果、7B9, 10G7ならびに10C9クローンは、CasKi細胞株に対していずれも有意な細胞傷害活性を示した。SiHaA2ならびにSW620細胞株に対する傷害活性は、HSP105陰性HepG2細胞株と比較し、有意な細胞傷害活性は認められなかった。8D4、11B9クローンについては、未実施であり、今後、再評価を行う。表に、各クローンから単離したアミノ酸配列ならびにTCR遺伝子の遺伝子配列を示した。

[0180]

[表8]

表8 : HSP105由来ペプチド (RLMNDMTAVまたはKLMSSENSTD L) を認識するHLA-A2拘束性T細胞受容体のアミノ酸配列

C	Sequence TRA	Sequence TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
1 1 B 9	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSV QEAETVTLSCYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILV IRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQ LGDAAMYFCAYRIPGAGSYQLTFGKGTKLSVIP (配列番号193)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRY KVAKRQGDVALRCDPISGHVSLFWYQQAL GQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAER PEGSVSTLKIQRTOQEDSAVYLCASSPGLAG GAQETQYFGPGTRLLVL (配列番号194)	136	136
7 B 9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQ EGENATMNCYKTSINNQLWYRQNSGRGLVHLI LIRSNEREKHSGRLRVTLDTSKSSSLITASRAADT ASYFCATDTGGAQKL VFGQGTRLTINP (配列番号195)	MDSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPDR GETQYFGPGTRLLVL (配列番号196)	131	132
1 0 G 7	MWGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTMTATE GAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSY NVLDGLEEKGRFSSFLSRSGYSYLLKELQMKDS ASYLCAVRALREAGTALIFGKGTTLSVSS (配列番号197)	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSH QVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILG QKVEFLVSFYNNSEIKSEIFDDQFSVERPD GSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSQNREAFF GQGTRLTIV (配列番号198)	129	131
8 D 4	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFN VPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKL LMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLS DSATYLCVVSARVFGSGTRLSIRP (配列番号199)	MGTSLLCWMALCLLGADHDTGVSQDPR HKITKRQGNVTRCDPISEHNRLYWYRQTL GQGPEFLTYFQNEAQLKSRLLSDRFSAPER KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSPLAGV RYEQYFGPGTRLTVT (配列番号201)	126	134

	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGP LSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGP ELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMSVRSGGAGSYQLTFGKGTKLSV IP (配列番号 2 0 0)		137	
1 0 C 9	MSLSSLLKVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQ EKEAVTLDCYDTS DPSYGLFWYKQPSSGEMIFLI YQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISASQ LGDSAMYFCAMRDRNTGNQFYFGTGTSLTVIP (配列番号 2 0 2)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKH LITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLD QGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFP DLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVEVYNEQ FFGPGTRLTVL (配列番号 2 0 3)	135	131

[0181]

[表9]

表9：HSP105由来ペプチド(RLMNDMTAVまたはKLMS SNS TDL)を認識するHLA-A2拘束性T細胞受容体の遺伝子配列

c	Sequence TRA	Sequence TRB	T	T
l			R	R
o			A	B
n			(	(
e			b	b
			p	p
			)	)
1	ATGGCATGCCCTGGCTTCTGTGGGCACTTGTG	ATGGGCACCAGGCTCCTCTGCTGGGTGGTCTCTG	4	4
1	ATCTCCACCTGTCTTGAATTTAGCATGGCTCAGA	GGTTTCCTAGGGACAGATCACACAGGTGCTGG	0	0
B	CAGTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGC	AGTCTCCCAGTCCCCTAGGTACAAAGTCGCAAA	9	8
9	AGGAGGCAGAGACCGTGACCCTGAGCTGCACA	GAGAGGACAGGATGTAGCTCTCAGGTGTGATC		
	TATGACACCACTGAGAGTGATTATTATTTATTCT	CAATTTGCGGTCTGTATCCCTTTTTTGGTACCA		
	GGTACAAGCAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATT	ACAGGCCCTGGGGCAGGGGCCAGAGTTTCTGA		
	CTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATAAGCAACAG	CTTATTTCCAGAATGAAGCTCAACTAGACAAAT		
	AATGCAACAGAGAATCGTTTCTGTGAACTTC	CGGGGCTGCCAGTGATCGCTTCTTGCAGAAA		
	CAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAAGATC	GGCCTGAGGGATCCGTCTCCACTCTGAAGATCC		
	TCAGACTCACAGCTGGGGGATGCCGCGATGTA	AGCGCACACAGCAGGAGGACTCCGCCGTGTAT		
	TTTCTGTGCTTATAGGATCCCGGGTGCTGGGAG	CTCTGTGCCAGCAGCCCGGGTTAGCGGGAGG		
	TTACCAACTCACTTCGGGAAGGGGACCAAAC	GGCCCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCA		
	CTCGGTCATACCAA (配列番号204)	CGCGGCTCCTGGTGCTC (配列番号205)		
7	ATGGAAACTCTCCTGGGAGTGTCTTTGGTGATT	ATGGACTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTT	3	3
B	CTATGGCTTCAACTGGCTAGGGTGAACAGTCAA	GCATCCTGGTAGCAAAGCACACAGATGCTGGA	9	9
9	CAGGGAGAAGAGGATCCTCAGGCCTTGAGCAT	GTTATCCAGTACCCCGGCACGAGGTGACAGA	4	6
	CCAGGAGGGTGAAAATGCCACCATGAACTGCA	GATGGGACAAGAAGTGACTCTGAGATGTAAAC		
	GTTACAAAACCTAGTATAAACAATTTACAGTGGT	CAATTTGAGGACACGACTACCTTTTCTGGTACA		
	ATAGACAAAATTCAGGTAGAGGCCTTGTCACC	GACAGACCATGATGCGGGGACTGGAGTTGCTC		
	TAATTTTAATACGTTCAAATGAAAGAGAGAAAC	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCGATAGATGATT		
	ACAGTGGAAGATTAAGAGTCACGCTTGACACTT	CAGGGATGCCCCGAGGATCGATTCTCAGCTAAG		
	CCAAGAAAAGCAGTTCCTTGTTGATCACGGCTT	ATGCCTAATGCATATTCTCCACTCTGAAGATCC		

	CCCGGGCAGCAGACTGCTTCTTACTTCTGTG CTACGGACACGGGGGGAGCCAGAAGCTGGT ATTTGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCC AA (配列番号206)	AGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACT TCTGTGCCAGCAGCCCCGACAGGGGGGAGACC CAGTACTTCGGGCCAGGCACGCGGCTCCTGGT GCTC (配列番号207)		
1	ATGTGGGGAGTTTTCTTCTTTATGTTTCATGA	ATGGATACCTGGCTCGTATGCTGGGCAATTTTT	3	3
0	AGATGGGAGGCACTACAGGACAAAACATTGAC	AGTCTCTTGAAAGCAGGACTCACAGAACCTGAA	8	9
G	CAGCCCACTGAGATGACAGCTACGGAAGGTGC	GTCACCCAGACTCCAGCCATCAGGTACACACAG	8	1
7	CATTGTCCAGATCAACTGCACGTACCAGACATC TGGGTTCAACGGGCTGTTCTGGTACCAGCAACA TGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTGTCTTACAA TGTTCTGGATGGTTTGGAGGAGAAAGGTCGTT TTTCTTCATTCCTTAGTCGGTCTAAAGGGTACAG TTACCTCCTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGA CTCTGCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGAGCCCTC CGGGAGGCAGGAACTGCTCTGATCTTTGGGAA GGGAACCACCTTATCAGTGAGTTCCA (配列番 号208)	ATGGGACAGGAAGTGATCTTGCGCTGTGTCCC CATCTCTAATCACTTATACTTCTATTGGTACAGA CAAATCTTGGGGCAGAAAGTCGAGTTTCTGGTT TCCTTTTATAATAATGAAATCTCAGAGAAGTCT GAAATATTCGATGATCAATTCTCAGTTGAAAGG CCTGATGGATCAAATTTCACTCTGAAGATCCGG TCCACAAAGCTGGAGGACTCAGCCATGTACTTC TGTGCCAGCAGTCAAATCGGGAAGCTTTCTTT GGACAAGGCACCAGACTCACAGTTGTA (配列 番号209)		
8	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTGATCCTGT	ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTG	3	4
D	GGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAACGG	TGTCTCCTGGGGGAGATCACGCAGATACTGG	7	0
4	AAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCTTCAA TGTTCCAGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAACTG TACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCTTC TGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAGAACCTAA GTTGCTGATGTCCGTATACTCCAGTGGAATGA AGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAGAG CCAGCCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTC CAAGCTCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGT GGTGAGCGCCCGGTCTTTGGATCAGGGACCA GACTCAGCATCCGGCCAA (配列番号210)	AGTCTCCAGGACCCAGACACAAGATCACAAA GAGGGGACAGAATGTAACCTTCAGGTGTGATC CAATTTCTGAACACAACCGCCTTTATTGGTACCG ACAGACCCTGGGGCAGGGCCAGAGTTTCTGA CTTACTTCCAGAATGAAGCTCAACTAGAAAAAT CAAGGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGA GGCCTAAGGGATCTTTCTCACCTTGGAGATCC AGCGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTAT CTCTGTGCCAGCAGCCCCCTAGCGGGGGTCAG GTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGC TCACGGTCACA (配列番号212)	9	2

	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTACTGGTGATC		4
	CTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTTGGAGCCAA		1
	CAGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCACT		2
	CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAA		
	CTGCACTTACAGCAACAGTGCTTTTCAATACTTC		
	ATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCT		
	GAGTTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGTAAC		
	AAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGGTCGA		
	TAAATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAGA		
	GA CTCACAGCCCAGTGATT CAGCCACCTACCTC		
	TGTGCAATGAGCGTCAGAGGCTCTGGGGCTGG		
	GAGTTACCAACTCACTTTCGGGAAGGGGACCA		
	AACTCTCGGTCATACCAA (配列番号 2 1		
	1)		
1	ATGTCACTTCTAGCCTGCTGAAGGTGGTCACA	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTT	4 3
0	GCTTCACTGTGGCTAGGACCTGGCATTGCCAG	TGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAGTGGATTCTGG	0 9
C	AAGATAACTCAAACCAACCAGGAATGTTCTGTG	AGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGC	6 3
9	CAGGAAAAGGAGGCTGTGACTCTGGACTGCAC	AACTGGACAGCGAGTGACGCTGAGATGCTCCC	
	ATATGACACCACTGATCCAAGTTATGGTCTATT	CTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACC	
	CTGGTACAAGCAGCCAGCAGTGGGGAAATGA	AACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCCTCA	
	TTTTTCTATTATCAGGGGTCTTATGACCAGCA	TTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAA	
	AAATGCAACAGAAGGTCGCTACTCATTGAATTT	GGAAACATTCTTGAACGATTCTCCGCACAACAG	
	CCAGAAGGCAAGAAAATCCGCCAACCTTGTCAT	TTCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGCT	
	CTCCGCTTCACAACTGGGGGACTCAGCAATGTA	CTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTCT	
	CTTCTGTGCAATGAGAGATAGGAACACCGGTA	GTGCCAGCAGCGTAGAGGTTTACAATGAGCAG	
	ACCAGTTCTATTTGGGACAGGGACAAGTTTGA	TTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA	
	CGGTCATTCCAA (配列番号 2 1 3)	(配列番号 2 1 4)	

[0182] 図 6 1 は、ヒトHLA遺伝子導入マウスを用いたペプチド反応性TCR遺伝子の同定を示す。

図 6 1 のA. およびBは、ヒトHLA遺伝子導入マウスへのペプチドワクチンとその脾臓におけるペプチド反応性の評価を示す。候補となるがん抗原由来ペプチド 50ugをアジュバントとしてpolyI:CLCと混合し、マウスの尾根部皮内

に1週おきに3回投与を行った。その後、脾臓を摘出し、*in vitro*でワクチンに用いたペプチドを添加し、20時間培養し、抗原特異的IFN- γ 産生をELISPOT法により検出した。

[0183] 図61のCは、ペプチド反応性TCR遺伝子の単離とレポーターアッセイによる抗原反応性の評価を示す。ワクチンを行ったマウスの脾臓を抗原ペプチドならびに抗CD107a抗体存在かで、4時間培養し、脱顆粒を起こした細胞(CD107a陽性細胞)を、単一細胞ソーティングし96 wellプレートに回収した。回収した細胞から、逆転写およびTCR特異的プライマーを用いて、TCR遺伝子を増幅し、それぞれのTCR遺伝子を組み込んだTAPフラグフラグメントを構築した。構築した各TCR遺伝子のTAPフラグメントと、NFAT転写因子反応性ルシフェラーゼ発現ベクターをJurkat細胞に遺伝子導入した。16時間培養後、遺伝子導入したJurkat細胞と抗原ペプチドを外来性に結合させたHLA-A24発現COS-7細胞を共培養し、再構築したTCRからの刺激依存的なルシフェラーゼの発現をルシフェラーゼアッセイにて測定した。図は、富山大学の浜名らの論文より抜粋した(Biochem Biophys Res Commun, 2016, 10;474(4):709-714.)。

[0184] 図61のDは、ヒトHLA遺伝子導入マウスより単離したEPHB4ペプチド反応性TCRの反応性評価を示す。作製したTCR発現Jurkat細胞を用いてEPHB4由来ペプチドに対する反応性をルシフェラーゼ活性(RLU)として示した。陽性コントロールとして、既知のNY-ESO-1ペプチド特異的TCR(1G4 TCR)を用いた。EPHB4ペプチドを結合させたCos-7細胞と共培養した場合を白(□)で、NY-ESO-1ペプチドを結合させたCos-7細胞と共培養した場合を黒(■)で示した。

[0185] <結果>

これまでに、本課題では、ヒトHLA遺伝子導入マウスを用いることで、新規がん抗原関しても、ハイスループットにエピトープペプチドの同定が可能であることを示した。同様に、ヒトHLA遺伝子導入マウスを用いることで、新規がん抗原を認識するTCR遺伝子を同定可能か検討する目的で、EPHB4由来ペプチドをアジュバントと共にHLA-A24Tgマウスに繰り返し免疫し、ペプチド応答性CD8T細胞を誘導した後、脾臓より、シングル細胞ソーティングによりEPHB4

反応性TCR遺伝子の単離を行った。ワクチンしたマウスの脾細胞を、*in vitro*でペプチド存在下で再刺激し、脱顆粒を起こしCD107a陽性となったT細胞をソーティングにより回収した。これまでのT細胞クローンの樹立では、再度、フィーダー細胞存在下で培養しT細胞クローンを樹立してきたが、増殖が安定するには時間がかかり、必ずしもソーティングしたすべての細胞から樹立できるわけではない。そこで、富山大学の浜名らが開発した、ハイスループットのシングル細胞からのTCR遺伝子の検出ならびに機能評価法を導入した。浜名らの方法では、ソーティングした細胞を再培養するのではなく、直接PCR法によりTCR遺伝子を増幅単離し、ギブソンアッセムブリにより単離したTCR遺伝子を遺伝子発現プロモーターを含む直鎖DNAに連結し、TCR遺伝子発現ベクターを構築し、構築したTCR遺伝子発現ベクターをT細胞リンパ腫由来のJurkat細胞株に遺伝子導入しTCR分子を再構築し、その反応性を評価する。培養を行わないことで、短期間にソーティングした細胞をロストすることなく、評価が可能である。ソーティングによりワクチンしたマウスの脾細胞より単離したCD107a陽性T細胞、39個のうち、21細胞について、そのTCR遺伝子を同定することができ、同じTCR遺伝子を省いた8つのT細胞のTCR遺伝子を再構築し、その抗原反応性を評価した。TCRを再構築したJurkat細胞株には、あらかじめTCRシグナル下流で活性化する転写因子NFATによりルシフェラーゼ遺伝子発現が誘導されるレポーター遺伝子が組み込まれており、再構築したTCR分子が抗原を認識した場合、その活性化シグナルの強さに依存したルシフェリンルシフェラーゼ反応による発光を測定することで、反応性を定量的に評価することができる。EPHB4由来ペプチドまたは、NY-ESO-1由来ペプチド存在下で、TCRを再構築したJurkat細胞の反応性を評価したところ、8つのTCR遺伝子のうち7つで、EPHB4ペプチドに対する反応性が認められ、TCR_07遺伝子では最も強い抗原特異的反応性を確認することができた。表に、各クローンから単離したアミノ酸配列ならびにTCR遺伝子の遺伝子配列を示した。

[表10]

表10: EPHB4由来ペプチド(RLNDGQFTV)を認識するHLA-A2拘束性T細胞受容体のアミノ酸配列

C	SequenCe TRA	SequenCe TRB	T	T
I			R	R
o			A	B
n			(	(
e			b	b
			p	p
			)	)
5	Not Determined	MRVRLISAVVLCFLGTGLVDMKVTQMPRYLIK		1
,		MGENVLLECGQDMSHETMYWYRQDPGLGLQL	-	3
6		IYISYDVDSNSEGDIPKGYRVSRRKKREHFSLILDSA		3
		KTNQTSVYFCASSPRQTNTEVFFGKGTRLTVE		
		(配列番号215)		
4		MNTKITQSPRYLILGRANKSLECEQHLGHNAMEY	1	1
,	MKTVTGPLFLCFWLQLNCVSRGEQVEQRPPHLS	WYKQSAEKPELMFLYNLKLIRNETVPSRFIPEC	3	1
7	VREGDSAFICTYTDSATAYFYWKQEPGAGLQL	PDSSKLLHISAVDPEDSAVYFCASSQLGSSAETLY	2	5
,	LMSVFSNVDRKEEQGLTVLLNKDKRLSLNLTA	FGSGTRLTVE (配列番号217)		
3	HPGDSAVYFCAVGNSNNRIFFGDGTQLVVKP			
4	(配列番号216)			
3	MRPVTCSVLVLLMLRRSNGDSVTQTEGLVTVT	MGSRLFLVLSLLCTKHMEAAVTQSPRNKVTVTG	1	1
5	EGLPVKLNCTYQTTYLTIAFFWYVQYLNEAPQVL	GNVTLSQRQTNSHNYMYWYRQDTGHGLRLIHY	3	3
,	LKSSTDNKRTEHQGFHATLHKSSSFHLQKSSAQ	SYGAGNLQIGDVPDGYKATRTTQEDFFLLELAS	2	2
3	LSDSALYYCALSDYSNNRLTLGKGTQVVLP (配	PSQTSLYFCASSDLGGYNSPLYAAGTRLTVE		
7	列番号218)	(配列番号219)		

[0187]

[表11]

表 11 : EPHB4由来ペプチド (RLNDGQFTV) を認識するHLA-A2拘束性T細胞受容体の遺伝子配列

C	SequenCe TRA	SequenCe TRB	T	T
I			R	R
O			A	B
N			(	(
E			b	b
			p	p
			)	)
5	Not Determined	ATGAACACTAAAATTACTCAGTCACCAAGATAT	3	
,		CTAATCCTGGGAAGAGCAAATAAGTCTTTGGA	- 4	
6		ATGTGAGCAACATCTGGGACATAATGCTATGTA	4	
		CTGGTATAAACAGAGCGCTGAGAAGCCGCCAG		
		AGCTCATGTTTCTCTACAATCTTAAACAGTTGAT		
		TCGAAATGAGACGGTGCCCGAGTCGTTTTATACC		
		TGAATGCCCGAGACAGCTCCAAGCTACTTTTACA		
		TATATCTGCCGTGGATCCAGAAGACTCAGCTGT		
		CTATTTTGTGCCAGCAGCCAACTGGGGTCTAG		
		TGCAGAAACGCTGTATTTTGGCTCAGGAACCAG		
		ACTGACTGTTCTCG (配列番号220)		
4	ATGCGTCCTGTACCTGCTCAGTTCTCGTGCTCC	ATGGGCTCCAGGCTCTTCTGGTCTTGAGCCTC	3	3
,	TCCTAATGCTCAGAAGGAGCAATGGAGACTCC	CTGTGTACAAAACACATGGAGGCTGCAGTCAC	9	9
7	GTGACCCAGACAGAAGGCCTGGTCACTGTCAC	CCAAAGCCCTAGAAACAAGGTGACAGTAACAG	7	4
,	CGAGGGGTTGCCTGTGAAGCTGAACTGCACCT	GAGGAAACGTGACATTGAGCTGTCGCCAGACT		
3	ATCAGACTACTTATTTAACTATTGCCTTTTCTG	AATAGCCACAACACTACATGTACTGGTATCGGCAG		
4	GTATGTGCAATATCTCAACGAAGCCCCTCAGGT	GACACTGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTA		
	ACTCCTGAAGAGCTCCACAGACAACAAGAGGA	CTCATATGGTGCTGGCAACCTTCAAATAGGAGA		
	CCGAGCACCAAGGGTTCCACGCCACTCTCCATA	TGTCCTGATGGGTACAAGGCCACCAGAACAA		
	AGAGCAGCAGCTCCTCCATCTGCAGAAGTCCT	CGCAAGAAGACTTCTCCTCCTGCTGGAATTGG		
	CAGCGCAGCTGTCAGACTCTGCCCTGTACTACT	CTTCTCCCTCTCAGACATCTTTGACTTCTGTGCC		
	GTGCTCTGAGTGACTACAGCAACAACAGACTTA	AGCAGTGATCTGGGGGGCTATAATTCGCCCTC		

	CTTTGGGGAAGGGAACCCAGGTGGTGGTGTTA CCAA (配列番号221)	TACTTTGCGGCAGGCACCCGGCTCACTGTGACA G (配列番号222)		
3	ATGCGTCCTGACACCTGCTCAGTTCTTGTGCTCC	ATGAGAGTTAGGCTCATCTCTGCTGTGGTGCTG	3	3
5	TCTTAATGCTCAGAAGGAACAATGGAGACTCTG	TGTTTCCTAGGAACAGGCCTTGTGGACATGAAA	9	9
,	TGACCCAGACAGAAGGCCTGGTCACTCTCACCG	GTAACCCAGATGCCAAGATACCTGATCAAAAG	7	7
3	AGGGGTTGCCTGTGATGCTGAACTGCACCTATC	AATGGGAGAGAATGTTTTGCTGGAATGTGGAC		
7	AGAGTACTTACTCACCTTTCCTTTCTGGTATGT	AGGACATGAGCCATGAAACAATGTACTGGTAT		
	GCAACATCTCAACGAAGCCCCTAAGCTACTTTT	CGACAAGACCCTGGTCTGGGGCTACAGCTGAT		
	GAAGAGCTTCACAGACAACAAGAGGCCCGAGC	TTATATCTCATACGATGTTGATAGTAACAGCGA		
	ACCAAGGGTTCACGCCACTCTCCATAAGAGCA	AGGAGACATCCCTAAAGGATACAGGGTCTCAC		
	GCAGCTCCTTCATCTGCAGAAGTCCTCAGCGC	GGAAGAAGCGGGAGCATTTCTCCCTGATTCTG		
	AGCTGTCAGACTCTGCCCTGTACTACTGTGCTTT	GATTCTGCTAAAACAAACCAGACATCTGTGTAC		
	GAGTGATCGGTCGGGAAATGAGAAAATAACTT	TTCTGTGCTAGCAGTCCAAGACAAACAAACACA		
	TTGGGGCTGGAACCAAACCTACCATTAAACCCA (配列番号223)	GAAGTCTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACA GTTGTAG (配列番号224)		

[0188] 図62は、エレクトロポレーション法による共通がん抗原 (FOXMI) を認識するTCR-T細胞の作製を示す。

図62のAは、エレクトロポレーション法によるTCR-T細胞作製。末梢血単核球を抗CD3抗体とIL2存在下で培養した後、TCRの定常領域に特異的なsgRNAをCas9タンパク質と共にエレクトロポレーション法により導入し、内在性TCRの欠損したT細胞(TCR DK0 donor cells)を作製した。培養した後、続いて、TCR α 鎖遺伝子とTCR β 鎖遺伝子をP2A配列で連結した一本鎖TCR遺伝子のmRNAをエレクトロポレーション法により導入し、TCR-T細胞を作製した。

[0189] 図62のBは、作製したTCR-T細胞の細胞表面におけるTCR分子の発現を示す。作製したTCR-T細胞を抗CD3抗体ならびに抗TCR $\alpha\beta$ 抗体で染色し、細胞表面におけるTCR分子の発現を評価した。ヒストグラムに、それぞれCD3およびTCR $\alpha\beta$ 分子の細胞表面における発現を示した(赤: TCR-T細胞、青: Donor cells)。

[0190] 図62のCは、作製したTCR-T細胞の抗原刺激によるIFN- γ 産生を示す

。作製したTCR-T細胞を外来性のがん抗原ペプチド(F0XM1 pep.)を結合させたT2-A24細胞と20時間共培養し、IFN- γ 産生をELISPOT法にて検出した。

[0191] <結果>

同定したがん抗原反応性TCR遺伝子を再構築したTCR-T細胞の構築を行った。本課題では、TCRの α 鎖と β 鎖をP2A配列を介して連結した人工一本鎖TCR遺伝子を合成し合成した人工遺伝子よりin vitro転写により作製したTCR mRNAを、エレクトロポレーション法により、抗CD3抗体で刺激培養した末梢血由来CD8陽性T細胞に導入した。また、内因性TCR分子をあらかじめCRISPR-Cas9システムによりノックアウトすることで、外来性に導入、再構築したTCR分子のみが細胞表面に高効率で発現する。これまでに同定したF0XM1特異的TCR遺伝子について検討を行ったところ、F5, (21)1D5ならびに1F5クローンのいずれのTCRも細胞表面に高発現することを確認した。また、作製したTCR-T細胞の抗原反応性をIFN- γ 産生を指標に評価したところ、期待通り、どのTCR-T細胞もF0XM1由来ペプチドに対して強い反応性を示した。1F5クローンのTCRは、発現は十分であるが、その他の2つに比較し反応性が低く、(21)1D5が最も高い反応性を示したいことから、これらのF0XM1反応性TCRのうち(21)1D5クローンのTCR遺伝子が最も有望であることがわかった。今後、このような方法で、取得したTCR遺伝子の抗原特異性や、TCR-T細胞療法での有用性を評価する。

[0192] 図63は、がんの多様性を克服するカクテルTCR-T細胞の開発スキームを示す。10種類のがん抗原のエピトープペプチドのライブラリを構築し、それらのペプチドを用いたがんワクチンを受けたがん患者の末梢血や、ペプチドを繰り返しワクチンしたヒトHLA遺伝子導入マウスからと、それらのペプチドを特異的に認識するHLA-A2またはA24拘束性TCR遺伝子を単離し、がん抗原特異的TCRライブラリを構築する。各がん抗原の発現をスクリーニングし、ペプチドワクチンに対する反応性をテストした後、複数のがん抗原ペプチドに対し、それぞれ特異的なTCR遺伝子を選択しTCR-T細胞を作製する。作製した複数のがん抗原特異的TCR-T細胞を、混合し”カクテルTCR-T細胞“製剤として投

与することで、がんの多様性に対して有効なT細胞療法が確立できる。

[0193] <結果>

10種類のがん抗原のエピトープペプチドを同定しがん抗原ペプチドライブラリを構築することでオフザシェルフのがんペプチドワクチンが可能となるばかりでなく、同時にそれらのペプチドを認識する強力なTCRを同定しがん抗原特異的TCRライブラリを作製することで、複数のがん抗原を標的としたがんの多様性による免疫回避を打破する”カクテルTCR-T細胞“療法が実現可能となる。

[0194] 実施例 1 2：膜タンパク共通がん抗原を標的とするCAR-T細胞療法、カクテルCAR-T細胞療法の開発

<方法>

図 6 4 (a) CAR-T細胞のin vitroにおける細胞傷害性評価には横紋筋肉腫細胞株Rh30と肝内胆管癌細胞株SSP25をターゲット細胞として使用した。細胞株に10 μ g/ml 濃度のCalcein-AM (Dojindo)を添加し、37℃で30分間静置して染色した。エフェクター細胞となる EPHB4 CAR-T細胞と染色したターゲット細胞を、96well Half Area, Flat Bottom プレート(Corning)内で、E/T = 1、E/T = 3、E/T = 10、あるいはE/T = 30の割合で 4-6 時間共培養し、培養前と培養後の蛍光値を Terascan VPC2(Minerva Tech) を用いて測定した。Calceinの自然遊離は、不活化 PBMC (80℃に設定したヒートブロックで 15 分以上加熱) をエフェクター細胞の代わりに共培養した。同様に最大遊離は、不活化PBMCにIGEPAL CA-630(MP Biomedicals) (NonidetP-40同等物質) を6%の濃度で加えたものを使用した。細胞傷害率は、以下の計算方法で算出した。

傷害率(%)=(実験群の遊離量－実験群の自然遊離量)/(実験群の最大遊離量－実験群の自然遊離)×100

(b) GPC3 CAR-T細胞は作製したGPC3 CAR $\gamma\delta$ T細胞をエフェクター細胞として使用した。この細胞は中外・ロシュグループが開発したGPC3に対する特異的な抗体GPC3由来のCARを発現させるレトロウイルスベクターを使用し、ゾレ

ドロン酸刺激培養6日目の健常人PBMCにCARを導入し、陽性細胞のシングルセルソーティングにより、CAR発現Vg9陽性 $\gamma\delta$ T細胞のクローンを作製した。ターゲット細胞にはGPC3を発現しない肝癌細胞株SK-Hep-1細胞株にヒトGPC3全長配列遺伝子(hGPC3)を強制発現した細胞株SK/hGPC3、ネガティブコントロールとしてemptyベクターで形質転換を行った細胞株(SK/vec)を用いた。ターゲット細胞のCalcein染色、傷害率の算出は上述と同様の方法で行った。

(c) (a), (b)同様の方法で細胞を染色し、計測を行った。ターゲット細胞として免疫不全マウスにて維持・腫大させたPDXを摘出し、組織を剪刀で可能な限り裁断後Tumor Dissociation Kit, human (Miltenyi Biotec) で分散させた後、赤血球の除去処理を行い使用した。

(d) (c)と同様に調整したPDX由来細胞とEPHB4 CAR-T細胞もしくは予めPHA刺激で活性化させたblast細胞を共培養後、CD8陽性細胞中のCD107a陽性細胞をフローサイトメトリー解析した。

[0195] 図65(a) PDXモデルはSCID/Beigeマウス(大腸がん肝転移PDX)、及びNSGマウス(頭頸部がんPDXモデル)に5mm角に調整した各PDXを移植し作製した。腫瘍の大きさはノギスを使用し、長径並びに短径を計測し面積(b)もしくは体積(d)として算出した。(c), (e)免疫組織学的解析は前述に倣ってFFPE薄切標本作製した。端的に、各臓器採材後、4%PFAに18-24h浸透後、PFAをPBS(-)で洗浄。70%エタノールに一晩以上浸透後、パラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。ブロックを4 μ mに薄切後スライドガラスに貼り付け、乾燥後、各染色を行った。DAB染色は一次抗体に適したポリマー試薬(ポリマー試薬: EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-RabbitもしくはEnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse)並びに、発色試薬(Liquid DAB+ Substrate Chromogen System)を使用した。ヘマトキシリンでの対比染色を行った後、標本はNanoZoomer (Hamamatsu Photonics K.K.)によりバーチャルスライド化した。多重蛍光免疫組織化学染色も上記方法に準じ、各抗原に対する抗体EPHB4 (Cell Signaling Technology社)、ヒトCD8 (Leica Biosystems社)、CD3 (abcam社)、Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Techno

logy社)、二次抗体としてポリマー試薬 (EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-RabbitもしくはEnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse)、蛍光色素にOpal 520, 540, 570, 620, 650, 690(AKOYA BIOSCIENCES社)を使用しVectra3(PerkinElmer)で観察した。

[0196] <結果>

図64は、CAR-T細胞によるin vitro 細胞傷害性評価を示す。

(a) EPHB4 CAR-T細胞によるEPHB4陽性腫瘍細胞株の細胞傷害。EPHB4を発現する横紋筋肉腫細胞株 (Rh30) と肝内胆管癌細胞株 (SSP25) のいずれに対してもE:T比依存的に細胞傷害性が上がることが確認された。

(b) GPC3 CAR-Tによる細胞傷害性の評価。GPC3 CAR-T細胞はヒトGPC3全長配列遺伝子(hGPC3)を強制発現した細胞株SK/hGPC3に対し、E:T比依存的に細胞傷害性が上がった。

(c) EPHB4 CAR-T細胞によるEPHB4陽性PDX細胞の細胞傷害。EPHB4 CAR-T細胞をエフェクター細胞、PDX細胞をターゲット細胞とし、各E:T比で8時間反応後の細胞傷害率を比較した。E:T比を上げることで細胞傷害率が上がり、E/T = 10のとき最も強い細胞傷害率を示した。右側のパネルはE/T = 10のときの検鏡写真を表す。

(d) EPHB4 CAR-T細胞のEPHB4陽性PDX細胞による細胞傷害応答の確認。EPHB4 CAR-T細胞及びPHA刺激による活性化blast細胞をそれぞれEPHB4陽性PDX細胞と共培養し、抗原を認識し脱顆粒を示すCD107a分子の細胞表面への露出を測定した。EPHB4 CAR-T細胞においてのみCD107aの露出が認められたため抗原特異的に細胞傷害性活性が誘導されたことがわかった。

[0197] 図65は、CAR-T細胞によるin vivo 細胞傷害性評価を示す。

(a) EPHB4陽性PDX移植によるモデル動物の作製 (大腸がん肝転移・頭頸部がん)。各モデルPDX移植後7日にEPHB4 CAR-T細胞を移入し、更に翌日 (大腸がん肝転移モデル) /翌々日 (頭頸部がんモデル) に追加移入した。コントロール群は生理食塩水を移入した。

(b) 大腸がん肝転移PDXモデルの腫瘍サイズ (面積) の変化。CAR-T細胞移入群

で腫瘍の腫大が抑制された。(c)大腸がん肝転移PDXモデルのPDX領域におけるEPHB4の発現確認。CAR-T細胞移入後6日で腫瘍部(PDX)を採取後、FFPE薄切サンプルにてEPHB4の発現をDAB染色で確認。CAR-T細胞移入群でEPHB4の消失が認められた。(d)頭頸部がんPDXモデルの腫瘍サイズ(面積)の変化。CAR-T細胞移入群で腫瘍の腫大が抑制された。(e)頭頸部がんPDXモデルにおけるPDX領域の免疫組織学的解析。右下のパネル以外はDAB染色とヘマトキシリン染色による評価。CAR-T細胞移入群でhCD3, hCD8がday15でも確認でき、CAR-T細胞の存在が示唆された。また、移入群ではEPHB4の発現が消失しており、アポトーシスのマーカーである活性化型カスパーゼ3(C-Caspase3)の発現もコントロールと比較し、強く確認できた(上パネル)。左下パネルでは、hCD8が確認された領域でEPHB4の発現が低下しており、多重免疫組織染色を行った右下パネルでもC-Caspase3の発現が確認された(*部)

[0198] 図66は、カクテルCAR-T治療の開発を示す。

我々は5種類の膜蛋白共通がん抗原のいずれかがほとんどのがん組織に発現していることを利用し、複数のCAR分子を発現するカクテルCAR-T細胞を作製し、組み合わせや割合を最適化したカクテルCAR-T治療の開発を目指す。これにより、がんの不均一性や患者間の相違などの問題に対し多面的に対応することが出来、効果的・効率的ながんの増殖抑制やT細胞の浸潤などを誘導できる。

[0199] 実施例13：様々ながん細胞株における膜タンパク共通がん抗原の発現解析・膜タンパク共通がん抗原に対する抗体を利用した血中循環がん細胞検出によるがんの発症リスク診断法の開発

<方法>

肝細胞がん細胞株(HepG2, Hep3B, HuH-7, PLC/PRF/5, JHH-2, JHH-4, JHH-5, JHH-6, JHH-7), 肝内胆管がん細胞株(RBE, SSP-25), 大腸がん細胞株(HCT 116, Lovo, colo201, HT29, WiDr, SW480, CaC02), 膵がん細胞株(Panc1, As PC1, PK1, PK9), 肺がん細胞株(RERF-LC-AI, LK-2, II-18, A549, LU99, H19 75, Lu-135, NCI-H446), 乳がん細胞株(MDA-MB-231, MCF7), 子宮頸がん細胞

株(HeLa), 卵巣がん細胞株(KOC-7C, NOY1, NOY2, RMG-II, RMUG-S), 腎細胞がん細胞株(Caki-1, ACHN, RCC7), 悪性黒色腫細胞株(A375ml, SKmel23), 口腔がん細胞株(SAS, Ca9-22, HSC2, HSC3), 胃がん細胞株(MKN74, MKN45, KATO-3), リンパ腫細胞株(Raji, K562)を0.05% Trypsin-EDTAで剥がした後、FACS buffer (PBS+2%FCS)中でFc block (BD Biosciences, 10倍希釈)で20分間処理し、さらに、PE標識抗EpCAM抗体(Miltenyi, 100倍希釈)、PE標識抗Cell-Surface Vimentin (CSV)抗体(Abnova, clone:84-1, 100倍希釈)、APC標識抗ヒトGPC3抗体(Sino Biological, clone:024, 10倍希釈)、AF647標識抗ヒトROB01抗体(R&D, clone:770502, 50倍希釈)、AF647標識抗ヒトClaudin-1抗体(R&D, clone:421203, 25倍希釈)、AF647標識抗ヒトEphB4抗体(Miltenyi, clone:REA923, 50倍希釈)のそれぞれで20分間染色し、FACS Canto (BD Biosciences)で解析した。

[0200] <結果>

上記の結果を図67及び図68に示す。

肝細胞がん細胞株HepG2は、EpCAM、CSVに加えて、4種類の膜蛋白共通がん抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4の全てを発現していた。

様々ながん種由来の50種類の細胞株をこれらの抗原に対する抗体で染めたところ、従来のCTCマーカーであるEpCAMやCSVがほとんど発現していない7種類の細胞株は4種類の膜蛋白共通がん抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4のいずれかを細胞膜に発現していた。このことは、従来のCTCマーカーでは逃げていたCTCを、これら4種類の膜蛋白共通がん抗原の併用によって捉えられる可能性を示している。

[0201] <方法>

腫瘍摘出手術の3日後の肝細胞がん患者から、EDTA-2K採血管を用いて約5mLの末梢血を採取した。PBSに懸濁した肝細胞がん細胞株HepG2および大腸がん細胞株HCT116に、PBSで0.1ug/mLとしたCalcein-AM (DOJINDO)を1/2体積量加え、37℃で15分間標識させた。Calcein標識されたHepG2およびHCT116を 1×10^3 個ずつ、患者末梢血の半分に添加した。がん細胞株を添加した末梢血および

未添加末梢血に、3倍体積量のRBC lysis buffer (G BIOSCIENCES)を加え、室温で10分間溶血させた。残った細胞を1mLのMACS Buffer (PBS+0.5%BSA+2mM EDTA)に懸濁し、250uLのCD45 Dynabeadsと250uLのCD15 Dynabeadsを加えて4℃で1時間攪拌後、磁石によりCD45陽性細胞およびCD15陽性細胞を除去した。残った細胞を、PBSで1200倍希釈したzombie-NIRで室温15分染色後、FACS buffer中でFc block (BD Biosciences, 10倍希釈)で20分間処理し、さらに、PerCP標識抗CD45抗体(Miltenyi, 50倍希釈)、PE標識抗EpCAM抗体(Miltenyi, 100倍希釈)、PE標識抗Cell-Surface Vimentin (CSV)抗体(Abnova, 100倍希釈)、APC標識抗ヒトGPC3抗体(Sino Biological, 10倍希釈)、AF647標識抗ヒトROB01抗体(R&D, 50倍希釈)、AF647標識抗ヒトClaudin-1抗体(R&D, 50倍希釈)、AF647標識抗ヒトEphB4抗体(Miltenyi, 50倍希釈)、Hoechst33342(DOJINDO, 30ug/mL)で20分間染色し、FACS Melody (BD Biosciences)で解析した。

[0202] <結果>

上記の結果を図69に示す。

肝細胞がんや大腸がんの複数の症例で、切除手術の術前あるいは術後(1日目あるいは3日目)の採血検体5-10mL中に、従来のCTCマーカーであるEpCAMもCSVも発現せずに、4種類の膜蛋白質共通がん抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4のいずれかを細胞膜に発現しているCTC様細胞を検出できたことから、従来のCTCマーカーに加えてGPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4を加えることによってCTC様細胞の検出感度が増加することが示された。

請求の範囲

- [請求項1] (1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原；
(2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチド；
(3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞；または
(4) 前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNAを含む、がんワクチン。
- [請求項2] 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOXO1のうちの1種以上をさらに含む、請求項1に記載のがんワクチン。
- [請求項3] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、請求項1に記載のがんワクチン。
- [請求項4] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOXO1の全てを含む、請求項1に記載のがんワクチン。
- [請求項5] 前記部分ペプチドが、配列番号1から80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項1から4の何れか一項に記載のがんワクチン。
- [請求項6] (1) GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOXO1から選択される3種以上を含む共通がん抗原；
(2) 前記3種以上の共通がん抗原の部分ペプチドであってCTL誘導能を有する部分ペプチド；
(3) 前記部分ペプチドで刺激した樹状細胞；または
(4) 前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNA

を含む、がんワクチン。

- [請求項7] 配列番号5、7～10、14～22、24～38、40、42、48、49、52～80の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド。
- [請求項8] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)を有するT細胞の混合物を含む、CAR-T細胞療法剤。
- [請求項9] 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含む、請求項8に記載のCAR-T細胞療法剤。
- [請求項10] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、請求項8に記載のCAR-T細胞療法剤。
- [請求項11] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含む、請求項8に記載のCAR-T細胞療法剤。
- [請求項12] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に対するキメラ抗原受容体(CAR)を有するT細胞の混合物を含む、CAR-T細胞療法剤。
- [請求項13] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上を含む共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体(TCR)を有するT細胞の混合物を含む、TCR-T細胞療法剤。
- [請求項14] 前記共通がん抗原が、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上をさらに含む、請求項13に記載のTCR-T細胞療法剤。

- [請求項15] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全てを含む、請求項13に記載のTCR-T細胞療法剤。
- [請求項16] 前記共通がん抗原が、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全てを含む、請求項13に記載のTCR-T細胞療法剤。
- [請求項17] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの3種以上を含む共通がん抗原由来のMHCクラスI結合性抗原ペプチドを認識できるT細胞受容体（TCR）を有するT細胞の混合物を含む、TCR-T細胞療法薬。
- [請求項18] T細胞受容体（TCR）が、
配列番号103のタンパク質と配列番号104のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号105のタンパク質と配列番号106のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号107のタンパク質と配列番号108のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号109のタンパク質と配列番号110のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号111のタンパク質と配列番号112のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号123のタンパク質と配列番号124のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号125のタンパク質と配列番号126のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号127のタンパク質と配列番号128のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 2 9 又は 1 3 0 のタンパク質と配列番号 1 3 1 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 2 のタンパク質と配列番号 1 3 3 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 4 のタンパク質と配列番号 1 3 5 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 6 のタンパク質と配列番号 1 3 7 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 8 又は 1 3 9 のタンパク質と配列番号 1 4 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 1 のタンパク質と配列番号 1 4 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 3 のタンパク質と配列番号 1 4 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 5 のタンパク質と配列番号 1 4 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 7 のタンパク質と配列番号 1 4 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 7 のタンパク質と配列番号 1 7 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 9 のタンパク質と配列番号 1 8 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 1 のタンパク質と配列番号 1 8 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 3 のタンパク質と配列番号 1 8 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 3 のタンパク質と配列番号 1 9 4 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 195 のタンパク質と配列番号 196 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 197 のタンパク質と配列番号 198 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 199 又は 200 のタンパク質と配列番号 201 のタンパク

質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 202 のタンパク質と配列番号 203 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 216 のタンパク質と配列番号 217 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；または

配列番号 218 のタンパク質と配列番号 219 のタンパク質との組み

合わせからなるヘテロダイマー；

の何れかである、請求項 13 から 17 の何れか一項に記載の TCR-T 細胞療法剤。

[請求項19] 配列番号 103～112、123～148、177～184、193～203、215～219 の何れかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

[請求項20] 配列番号 103 のタンパク質と配列番号 104 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 105 のタンパク質と配列番号 106 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 107 のタンパク質と配列番号 108 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 109 のタンパク質と配列番号 110 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；
配列番号 111 のタンパク質と配列番号 112 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 2 3 のタンパク質と配列番号 1 2 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 2 5 のタンパク質と配列番号 1 2 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 2 7 のタンパク質と配列番号 1 2 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 2 9 又は 1 3 0 のタンパク質と配列番号 1 3 1 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 2 のタンパク質と配列番号 1 3 3 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 4 のタンパク質と配列番号 1 3 5 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 6 のタンパク質と配列番号 1 3 7 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 3 8 又は 1 3 9 のタンパク質と配列番号 1 4 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 1 のタンパク質と配列番号 1 4 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 3 のタンパク質と配列番号 1 4 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 5 のタンパク質と配列番号 1 4 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 4 7 のタンパク質と配列番号 1 4 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 7 のタンパク質と配列番号 1 7 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 7 9 のタンパク質と配列番号 1 8 0 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 1 のタンパク質と配列番号 1 8 2 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 8 3 のタンパク質と配列番号 1 8 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 3 のタンパク質と配列番号 1 9 4 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 5 のタンパク質と配列番号 1 9 6 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 7 のタンパク質と配列番号 1 9 8 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 1 9 9 又は 2 0 0 のタンパク質と配列番号 2 0 1 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 2 0 2 のタンパク質と配列番号 2 0 3 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

配列番号 2 1 6 のタンパク質と配列番号 2 1 7 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；または

配列番号 2 1 8 のタンパク質と配列番号 2 1 9 のタンパク質との組み合わせからなるヘテロダイマー；

の何れかである、T細胞受容体（TCR）。

[請求項21] 配列番号 1 1 3～1 2 2、1 4 9～1 7 6、1 8 5～1 9 2、2 0 4～2 1 4、2 2 0～2 2 4 の何れかの塩基配列を有する遺伝子。

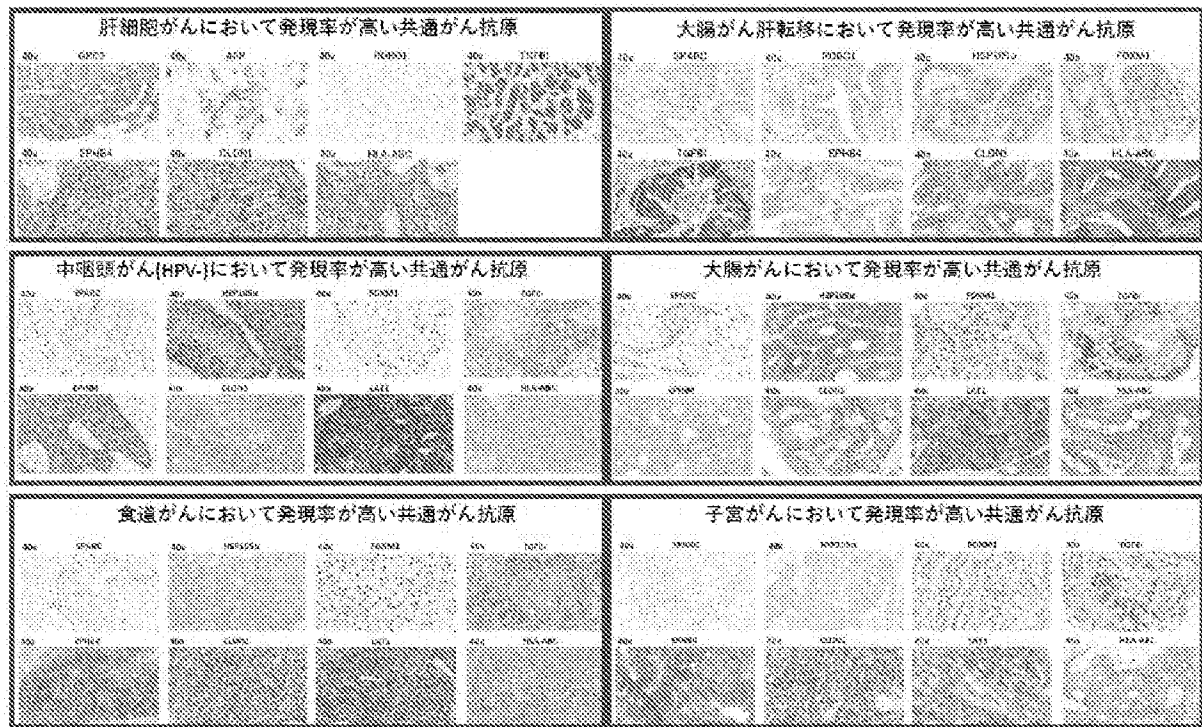
[請求項22] 対象者由来の試料におけるGPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上の発現の有無、およびHLA class Iの細胞膜発現を多重蛍光免疫染色により同時に測定する工程1、および上記発現の有無に基づいて、がんの免疫療法の適応を判定する工程2を含む、コンパニオン診断方法。

[請求項23] 工程1において、さらにAFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOXO1のうちの1種以上の発現の有無を測定する

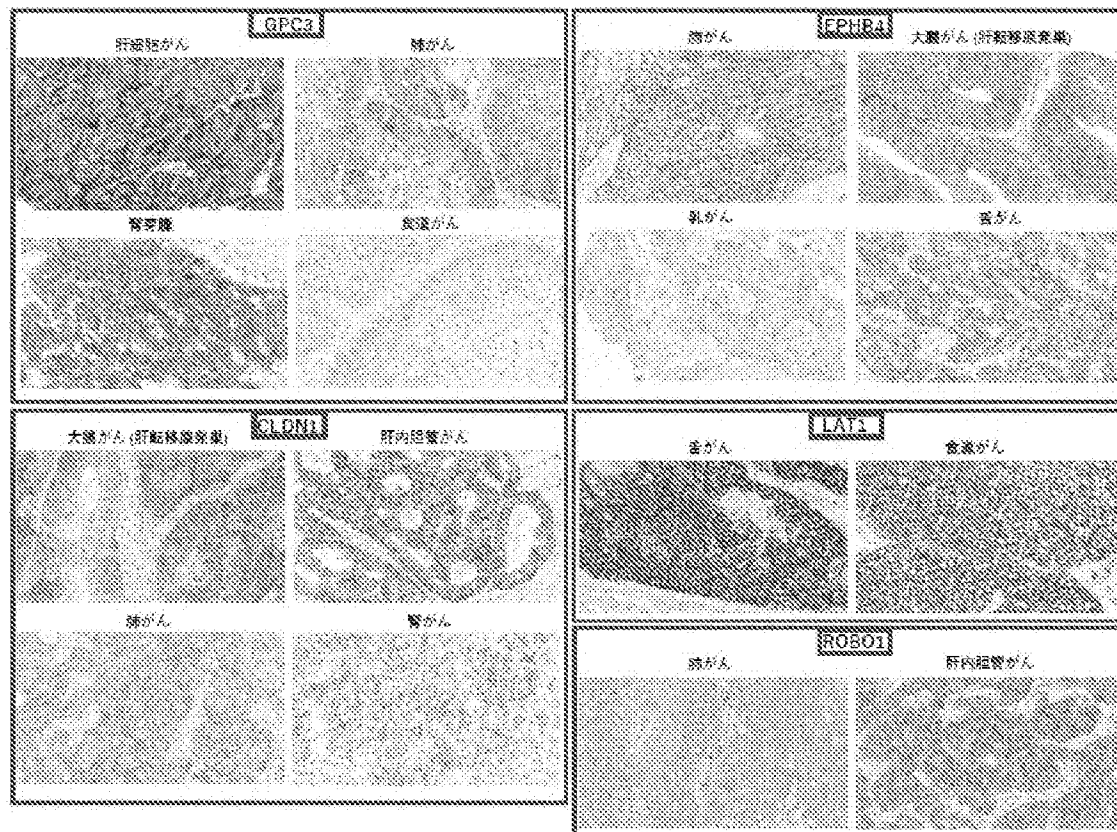
、請求項22に記載のコンパニオン診断方法。

- [請求項24] 工程1において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全ての発現の有無を測定する、請求項22に記載のコンパニオン診断方法。
- [請求項25] 工程1において、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全ての発現の有無を測定する、請求項22に記載のコンパニオン診断方法。
- [請求項26] 対象者由来の血液試料における細胞について、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1のうちの3種以上の発現を分析することを含む、がんの発症リスクの診断方法。
- [請求項27] さらにAFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1のうちの1種以上の発現を分析することを含む、請求項26に記載のがんの発症リスクの診断方法。
- [請求項28] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1の全ての発現を分析する、請求項26に記載のがんの発症リスクの診断方法。
- [請求項29] GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 、およびFOX M1の全ての発現を分析する、請求項26に記載のがんの発症リスクの診断方法。

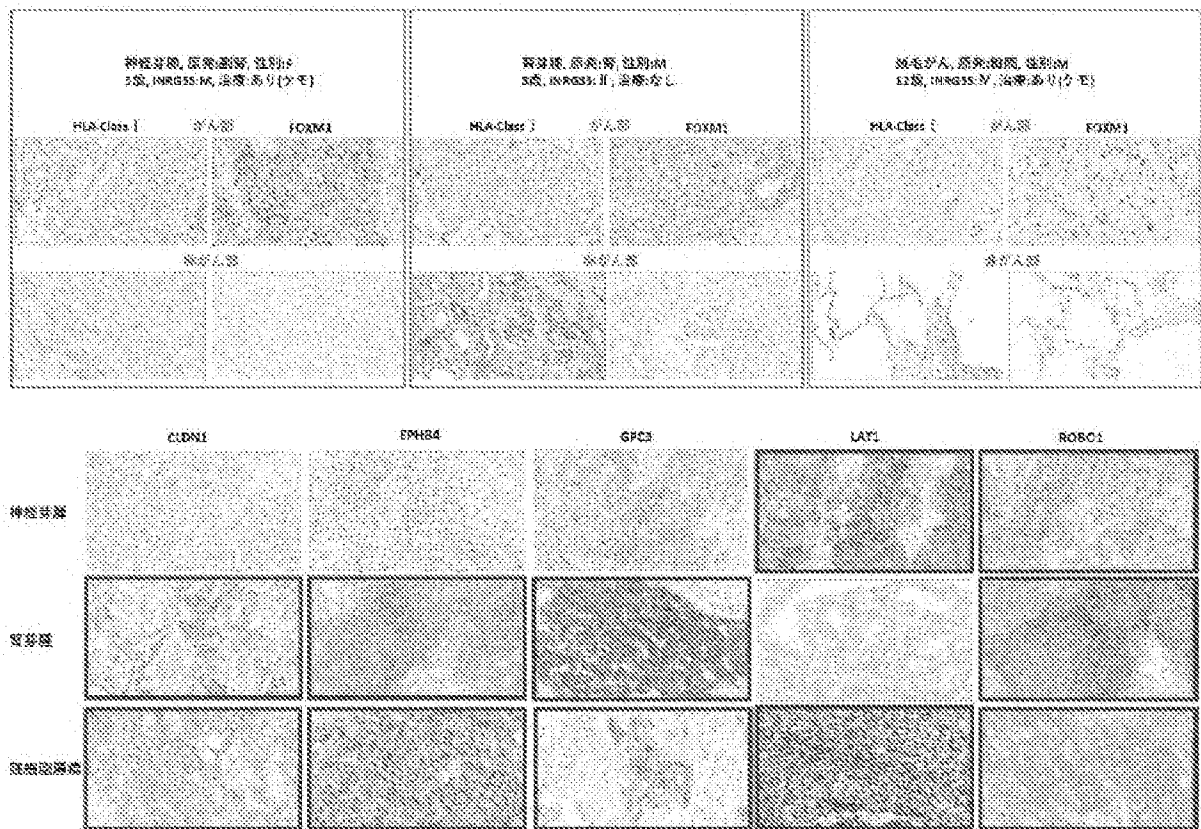
[図1]



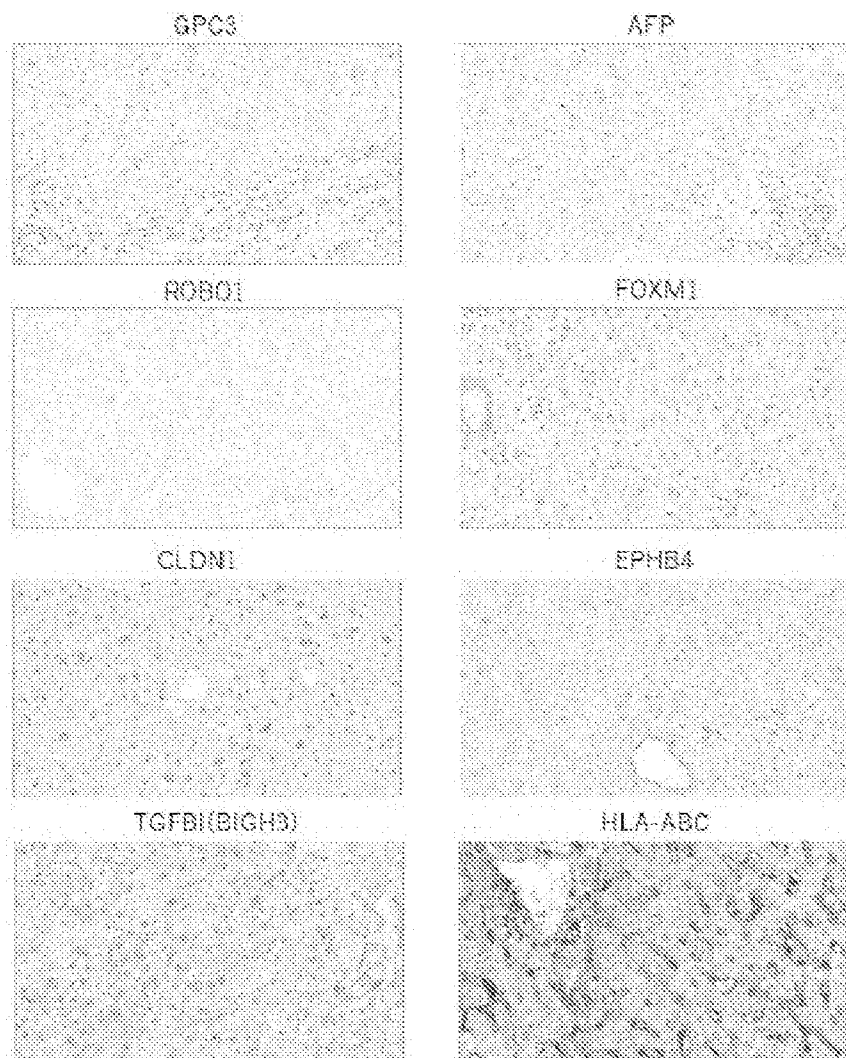
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

**BioChain社製ヒト正常組織マイクロアレイによる
細胞膜発現型共通がん抗原の正常組織発現一覧**

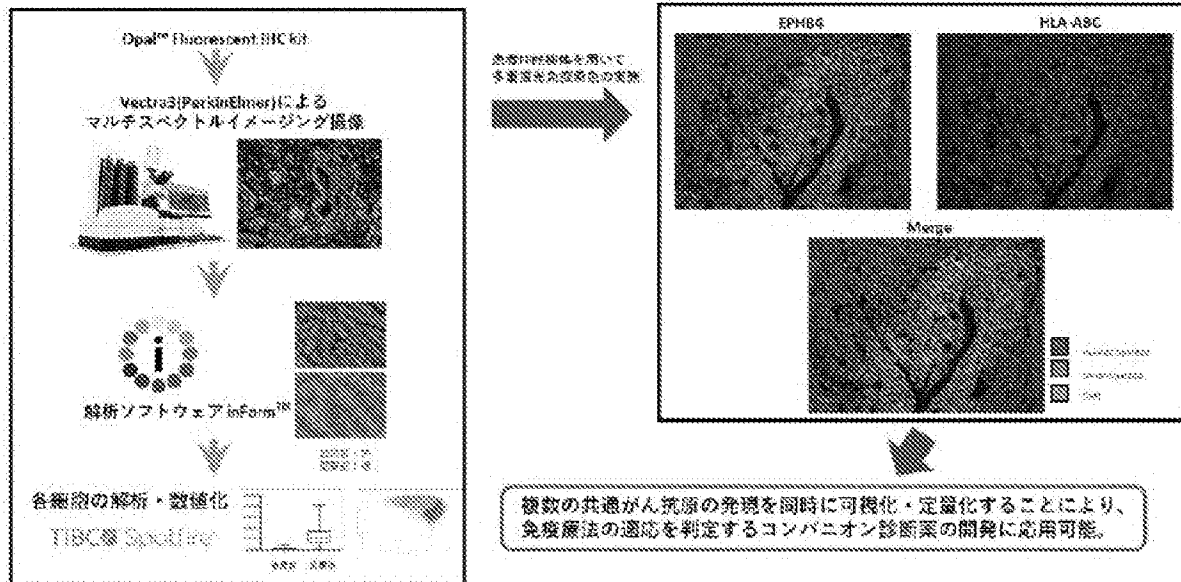
No.	臓器	GPC3	ROBO1	CLDN1	EPHB4	LAT1
1	胎盤	+	+	-	+	+
2	食道	-	-	-	-	+
3	直腸	-	-	-	+	?
4	胆嚢	-	+	-	+	?
5	皮膚	-	+	+	+	+
6	脂肪	-	-	-	-	-
7	心臓	-	-	-	-	-
8	骨格筋	-	-	-	-	-
9	膀胱	-	-	-	+	-
10	回腸	-	-	-	+	-
11	脾臓	-	-	-	+	-
12	脳	-	-	-	+	+
13	空腸	-	-	+	+	-
14	胃	-	-	-	+	-
15	乳房	-	-	-	+	?
16	腎臓	+	+	-	+	-
17	精巣	-	+	-	+	+
18	小脳	-	+	-	+	+
19	肝臓	-	-	-	-	-
20	胸腺	-	-	-	+	-
21	頸部	-	-	-	+	-
22	肺	-	-	-	-	-
23	平滑筋	-	-	-	-	-
24	結腸	-	-	-	+	-
25	卵巣	-	-	-	+	-
26	扁桃	-	+	-	-	+
27	横隔膜	-	-	-	-	-
28	膵臓	-	+	+	+	-
29	子宮	-	-	?	+	-
30	十二指腸	-	+	-	+	-
31	甲状腺	-	+	?	-	-

-: 明らかな陰性

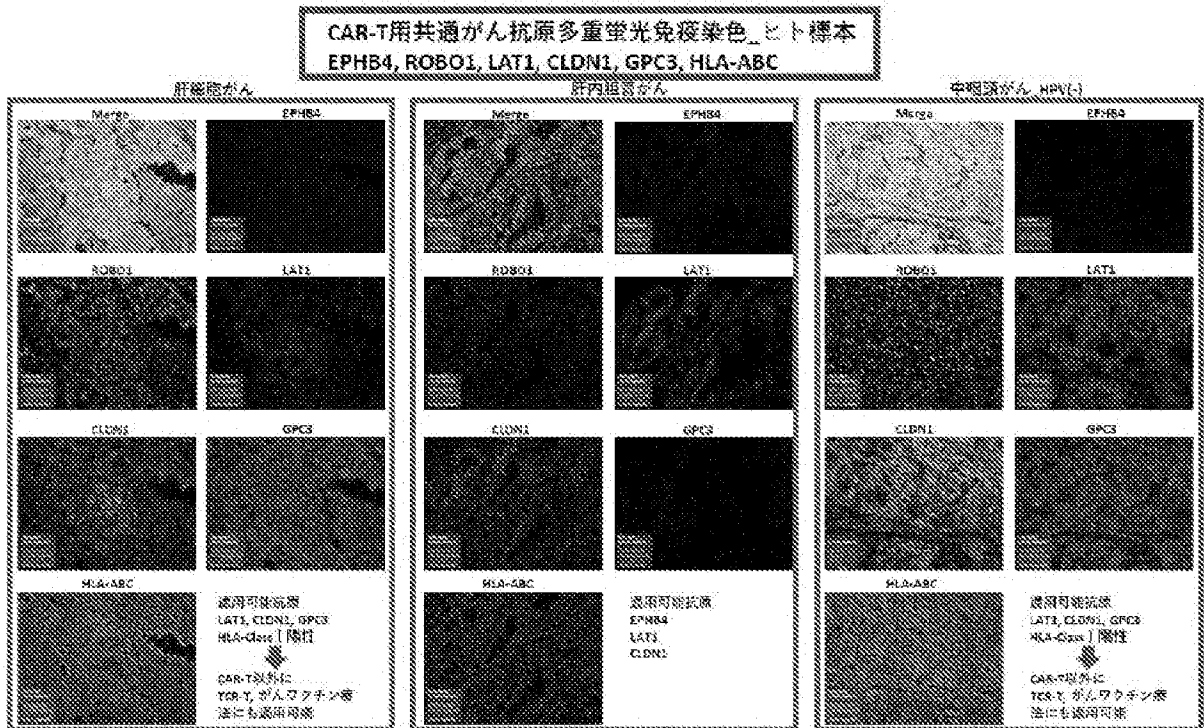
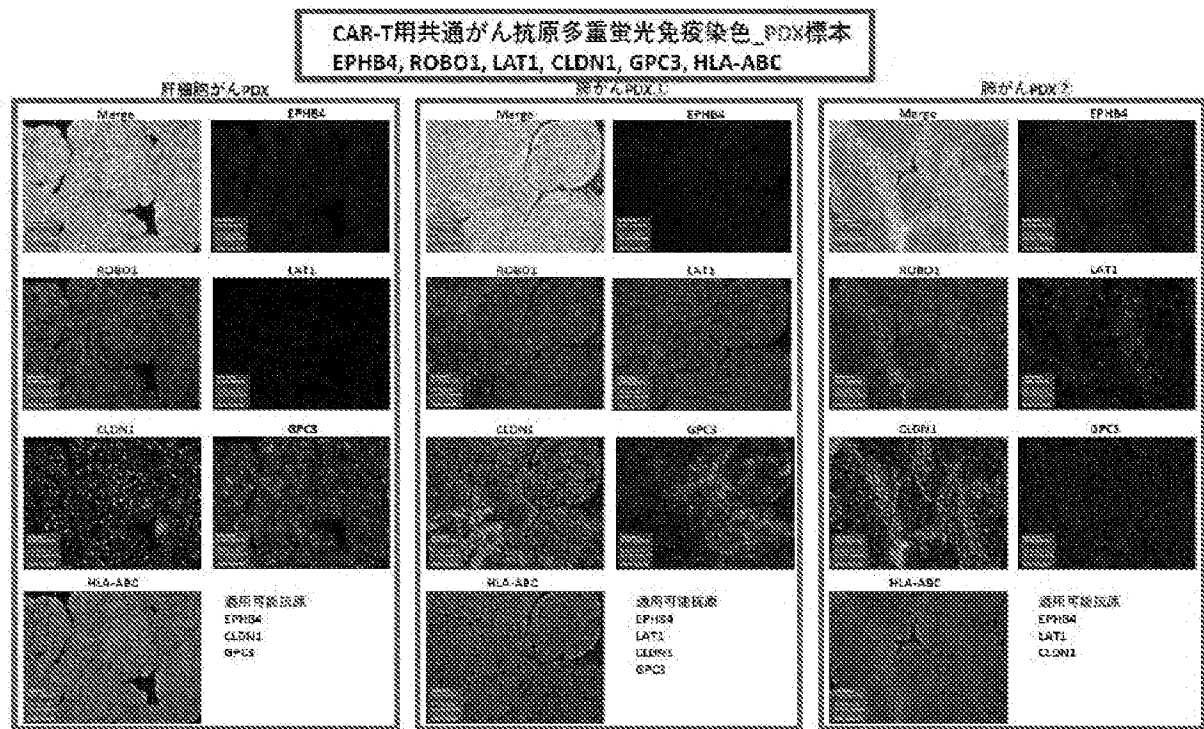
+: 何らかのシグナルを認める

?: 染色課程での脱離のため発現は不明

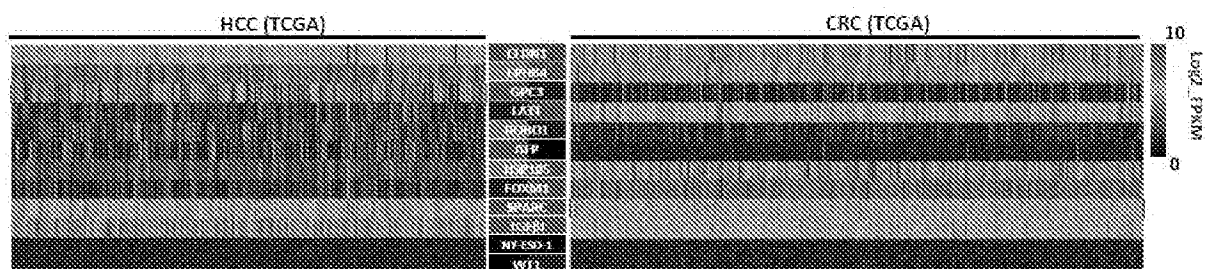
[図6]



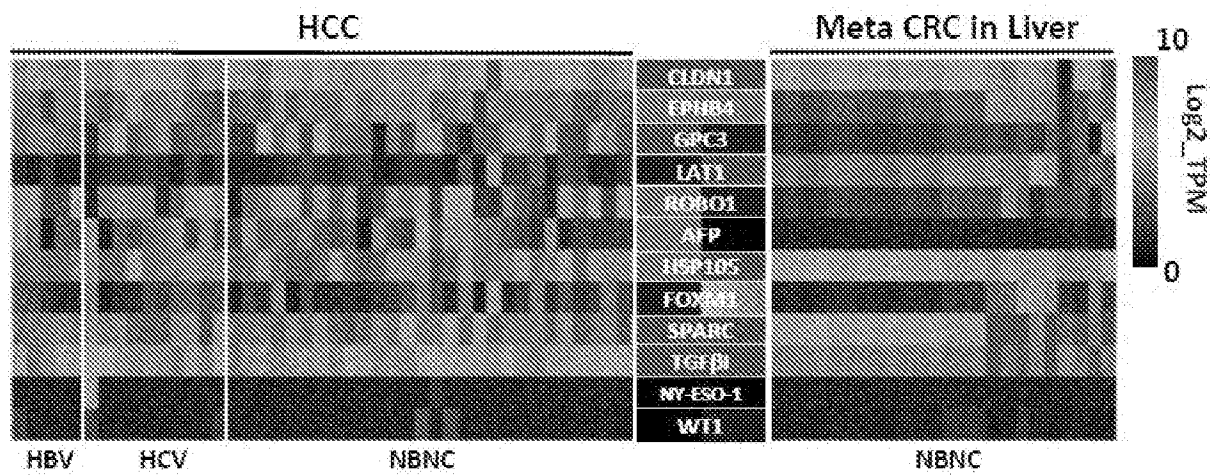
[図7]



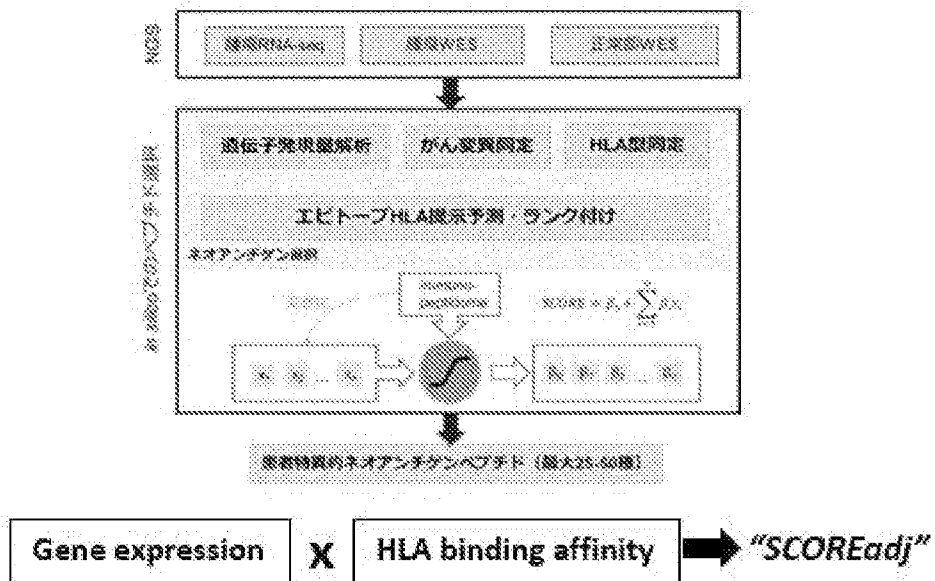
[図8]



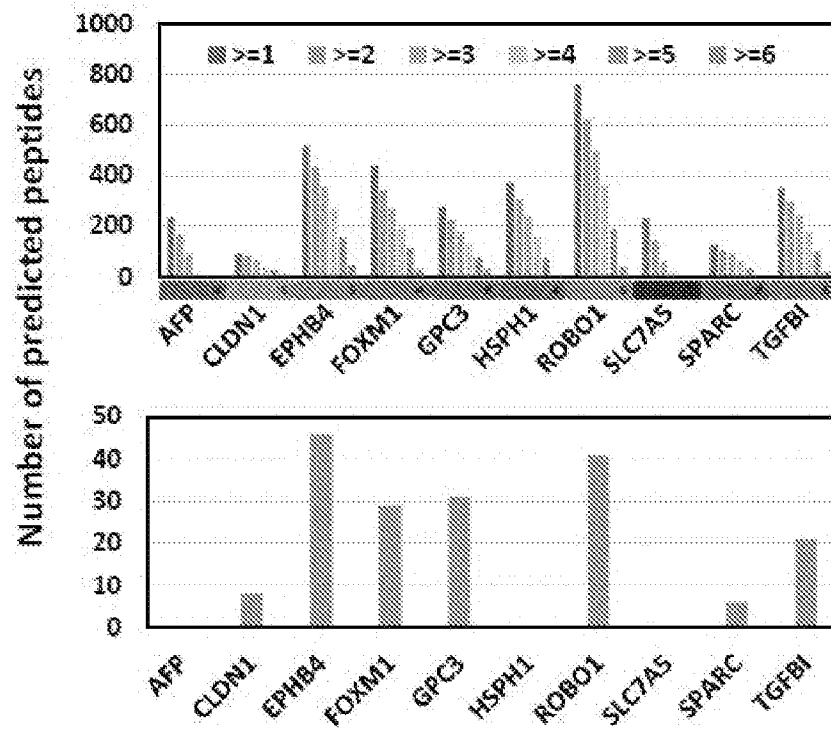
[図9]



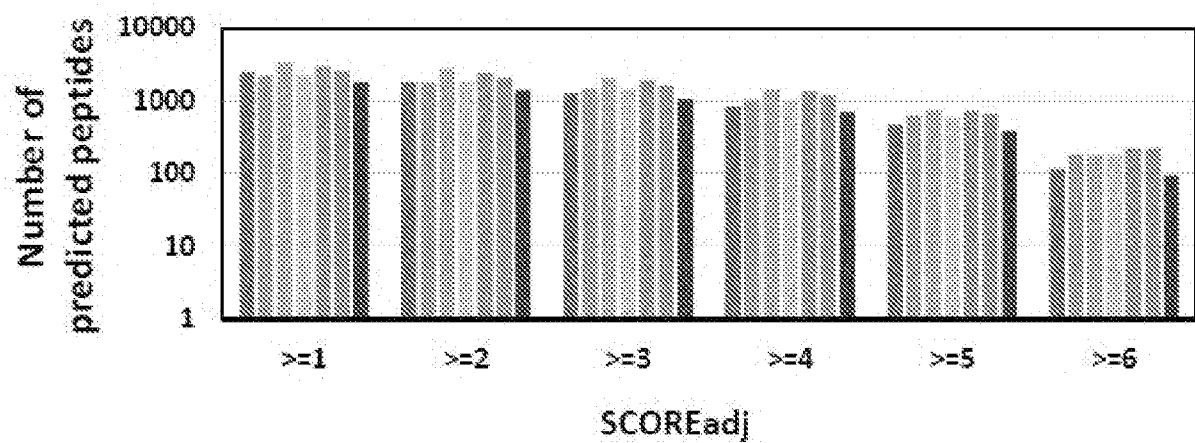
[図10]



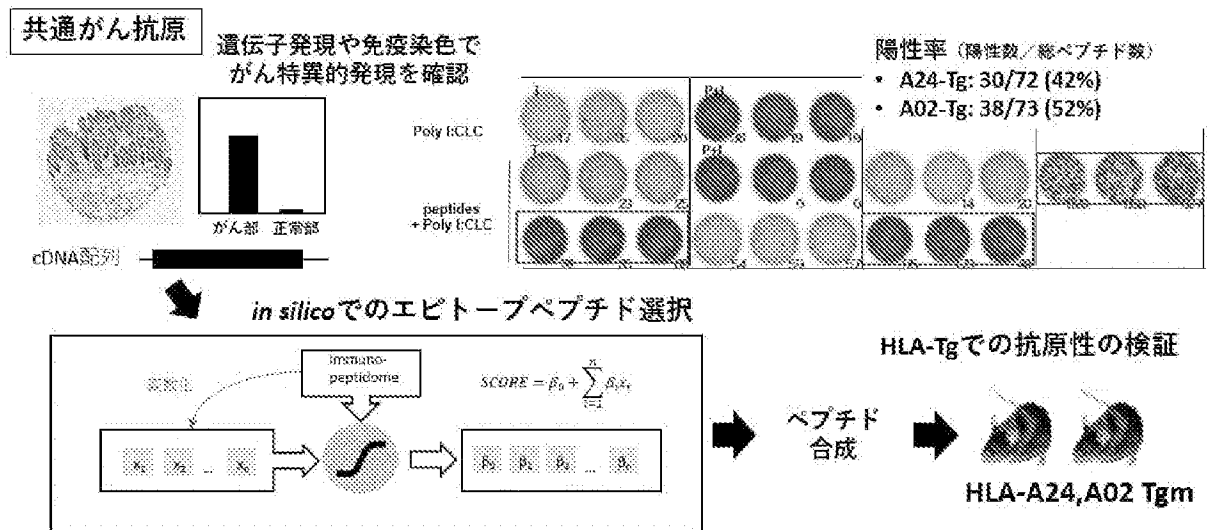
[図11]



[図12]



[図13]



[図14]

A02

GPC3	CA0211	CA0212	CA0213	CA0215	A2-GPC3-10	A2-GPC3-12	A2-GPC3-14	A2-GPC3-18
HSPH1	CA0221	CA0224						
FOXMI	CA0233	CA0235						
SPARC	CA0252	CA0256						
TGFBI	CA0281	CA0282	CA0283	CA0286				
ROBO1	CA0291	CA0292	CA0295	CA0297				
AFP	CA02101	CA02103	CA02104					
EPHB4	CA02121	CA02122	CA02123	CA02126	CA02127			
CLDN1	CLDN1-A02-1	CLDN1-A02-5	CLDN1-A02-6					
LAT1	LAT1-A02-1	LAT1-A02-2	LAT1-A02-3	LAT1-A02-4	LAT1-A02-5			GPC3 144-152

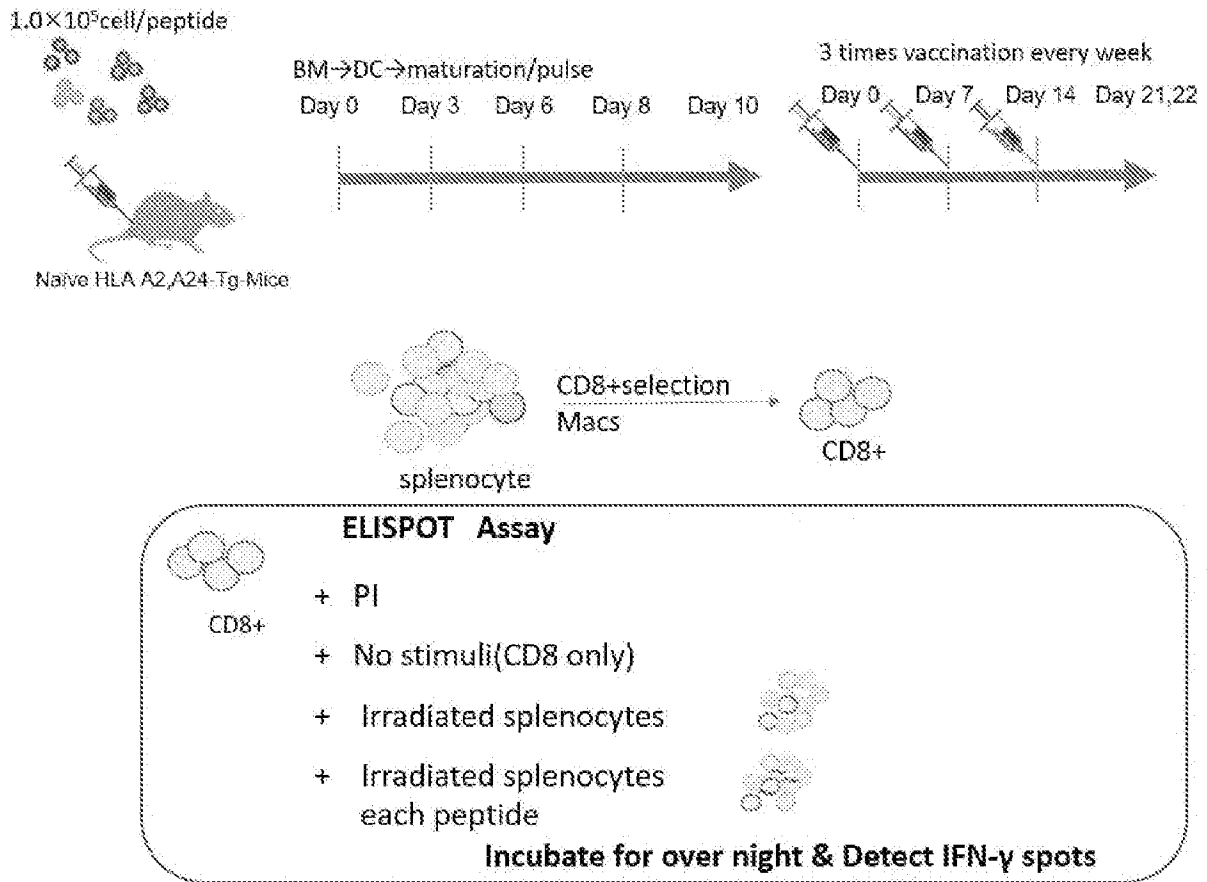
臨床試験ペプチド

[図15]

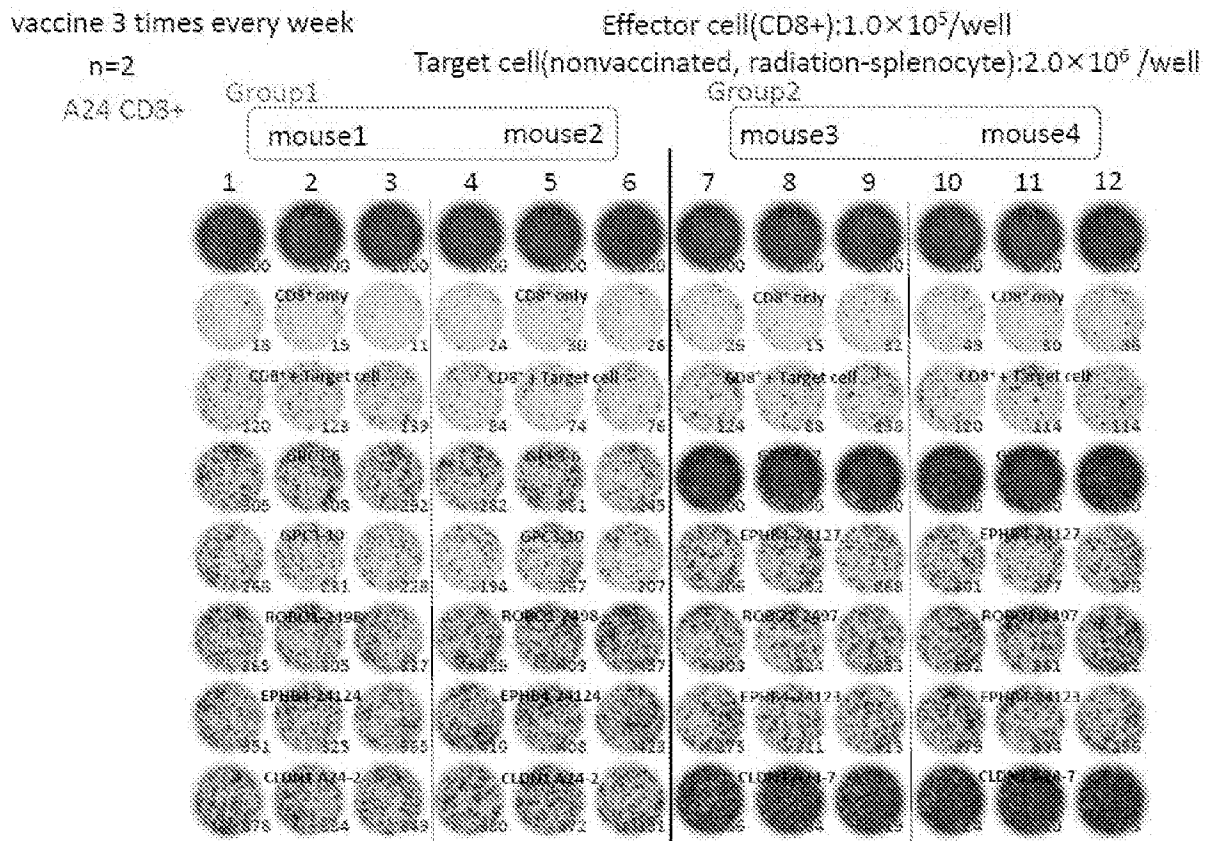
A24

GPC3	                     
------	---

[図16]



[図17]



[図18]

vaccine 3 times every week

Effector cell(CD8+): 1.0×10^5 /well

n=2

Target cell(nonvaccinated, radiation-splenocyte): 2.0×10^6 /well

A02 CD8+

Group1

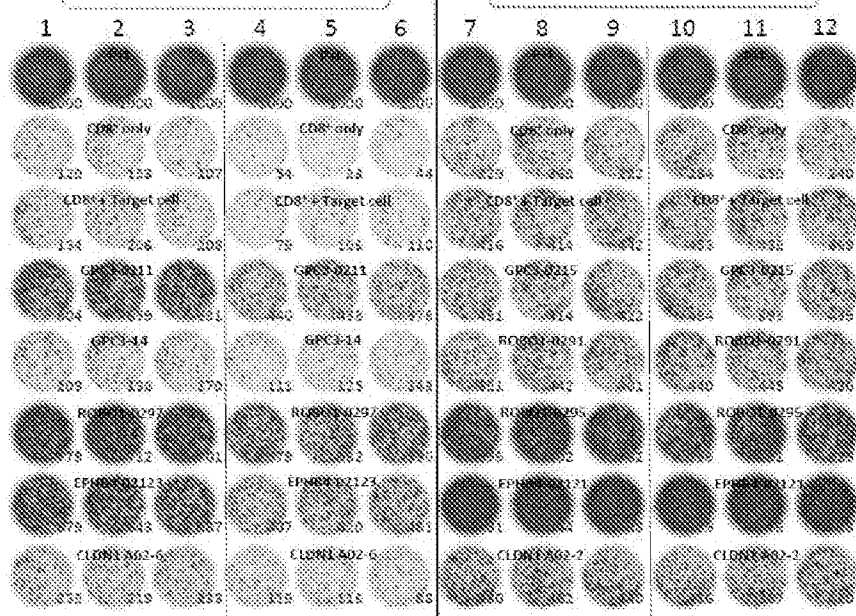
Group2

mouse1

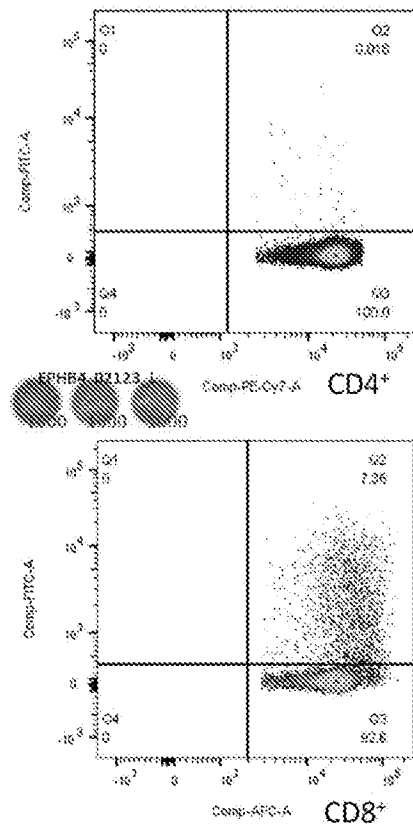
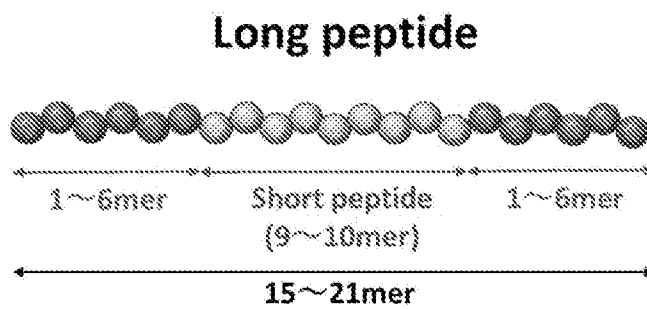
mouse2

mouse3

mouse4



[図19]



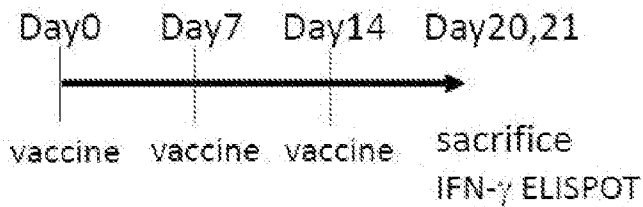
[図20]

Covid-19 Spike mRNA vaccination

HLA-A*24:02 Tg mice



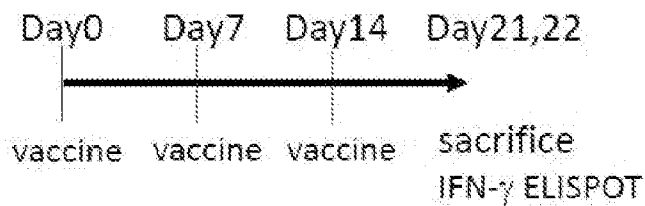
LNP-Covid-19 Spike mRNA (2 μ g or 10 μ g)
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



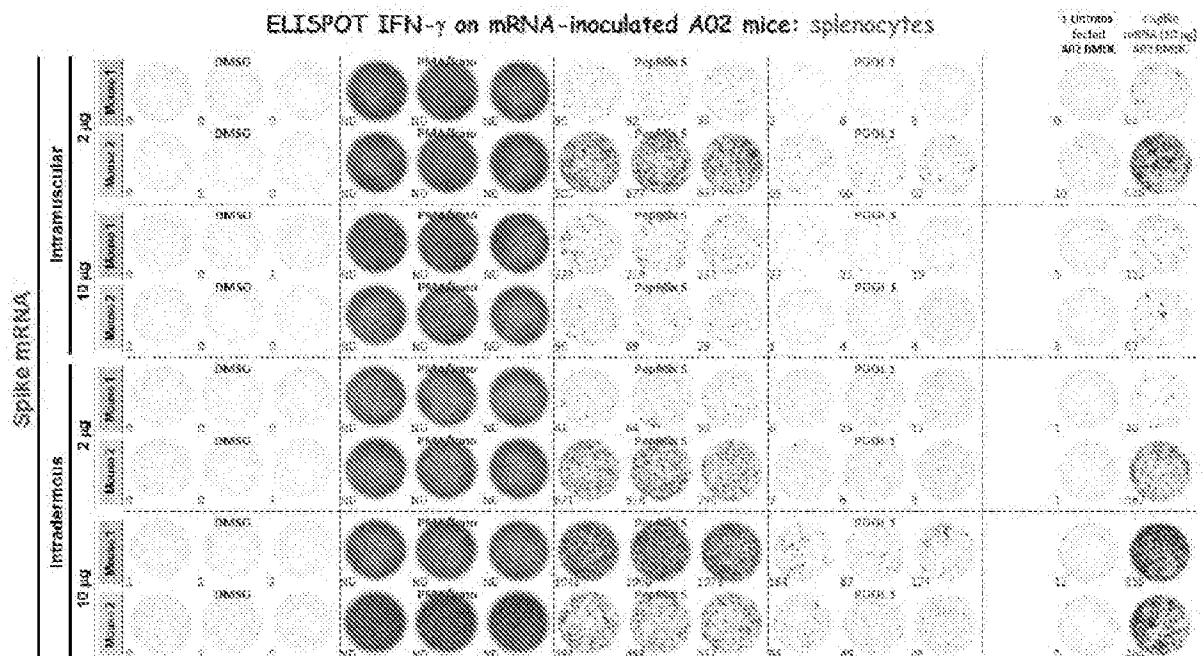
HLA-A*02:01 Tg mice



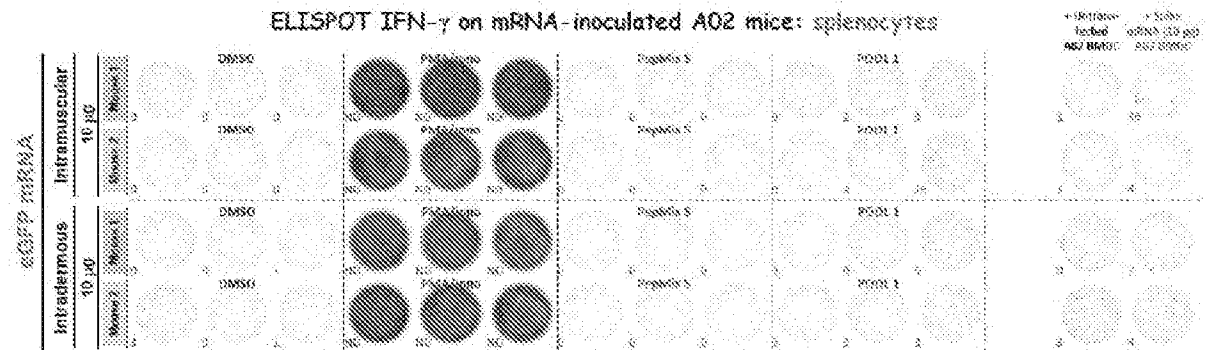
LNP-Covid-19 Spike mRNA (2 μ g or 10 μ g)
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



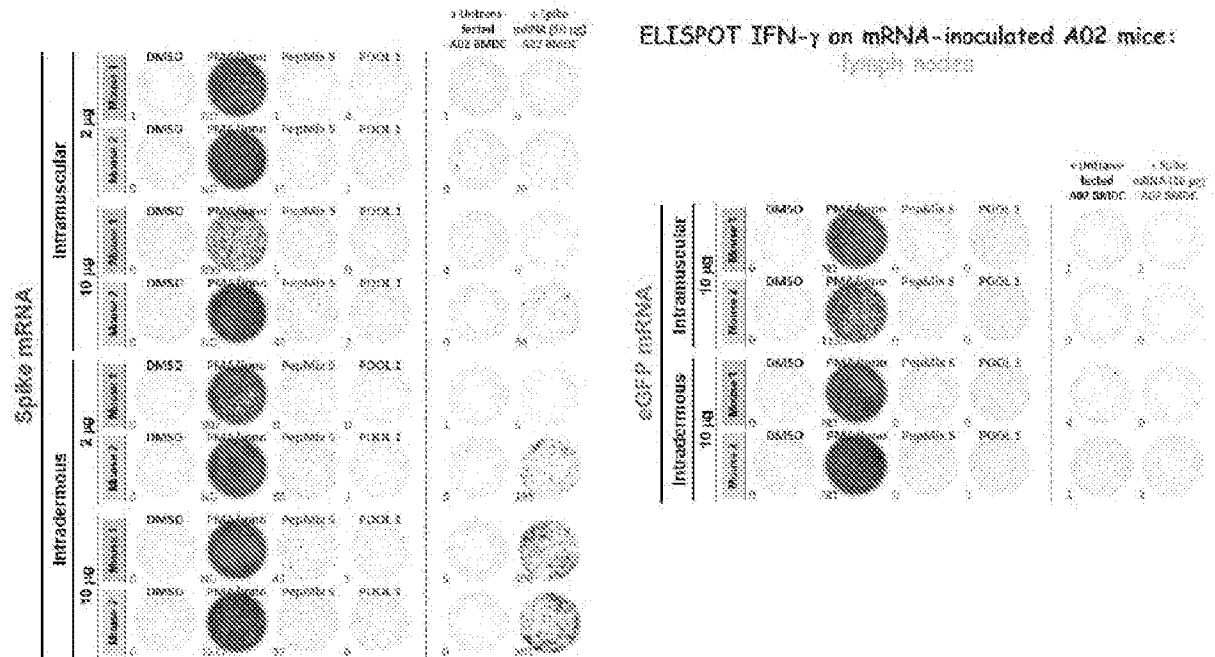
[図21]



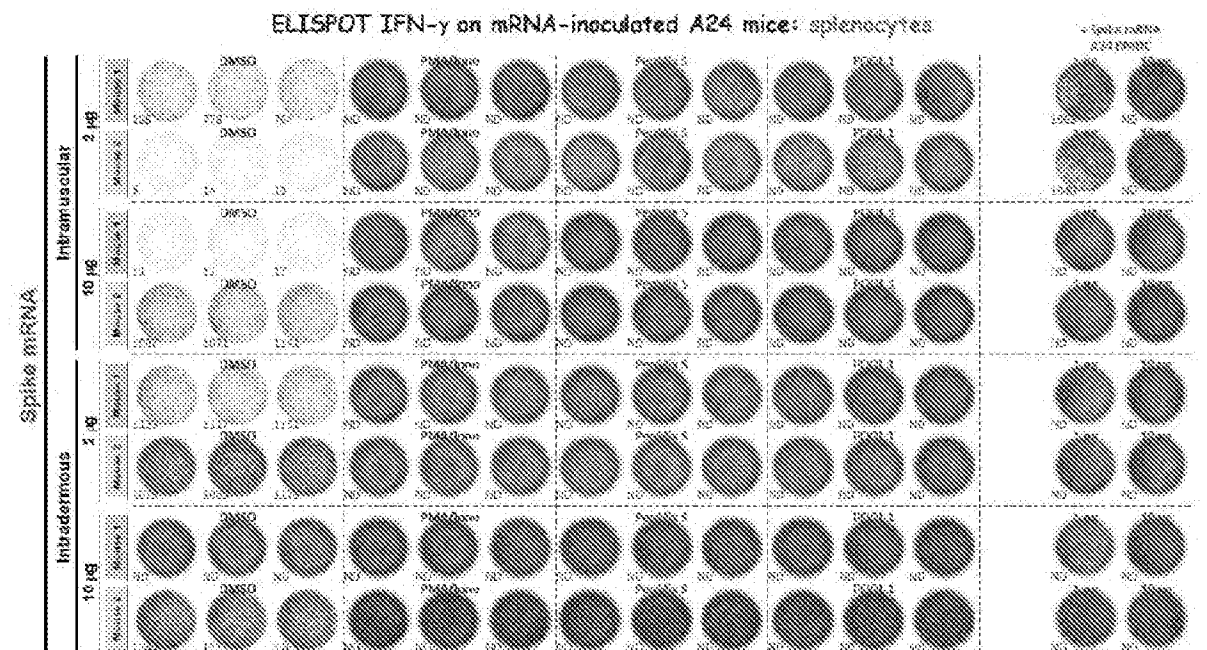
[22]



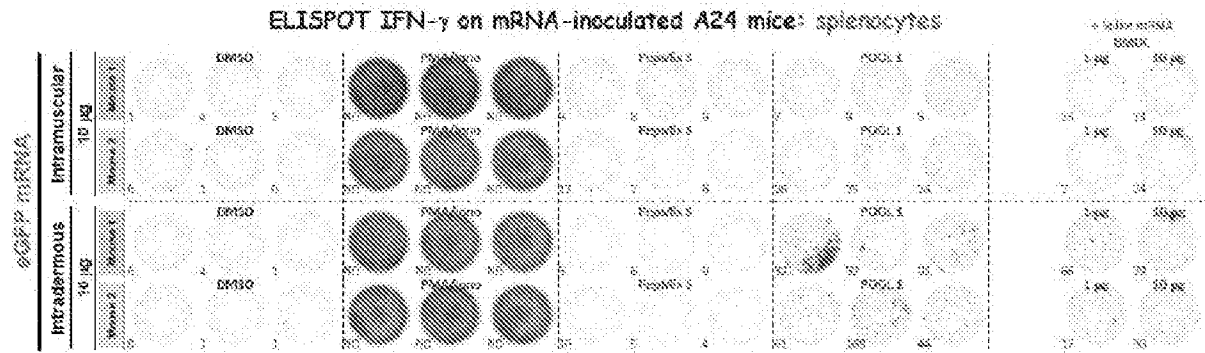
[23]



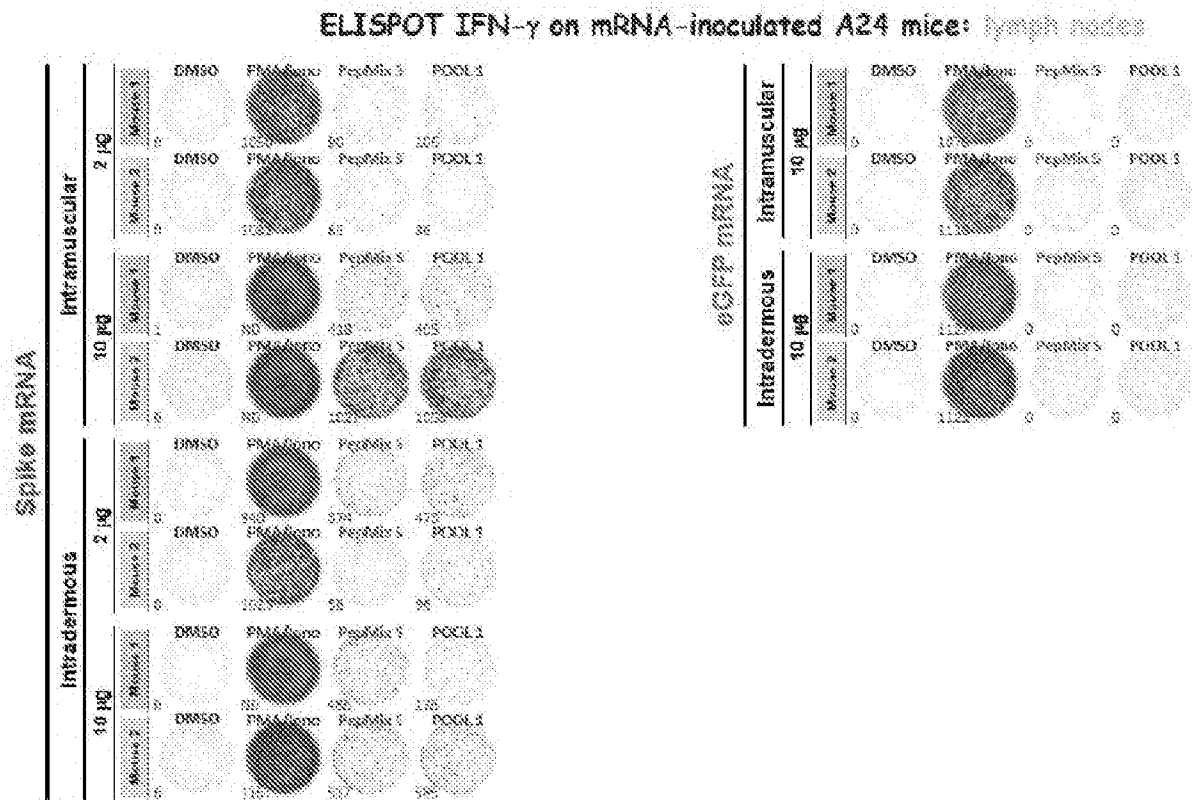
[24]



[図25]



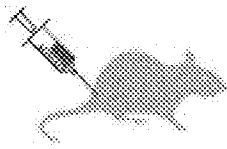
[図26]



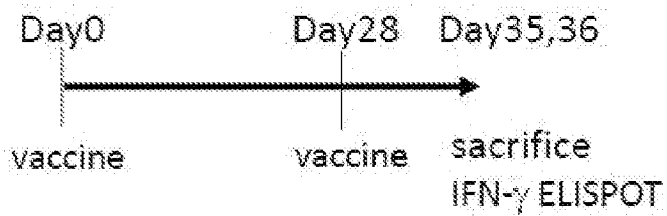
[図27]

Covid-19 Spike mRNA vaccination

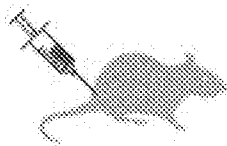
HLA-A*24:02 Tg mice



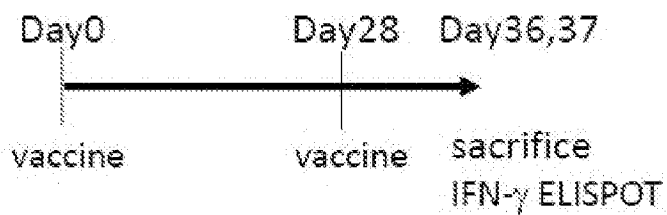
LNP-Covid-19 Spike mRNA (2 μ g or 10 μ g)
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



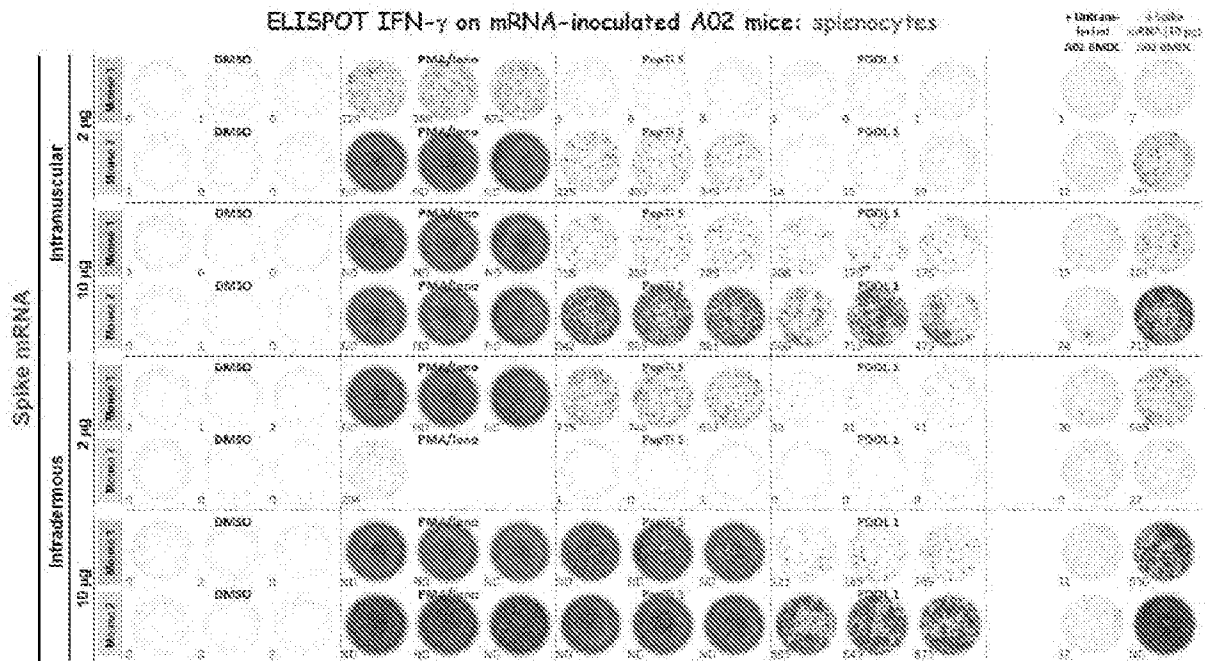
HLA-A*02:01 Tg mice



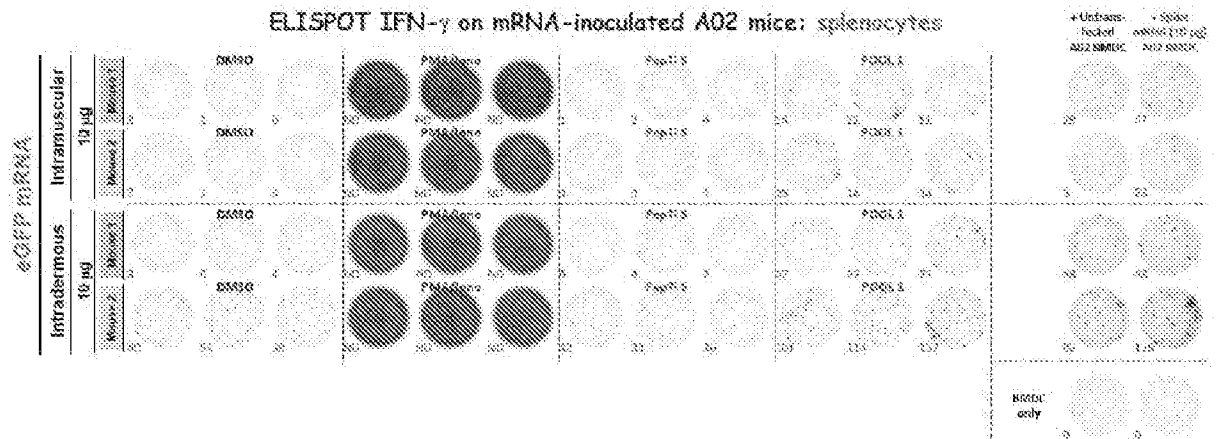
LNP-Covid-19 Spike mRNA (2 μ g or 10 μ g)
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



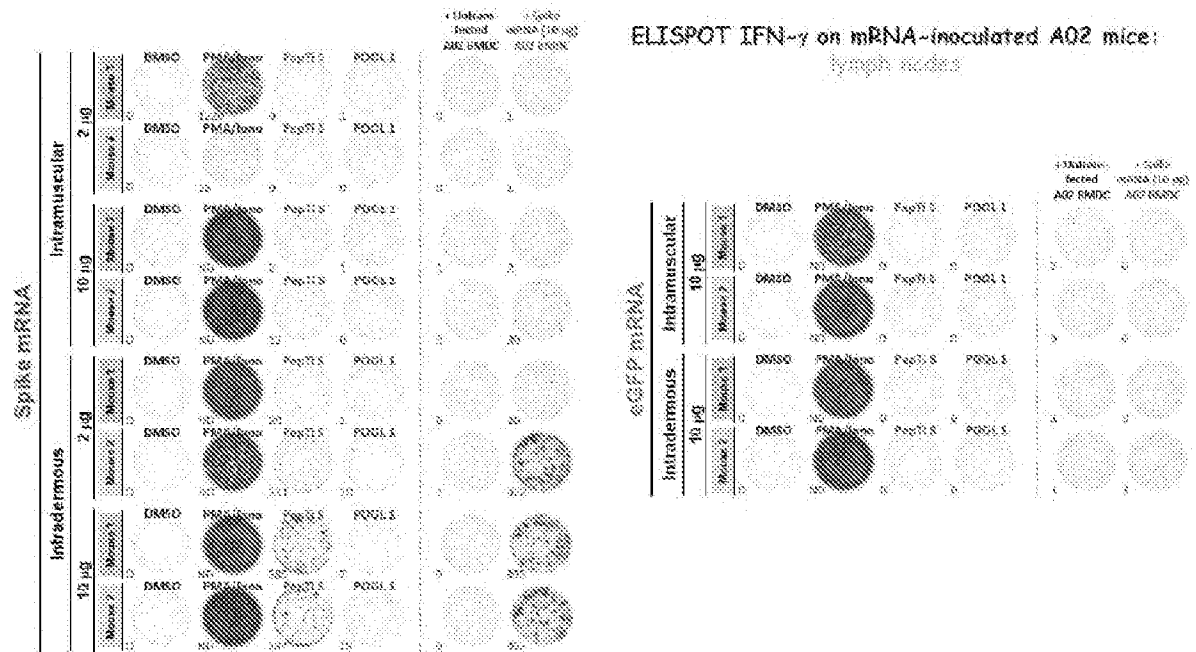
[図28]



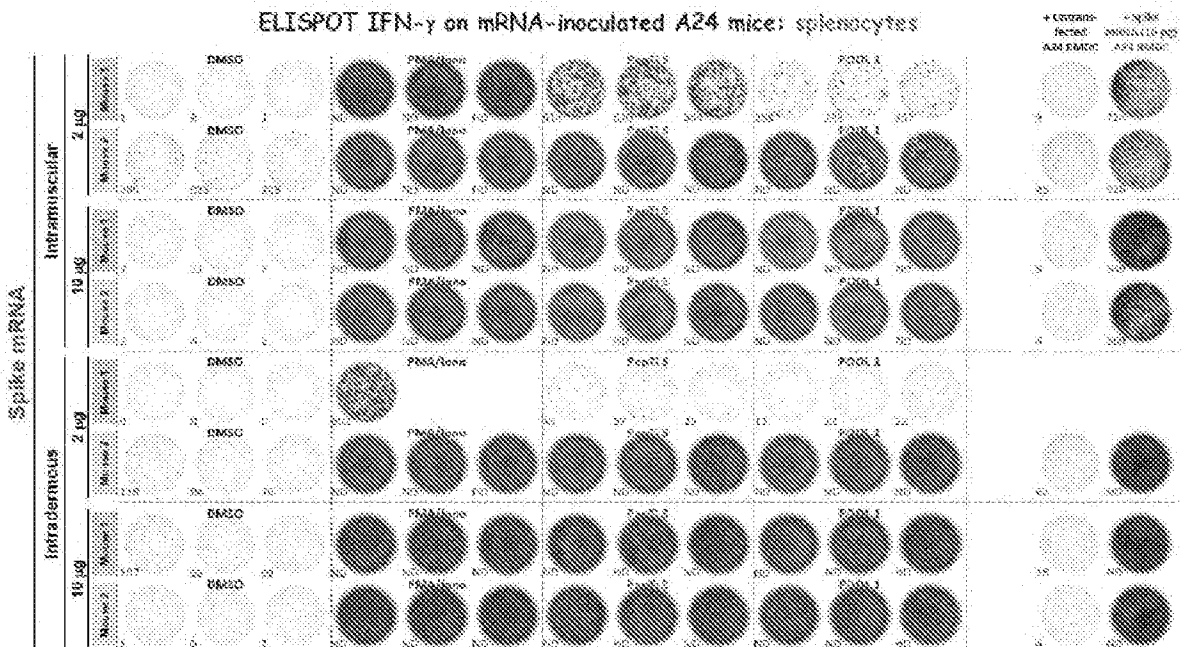
[図29]



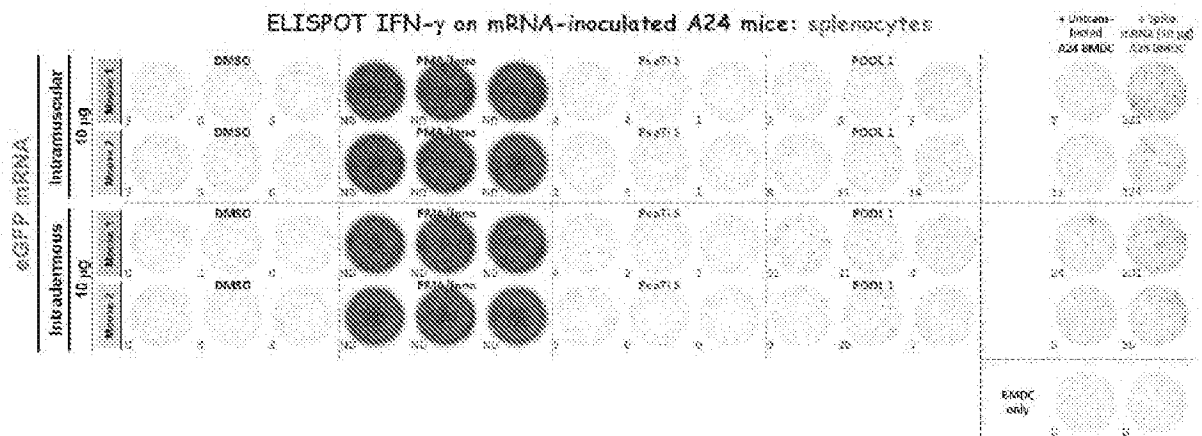
[図30]



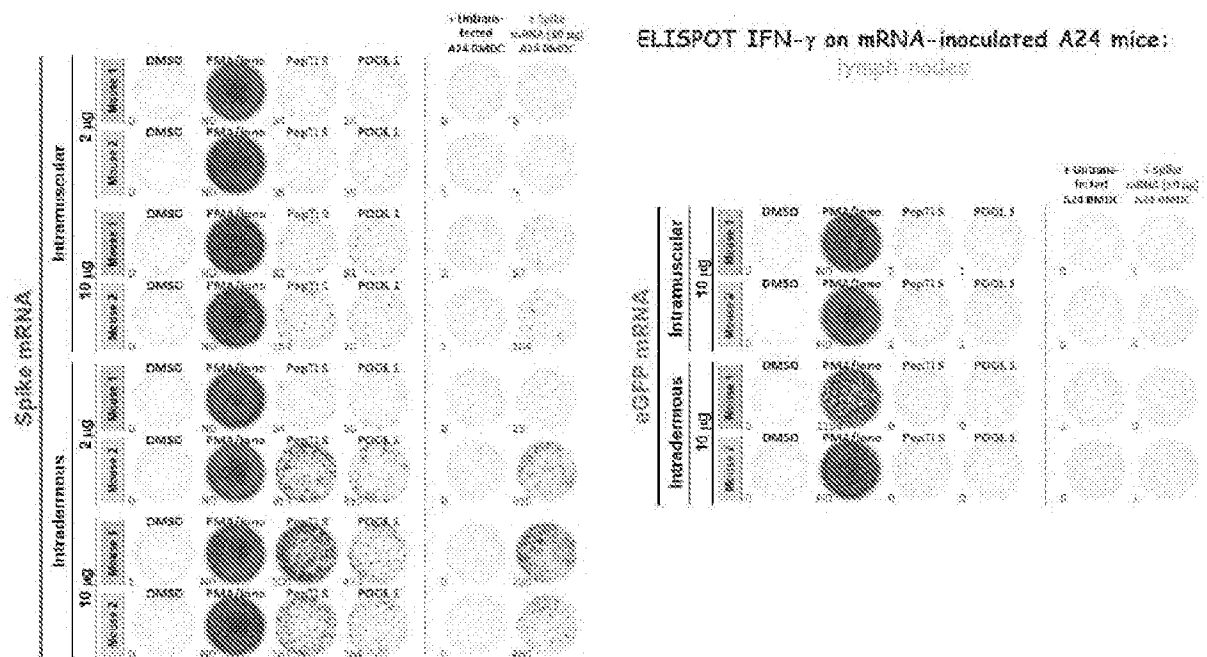
[図31]



[図32]



[図33]



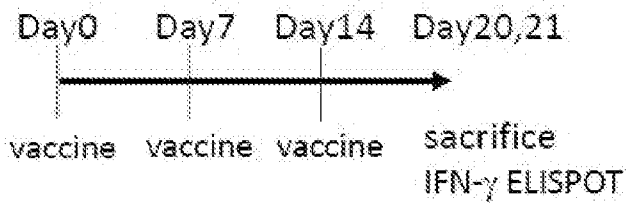
[図35]

hGPC3 mRNA vaccination

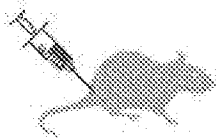
HLA-A*02:01 Tg mice



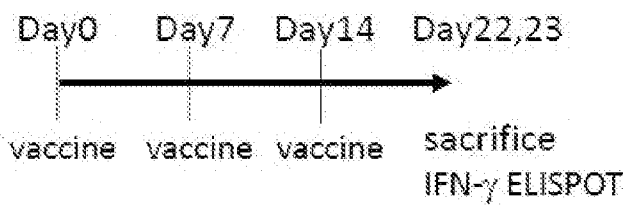
LNP-hGPC3 mRNA 2 μ g or 10 μ g
or LNP-Luciferase 10 μ g
i.m. or i.d.



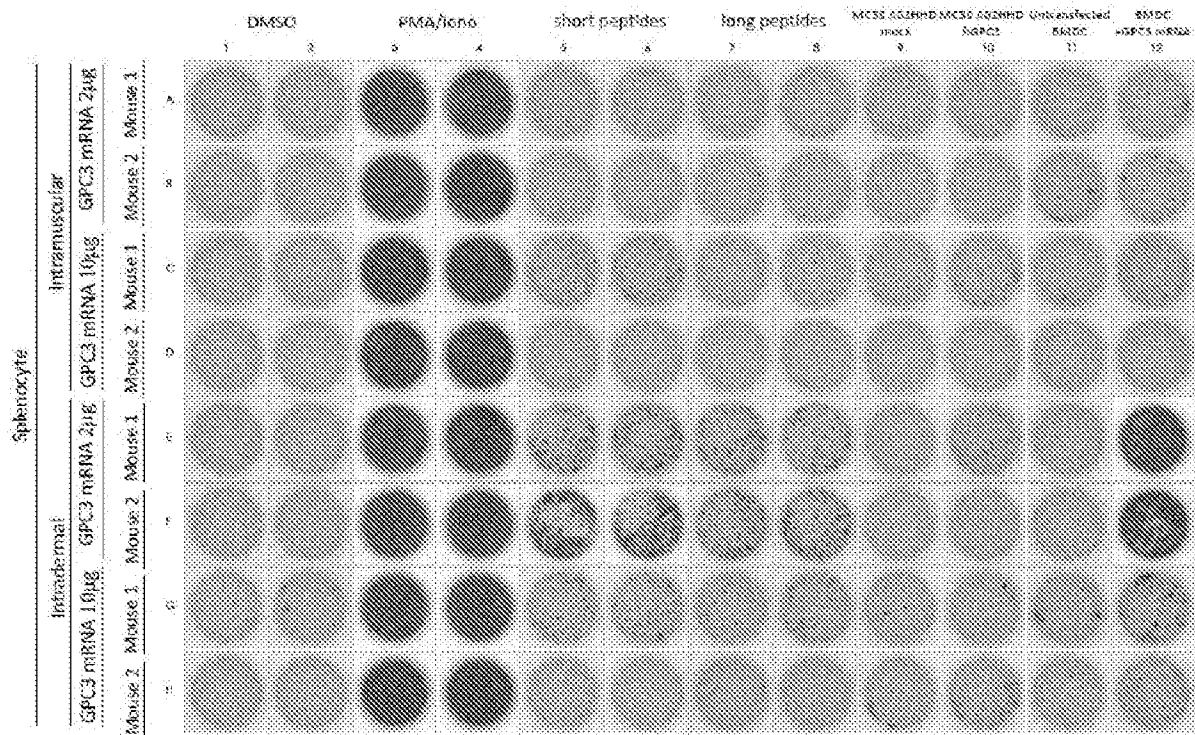
HLA-A*24:02 Tg mice



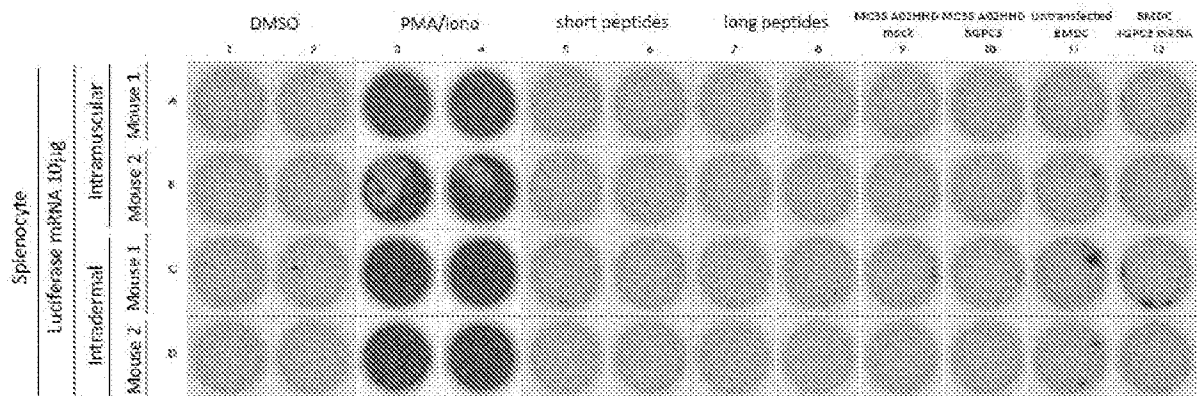
LNP-hGPC3 mRNA 2 μ g or 10 μ g
or LNP-Luciferase 10 μ g
i.m. or i.d.



[図36]

IFN- γ ELISPOT on GPC3 mRNA vaccinated A02-Tg mice

[図37]

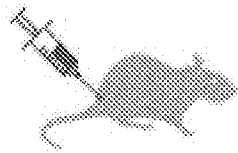
IFN- γ ELISPOT on GPC3 mRNA vaccinated A02-Tg mice

[illegible]

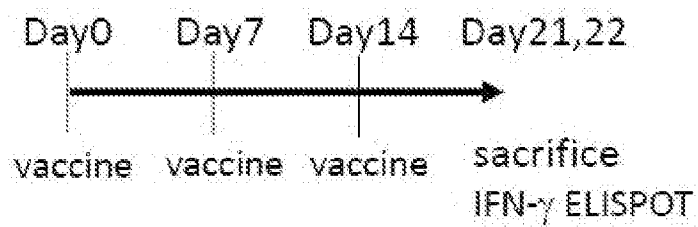
[図40]

ROBO1 mRNA vaccination

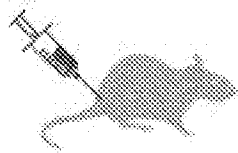
HLA-A*24:02 Tg mice



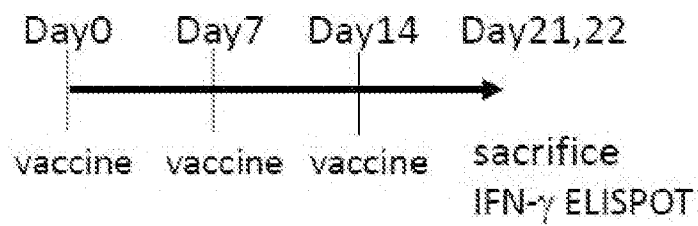
LNP-hROBO1 mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



HLA-A*02:01 Tg mice



LNP-hROBO1 mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.m. or i.d.



Splenicocyte		eGFP mRNA 10 μ g		ROBO1 mRNA 10 μ g	
	Intradermal	Intramuscular	Intradermal	Intramuscular	
Mouse 1	A	B	C	D	
Mouse 2	E	F	G	H	

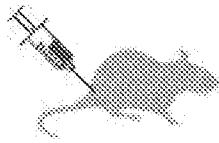
1 DMSO 2 PMA/Iono 3 short peptides 4 long peptides 5 ROBO1 mRNA (mock) 6 ROBO1 mRNA (SMD) 7 eGFP mRNA 8 SMOG

A B C D E F G H

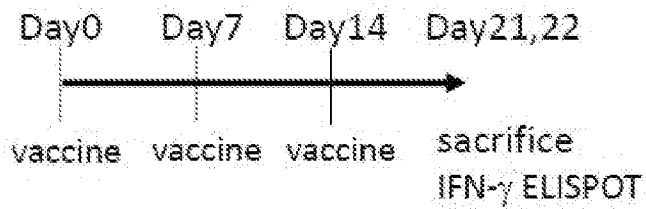
[図43]

CLDN1, EPHB4 mRNA vaccination

HLA-A*02:01 Tg mice



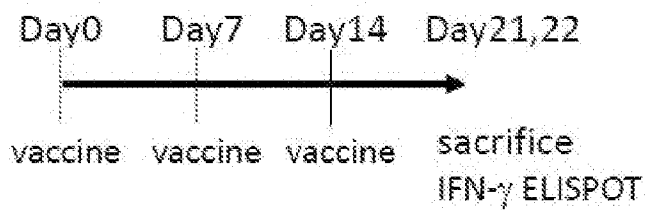
LNP-hCLDN1 or LNP-hEPHB4 mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



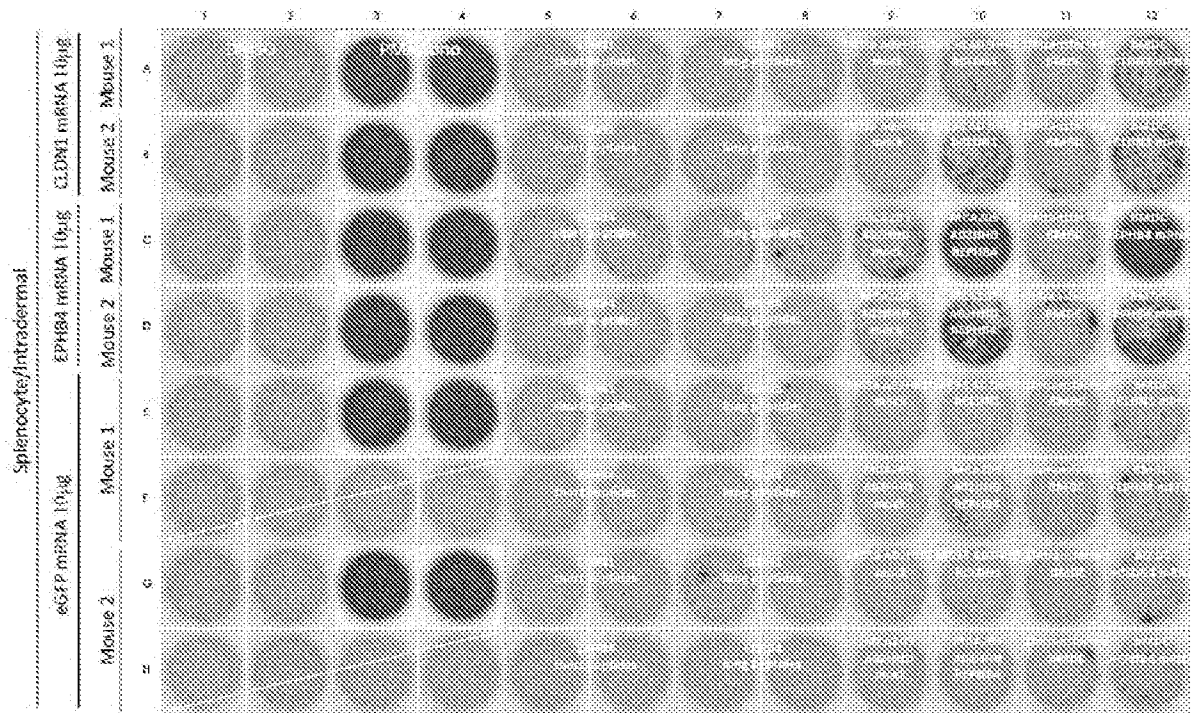
HLA-A*24:02 Tg mice



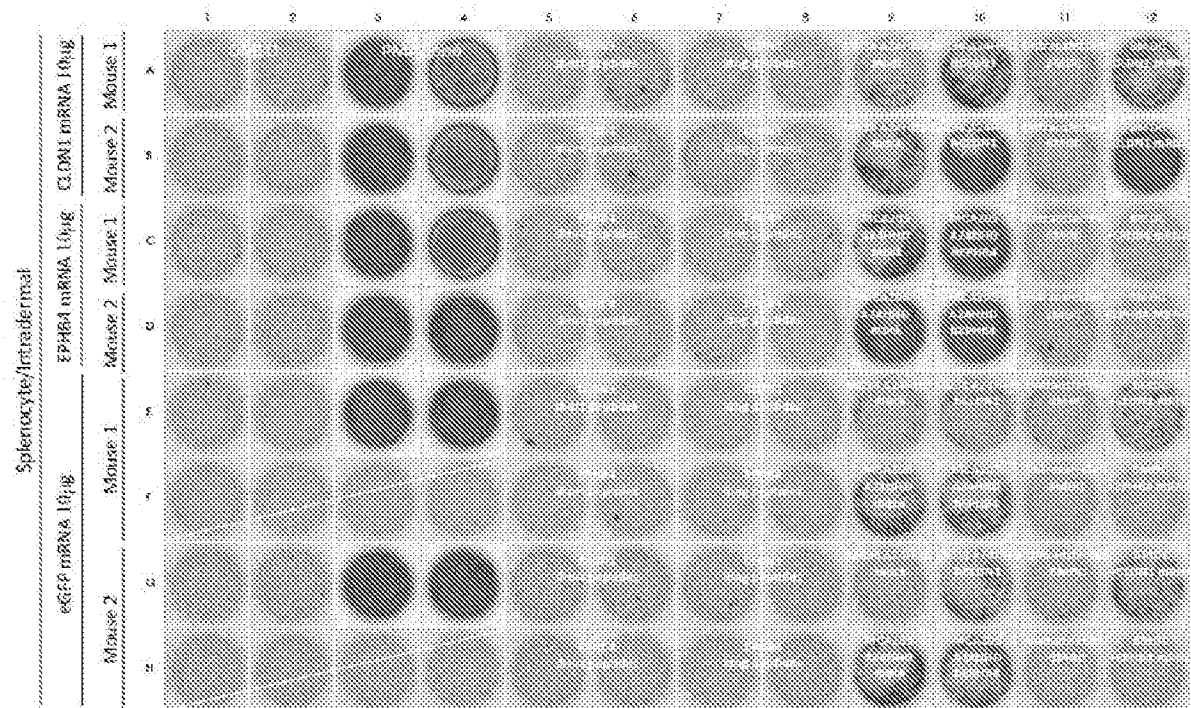
LNP-hCLDN1 or LNP-hEPHB4 mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



[図44]

IFN- γ ELISPOT on CLDN1 or EPHB4 mRNA vaccinated A02-Tg mice

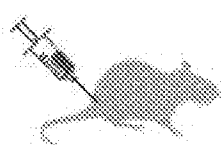
[図45]

IFN- γ ELISPOT on CLDN1 or EPHB4 mRNA vaccinated A24-Tg mice

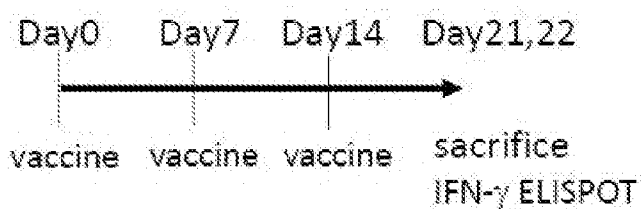
[図46]

TGFBI, SPARC mRNA vaccination

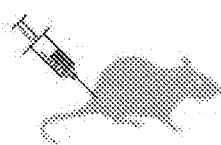
HLA-A*02:01 Tg mice



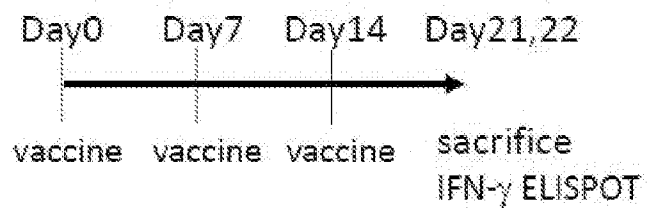
LNP-hTGFBI or LNP-hSPARC mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



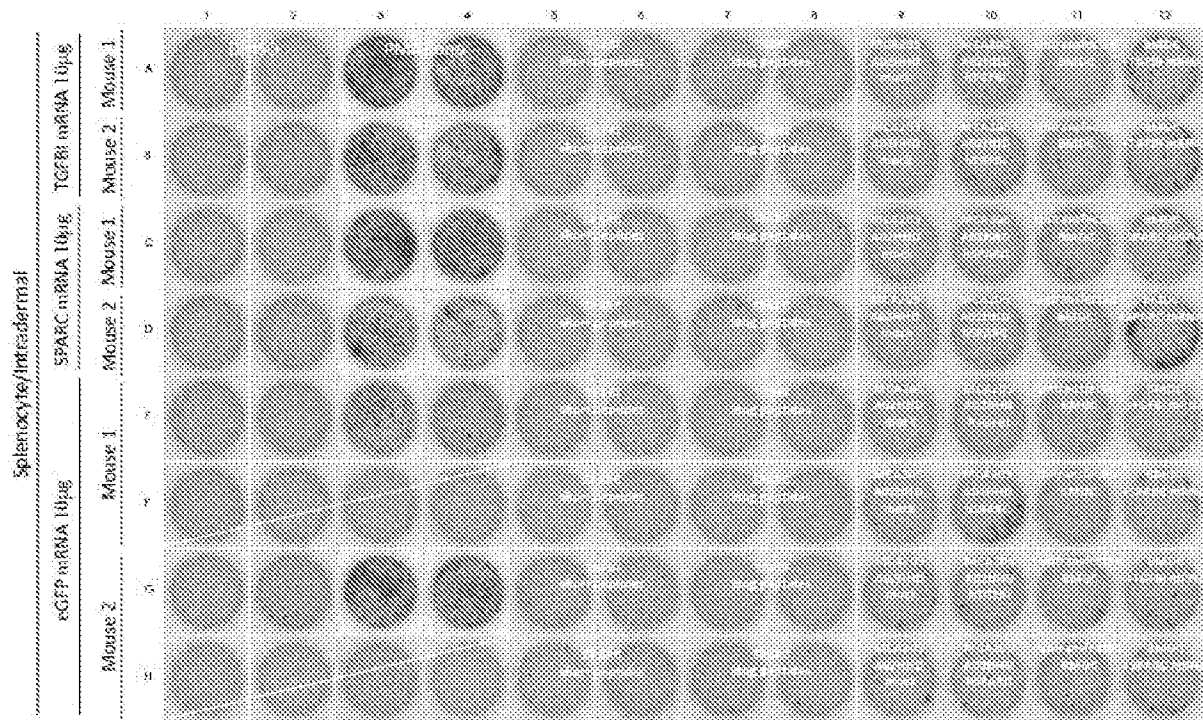
HLA-A*24:02 Tg mice



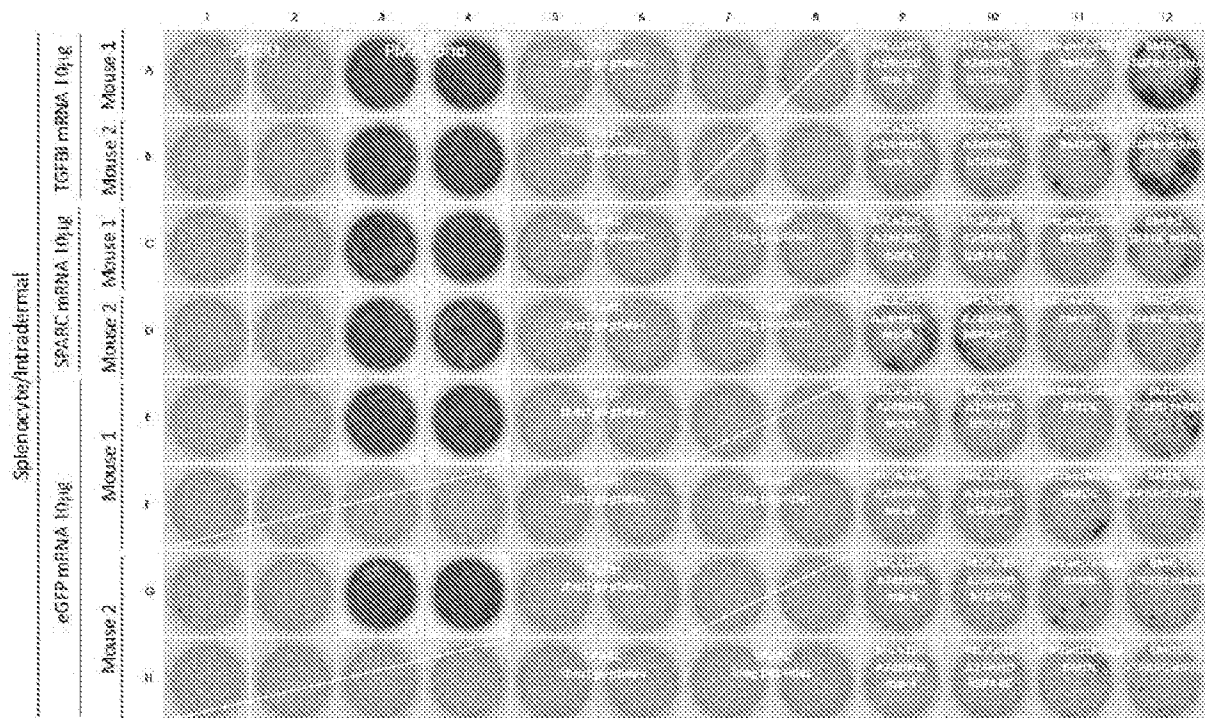
LNP-hTGFBI or LNP-hSPARC mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



[図47]

IFN- γ ELISPOT on TGFB1 or SPARC mRNA vaccinated A02-Tg mice

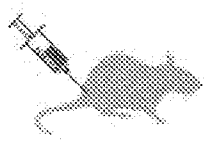
[図48]

IFN- γ ELISPOT on TGFB1 or SPARC mRNA vaccinated A24-Tg mice

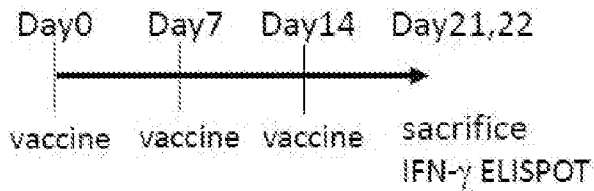
[図49]

AFP, HSP105 α mRNA vaccination

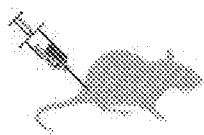
HLA-A*02:01 Tg mice



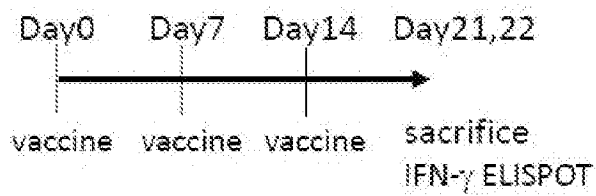
LNP-hAFP or LNP-hHSP105 α mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



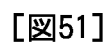
HLA-A*24:02 Tg mice



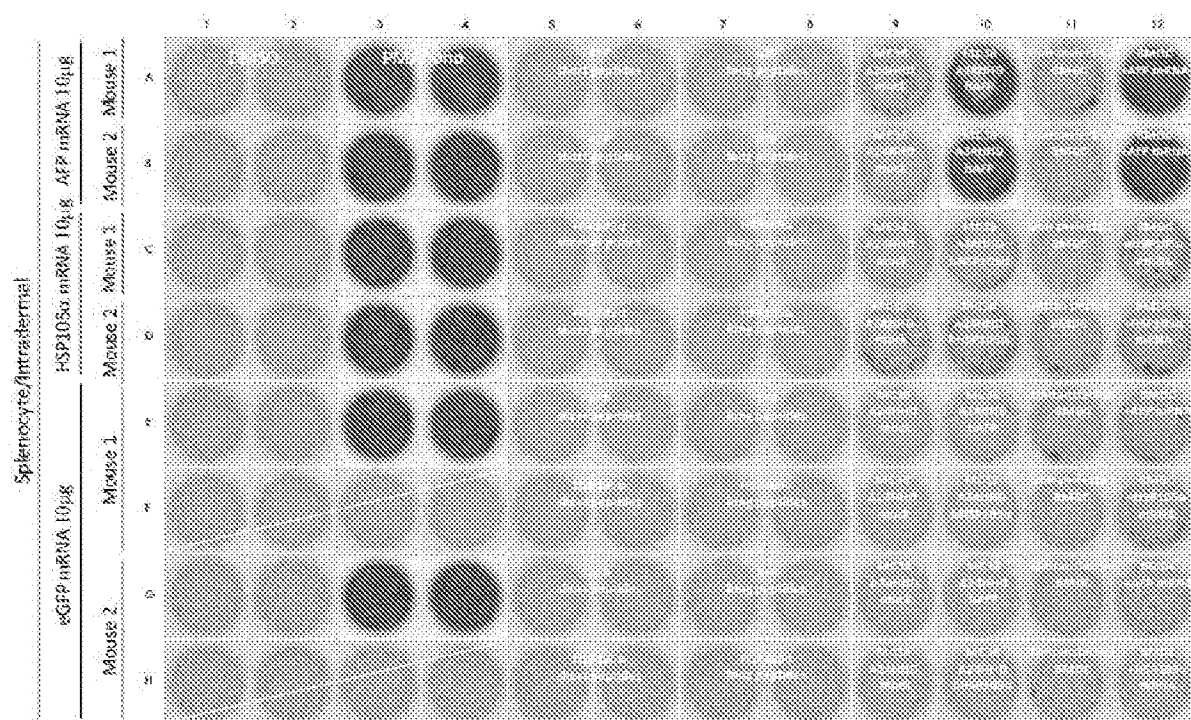
LNP-hAFP or LNP-hHSP105 α mRNA 10 μ g
or LNP-eGFP 10 μ g
i.d.



IFN- γ ELISPOT on AFP or HSP105 α mRNA vaccinated A02-Tg mice



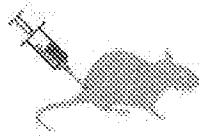
IFN- γ ELISPOT on AFP or HSP105 α mRNA vaccinated A24-Tg mice



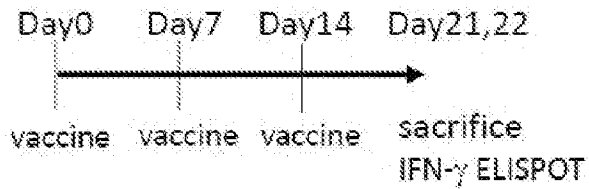
[図52]

CLDN1+EPHB4 mRNA vaccination

HLA-A*02:01 Tg mice



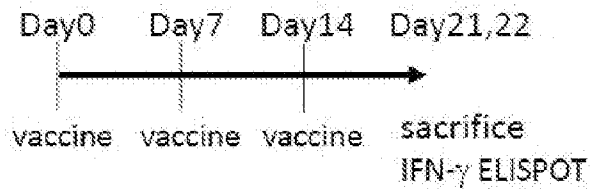
LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA 10 μ g, 20 μ g
or LNP-Luciferase 20 μ g
i.d.



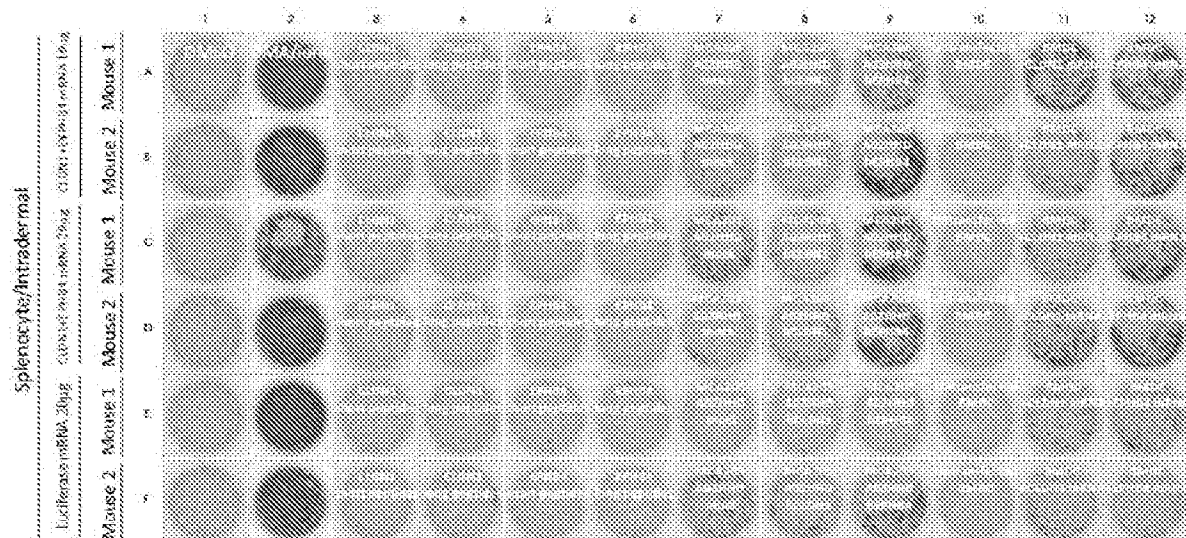
HLA-A*24:02 Tg mice



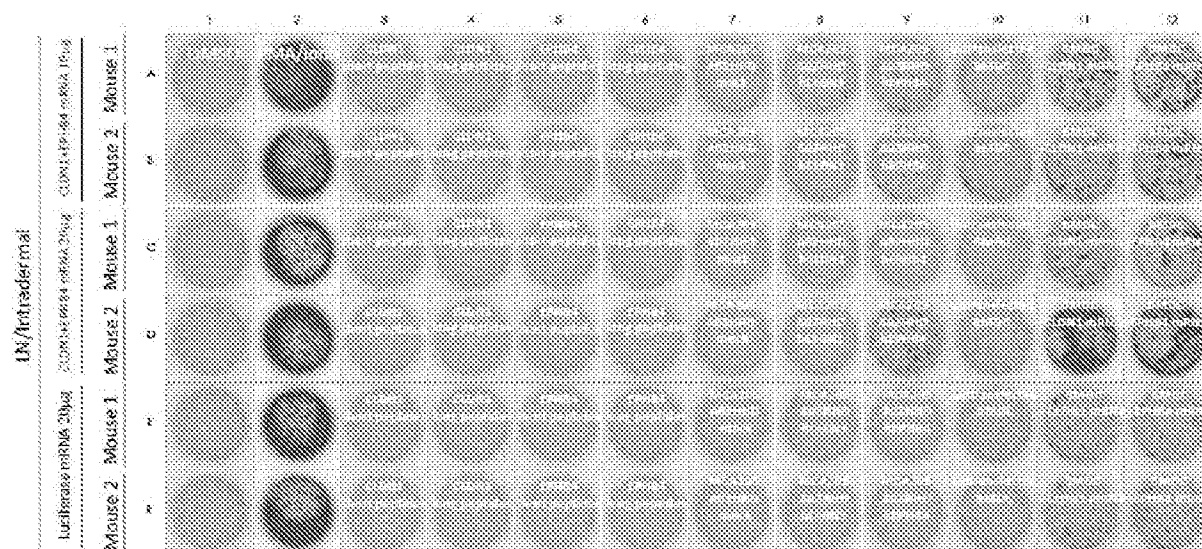
LNP-(hCLDN1+hEPHB4) mRNA 10 μ g, 20 μ g
or LNP-Luciferase 20 μ g
i.d.



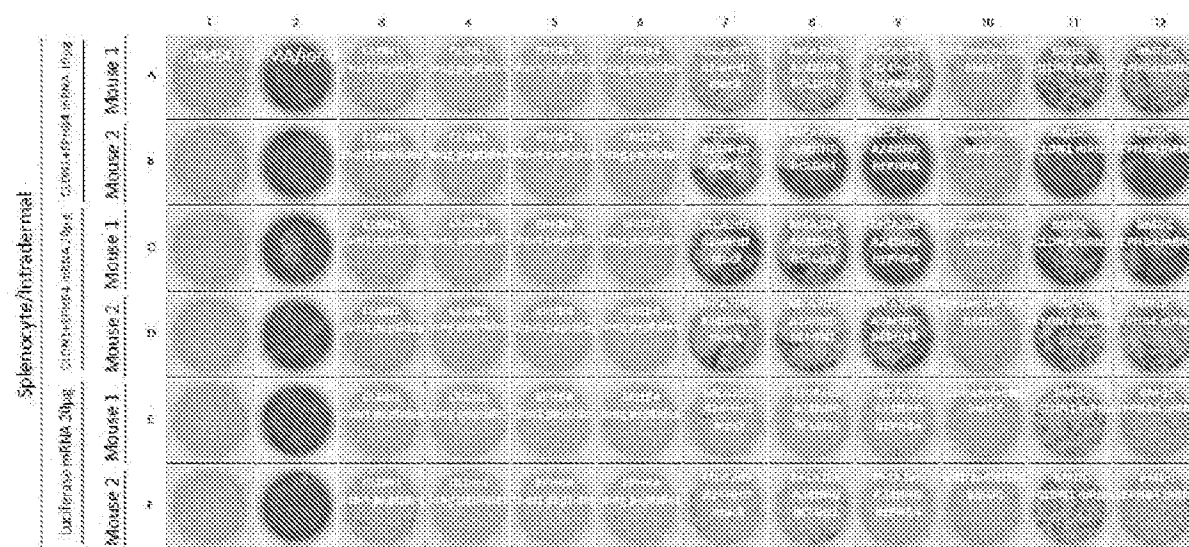
[図53]

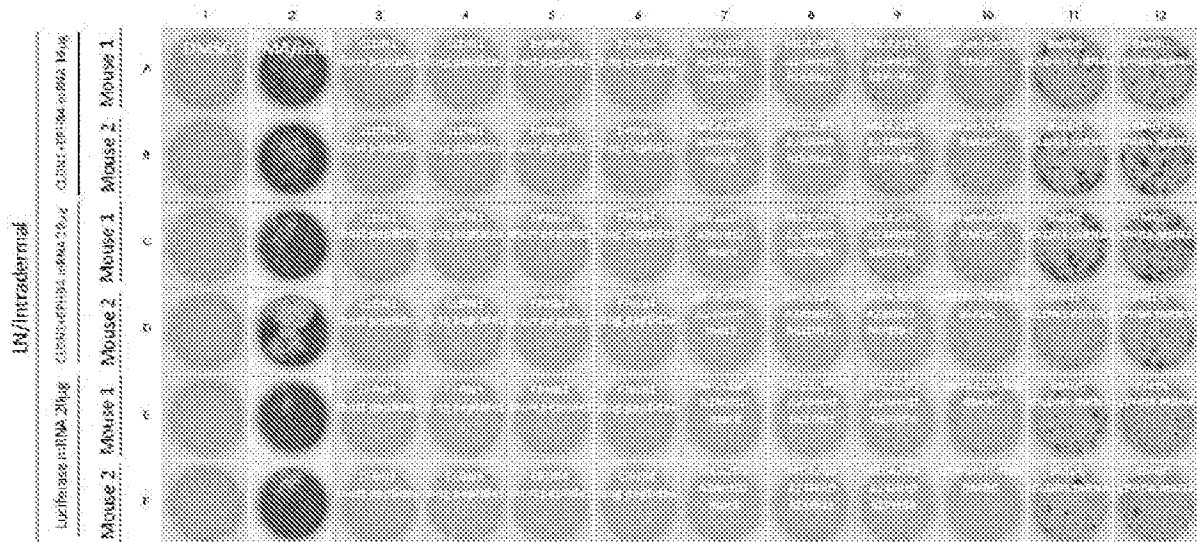
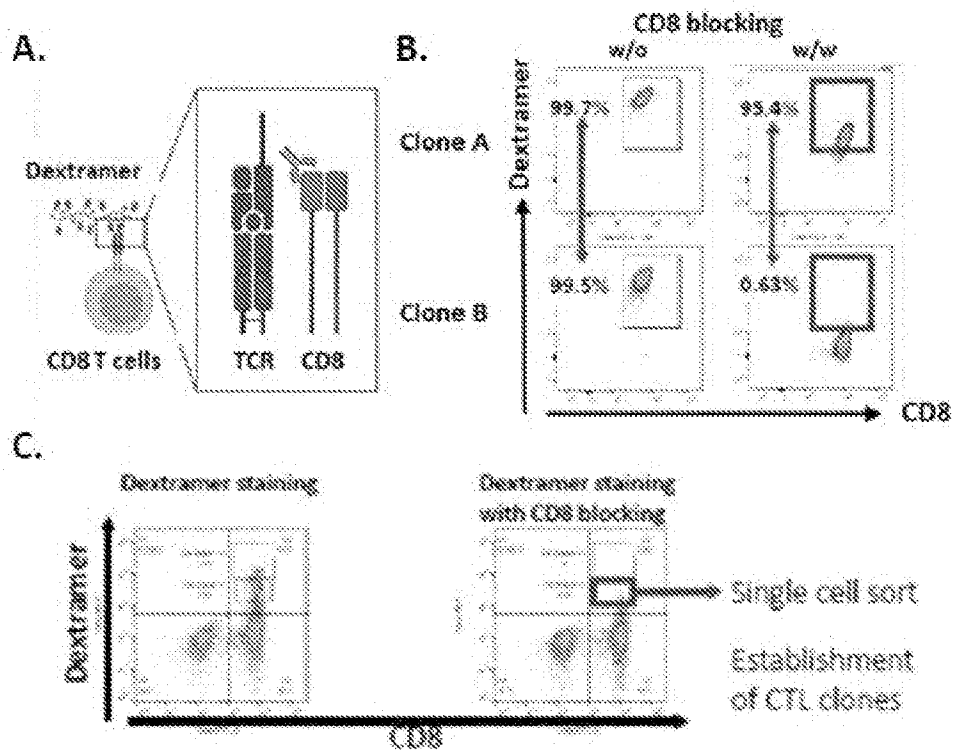
IFN- γ ELISPOT on CLDN1+EPHB4 mRNA vaccinated A02-Tg mice

IFN- γ ELISPOT on CLDN1+EPHB4 mRNA vaccinated A02-Tg mice

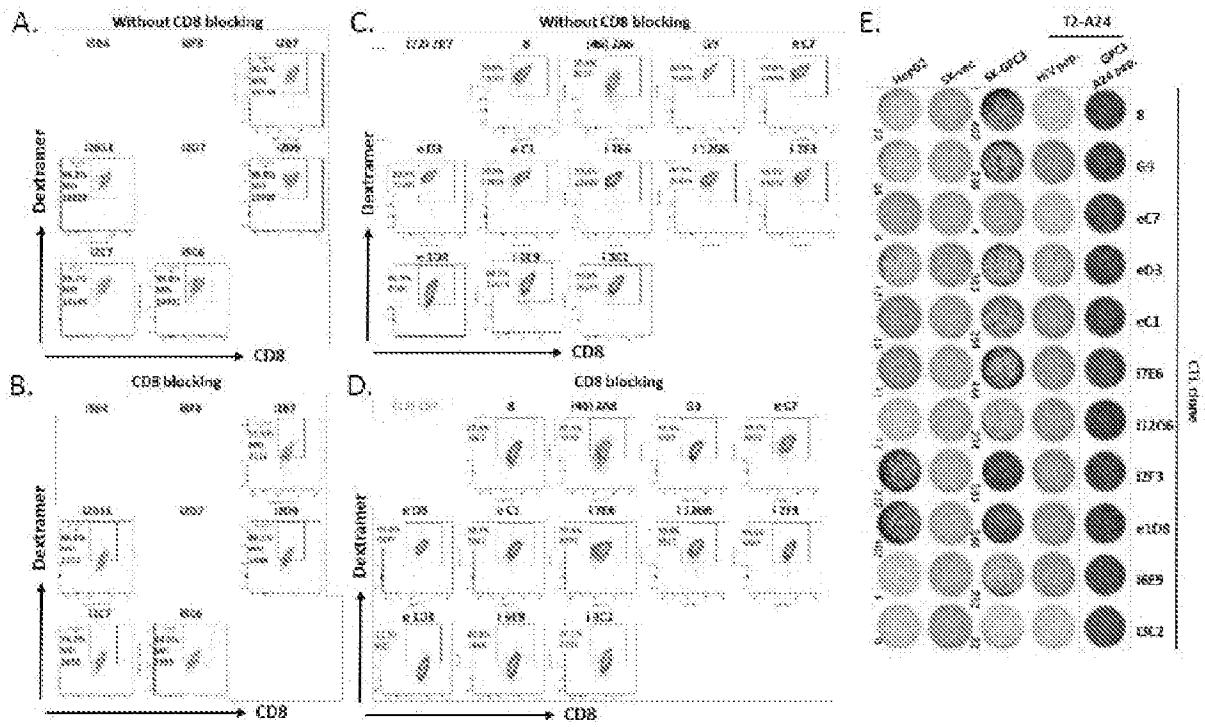


IFN- γ ELISPOT on CLDN1+EPHB4 mRNA vaccinated A24-Tg mice

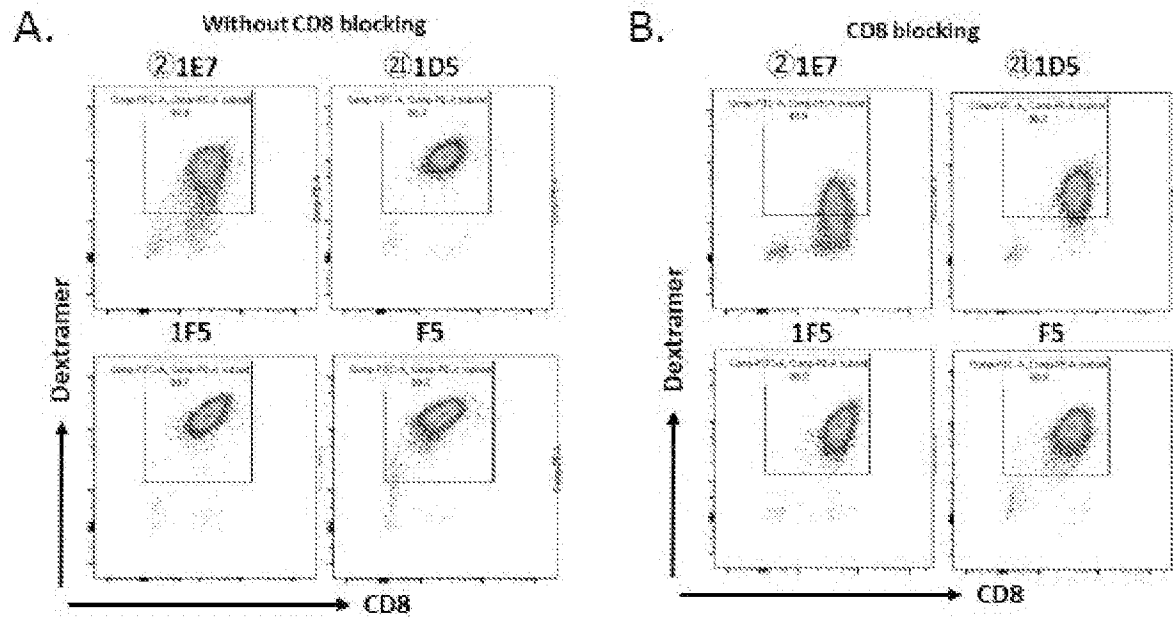


[56]IFN- γ ELISPOT on CLDN1+EPHB4 mRNA vaccinated A24-Tg mice[57]

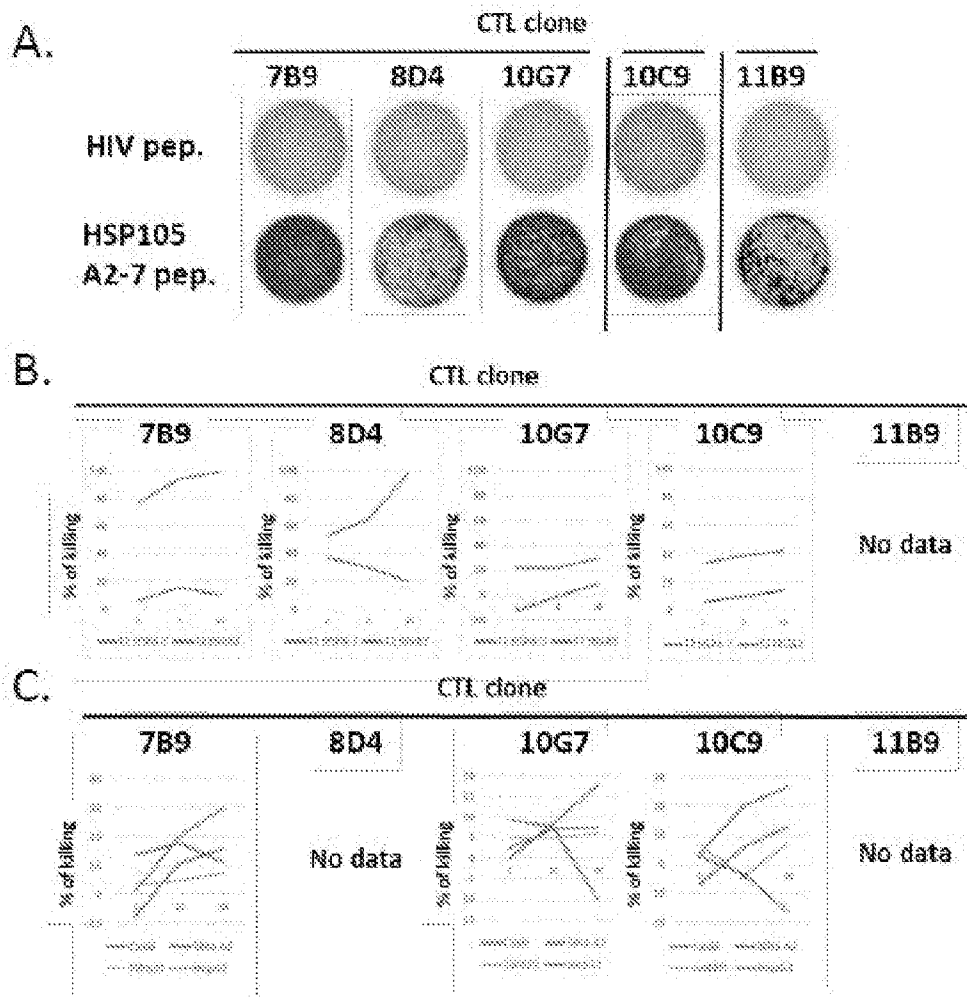
[図58]



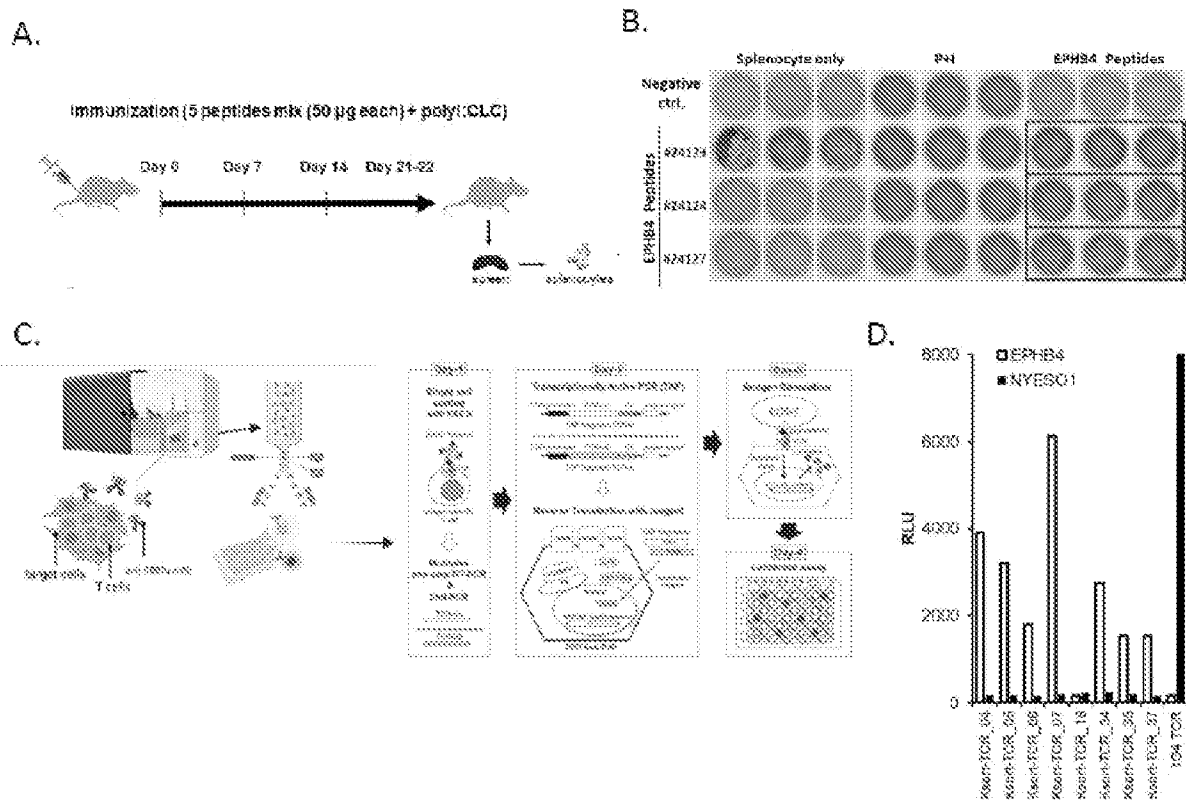
[図59]



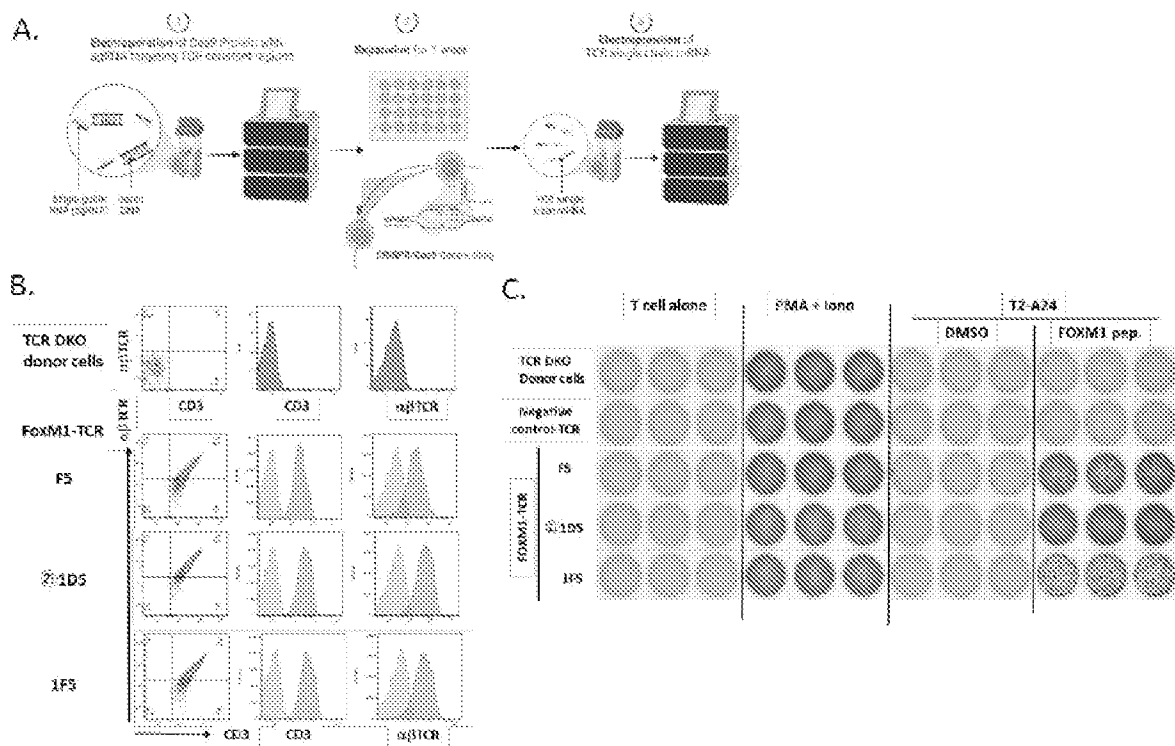
[図60]



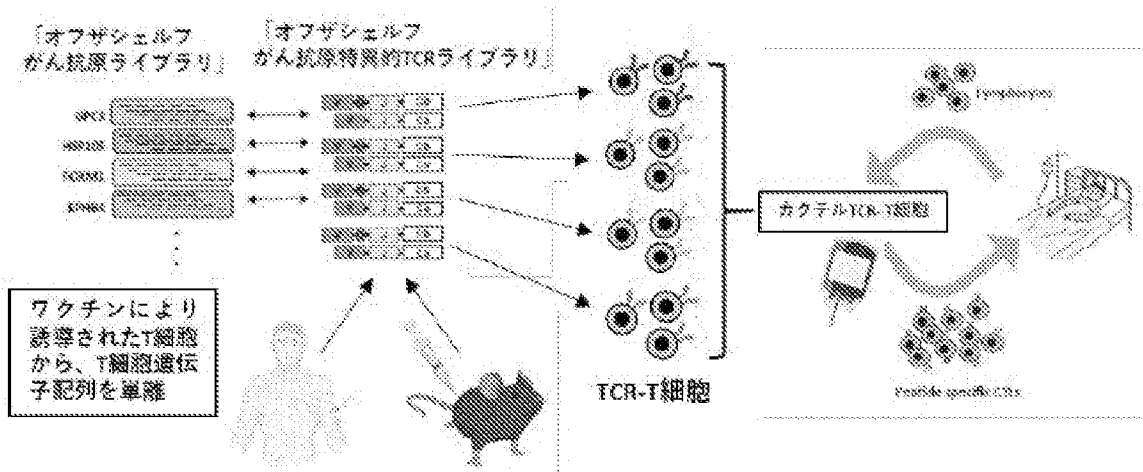
[図61]



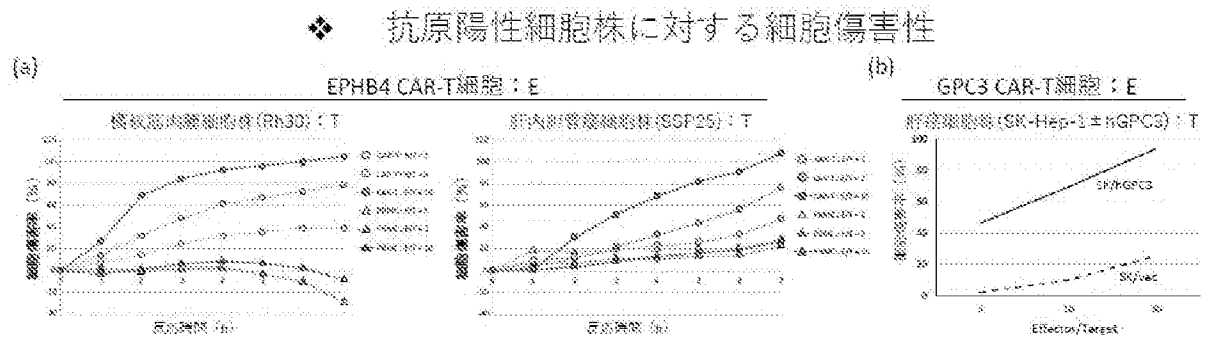
[図62]



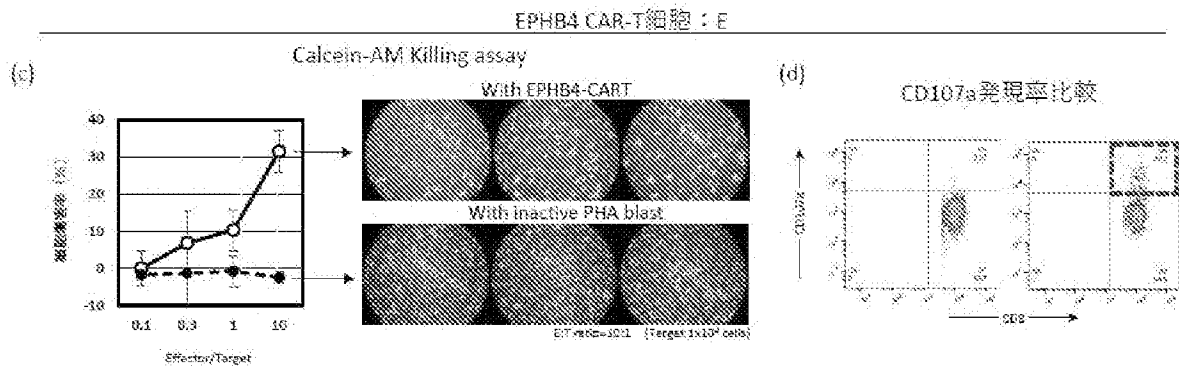
[図63]



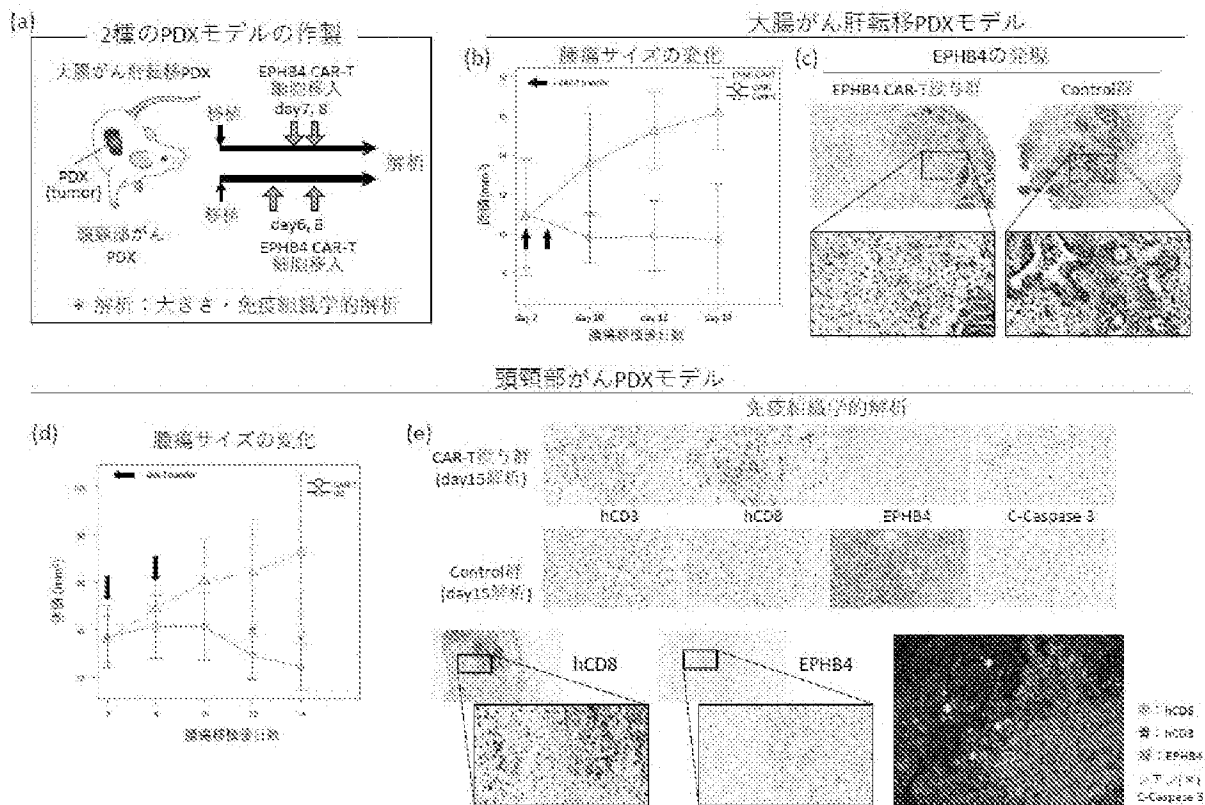
[図64]



❖ PDX細胞に対する細胞傷害性

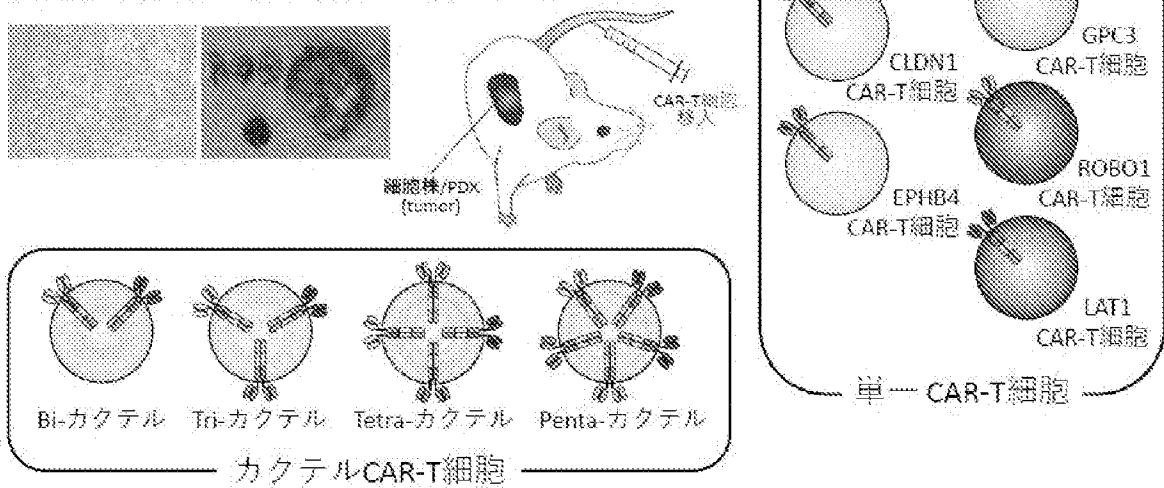


[図65]

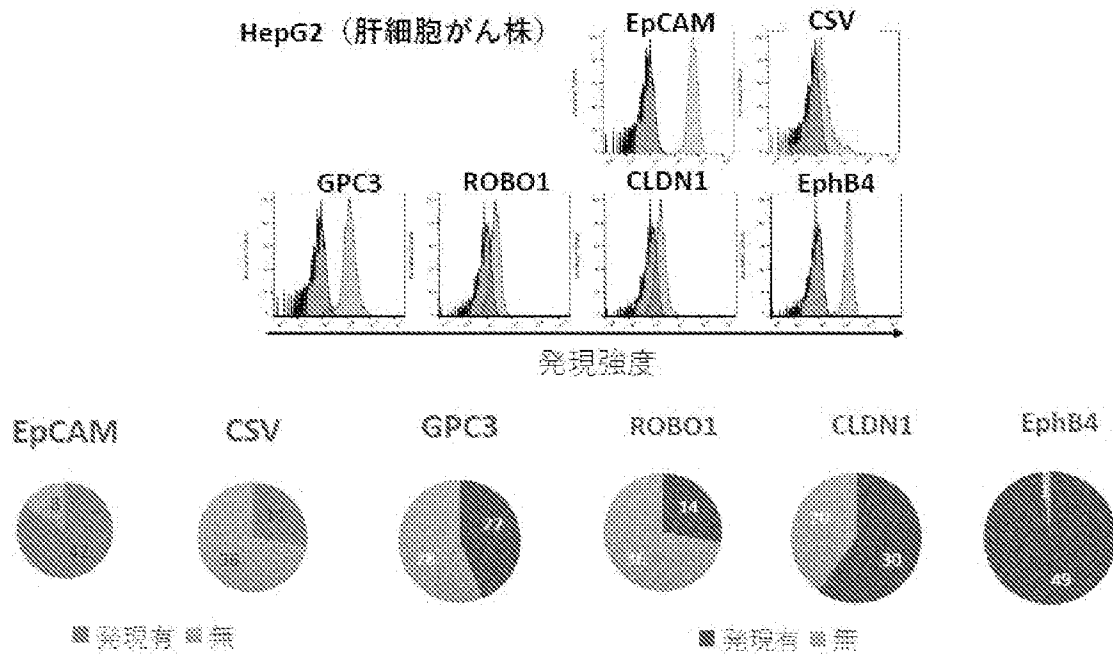


[図66]

5種の膜蛋白共通がん抗原の全て/一部を発現する腫瘍細胞株およびPDXを移植



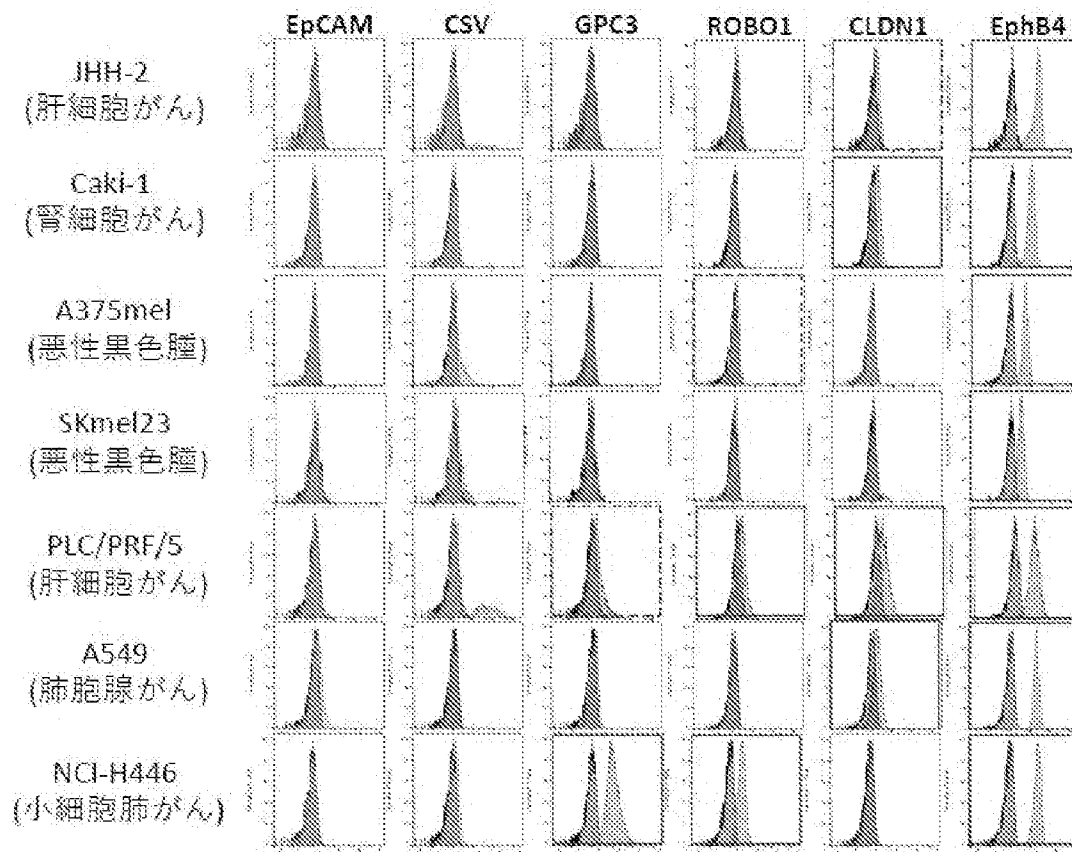
[図67]



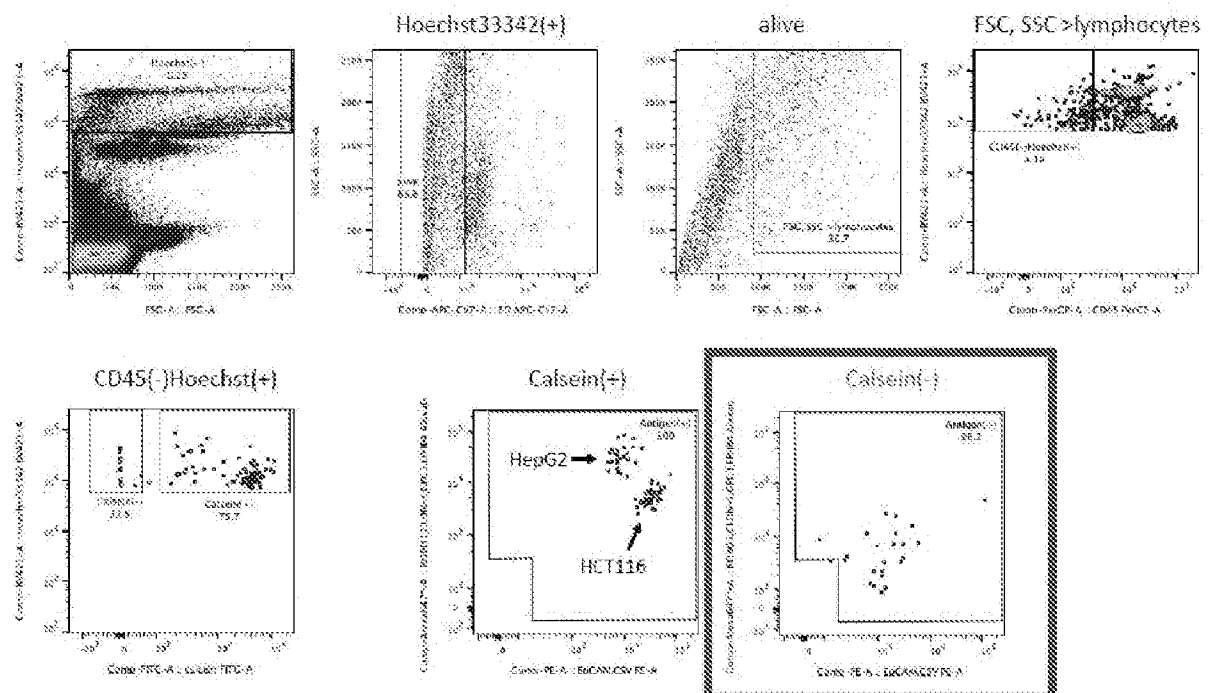
検討したがん種

肝がん、大腸がん、膵がん、肺がん、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、腎がん、口腔がん、悪性黒色腫、胃がん

[図68]



[図69]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018618

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/00(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61P 37/04**(2006.01)i; **C12N 5/0784**(2010.01)i; **A61K 38/08**(2019.01)i;
A61K 38/10(2006.01)i; **C07K 14/725**(2006.01)i
 FI: A61K39/00 H; A61K38/08; A61K38/10; A61P35/00; A61P37/04; C07K14/725; C12N5/0784

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)

A61K39/00; A61P35/00; A61P37/04; C12N5/0784; A61K38/08; A61K38/10; C07K14/725

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHARNEAU, J. et al. Peptide-based vaccines for hepatocellular carcinoma: a review of recent advances. Journal of Hepatocellular Carcinoma. 2021, 8, pp. 1035-1054 abstract, p. 1045, left column, line 1 to p. 1046, right column, bottom line	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	清水 利保 他, アミノ酸トランスポーター L-type amino acid transporter-1(LAT1)を分子標的とした癌免疫療法の開発, 日本薬学会年会要旨集, 2011, vol. 131 no. 3, p. 155 entire text, non-official translation (SHIMIZU, Riho et al. Development of cancer immunotherapy targeting an amino acid transporter L-type amino acid transporter-1 (LAT1). Abstracts of Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan.)	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	WO 2020/245264 A1 (IO BIOTECH APS) 10 December 2020 (2020-12-10) claims, examples, p. 31, lines 13-27	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	井上 光弘 他, HP-207-4 新規癌関連抗原SPARCを標的とした癌免疫療法の開発, 日本外科学会雑誌, 2009, vol. 110, special extra edition (2), p. 738 entire text, (INOUE, Mitsuhiro et al. HP-207-4 Identification of a novel tumor-associated antigen, SPARC, as a possible target for immunotherapy of gastric, colorectal, and pancreatic cancers. Journal of Japan Surgical Society.)	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

24 July 2023

Date of mailing of the international search report

01 August 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018618

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/018198 A1 (KUMAMOTO UNIVERSITY) 15 February 2007 (2007-02-15) claims, examples	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
A	JP 2016-528221 A (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)) 15 September 2016 (2016-09-15) paragraph [0004]	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
A	JP 2006-519610 A (VASGENE THERAPEUTICS, INC.) 31 August 2006 (2006-08-31) examples 3, 4	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
A	WO 2007/018199 A1 (KUMAMOTO UNIVERSITY) 15 February 2007 (2007-02-15) claims, examples	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
A	SHIMIZU, Y. et al. Next-Generation Cancer Immunotherapy Targeting Glypican-3. Frontiers in Oncology. 2019, vol. 9, article 248, pp. 1-10 abstract, each drawing	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018618

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. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-5, 8-11, 13-16, 18, and 22-29

Claims 1-5 have the special technical feature of a “cancer vaccine comprising: (1) a common cancer antigen including three or more components selected from GPC3, ROBO1, EPHB4, CLDN1, and LAT1, or (2)-(4) partial peptides of the three or more of common cancer antigens, a dendritic cell stimulated with the partial peptide, and mRNA encoding the common cancer antigen or the partial peptide”, and are thus classified as invention 1.

Claims 8-11, 13-16, 22-29, and claim 18 referring to claims 13-16 have the technical feature of a common cancer antigen including three or more components selected from GPC3, ROBO1, EPHB4, CLDN1, and LAT1, have a technical feature same or corresponding to that of claim 1, and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 6, 12, 17, and 18

Claims 6, 12, and 17 share, with claim 1 classified as invention 1, the common technical feature of three or more common cancer antigens. However, document 1 below (p. 1045 of disclosures of document 1 below, left column, line 1 to right column, line 2) discloses the development of novel cocktail vaccines targeting various cancer-related antigens expressed in hepatocellular carcinoma (HCC), such as FOXM1, AFP, ROBO1, WT-1, and GPC3. Based on this feature, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1 and the like, and thus cannot be said to be a special technical feature. Also, there are no other same or corresponding special technical features between claims 6, 12, and 17 and claim 1.

Thus, claims 6, 12, and 17 cannot be classified as invention 1, and are thus classified as invention 2.

This is also applied to claim 18 referring to claim 17.

(Inventions 3-64) Claim 7

Claim 7 sets forth a peptide having an amino acid sequence described in any of 62 SEQ ID NOs. The invention understood on the basis of each of these options share, with claim 1 classified as invention 1, the common technical feature of a common cancer antigen. However, as disclosed in documents 1-5 below, a common cancer antigen is well known in the art, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1 and the like, and thus cannot be said to be a special technical feature. Also, there are no other same or corresponding special technical features between an invention identified based on each option of claim 7 and claim 1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/018618

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020/245264	A1	10 December 2020	JP	2022-535102	A	
				US	2022/0315634	A1	
				GB	201908012	D	
				EP	3980449	A1	
				CN	113966342	A	
				KR	10-2022-0018566	A	
				AU	2020287902	A	
				CA	3141744	A	
				IL	288673	A	
				SG	11202112416X	A	
WO	2007/018198	A1	15 February 2007	JP	2013-47230	A	
JP	2016-528221	A	15 September 2016	US	2016/0185856	A1	
					paragraph [0002]		
				WO	2015/014659	A1	
				EP	3027648	A1	
JP	2006-519610	A	31 August 2006	US	2005/0084873	A1	
					examples 3, 4		
				WO	2004/080418	A2	
				EP	1605961	A2	
				KR	10-2007-0034465	A	
				CN	101072797	A	
WO	2007/018199	A1	15 February 2007	US	2009/0239806	A1	
				EP	1923463	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; C12N 5/0784(2010.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i FI: A61K39/00 H; A61K38/08; A61K38/10; A61P35/00; A61P37/04; C07K14/725; C12N5/0784		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K39/00; A61P35/00; A61P37/04; C12N5/0784; A61K38/08; A61K38/10; C07K14/725		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CHARNEAU J. et al., Peptide-based vaccines for hepatocellular carcinoma: a review of recent advances, Journal of Hepatocellular Carcinoma, 2021, 8, pp.1035-1054 要約、1045頁左欄1行～1046頁右欄最下行	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	清水 利保 他, アミノ酸トランスポーター L-type amino acid transporter-1(LAT1)を分子標的とした癌免疫療法の開発, 日本薬学会年会要旨集, 2011, Vol.131 No.3, p.155 全文	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	WO 2020/245264 A1 (IO BIOTECH APS) 10.12.2020 (2020-12-10) 特許請求の範囲、実施例、31頁13行～27行	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	井上 光弘 他, HP-207-4 新規癌関連抗原SPARCを標的とした癌免疫療法の開発, 日本外科学会雑誌, 2009, 第110巻 臨時増刊号(2), p.738 全文	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
Y	WO 2007/018198 A1 (国立大学法人 熊本大学) 15.02.2007 (2007-02-15) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-11, 13-16, 18, 22-29
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 24.07.2023		国際調査報告の発送日 01.08.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 宮岡 真衣 4U 4044 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2016-528221 A (アンスティチュ ナショナル ドウ ラ サンテ エ ドウ ラ ルシェ ルシュ メディカル) 15.09.2016 (2016 - 09 - 15) [0004]	1-5, 8-11, 13- 16, 18, 22-29
A	JP 2006-519610 A (パスジーン セラピューティクス, インコーポレイテッド) 31.08.2006 (2006 - 08 - 31) 実施例 3、4	1-5, 8-11, 13- 16, 18, 22-29
A	WO 2007/018199 A1 (国立大学法人 熊本大学) 15.02.2007 (2007 - 02 - 15) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-11, 13- 16, 18, 22-29
A	SHIMIZU Y. et al., Next-Generation Cancer Immunotherapy Targeting Glypican-3, Frontiers in Oncology, 2019, Volume 9, Article 248, pp.1-10 要約、各図	1-5, 8-11, 13- 16, 18, 22-29

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

第III欄

発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

（発明1） 請求項1～5、8～11、13～16、18、22～29

請求項1～5は、（1）GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原、又は、（2）～（4）該3種以上の共通がん抗原の部分ペプチド、当該部分ペプチドで刺激した樹状細胞、および、前記共通がん抗原または前記部分ペプチドをコードするmRNAを含む、がんワクチンという特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

請求項8～11、13～16、22～29、および、請求項13～16を引用する請求項18は、GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、およびLAT1から選択される3種以上を含む共通がん抗原に係る発明である点で、請求項1と同一又は対応する技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2） 請求項6、12、17、18

請求項6、12、17は、発明1に区分された請求項1と3種以上の共通がん抗原に係る発明である点で共通の技術的特徴を有している。しかしながら、下記引用文献1には、FOXMI、AFP、ROBO1、WT-1、およびGPC3のような肝細胞癌（HCC）に発現する種々の癌関連抗原を標的とする新規カクテルワクチンを開発していることが記載されていることから（下記引用文献1の1045頁左欄1行～右欄2行）、当該技術的特徴は先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項6、12、17と請求項1の間に、他に同一又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

したがって、請求項6、12、17は、発明1に区分できず、発明2に区分する。

請求項17を引用する請求項18についても同様である。

（発明3～64） 請求項7

請求項7には、62個の配列番号の何れかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドが記載されており、これらの各選択肢に基づいて把握される発明は、発明1に区分された請求項1と共通がん抗原に係る発明であるという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、下記引用文献1～5に記載されるとおり、共通がん抗原は当該分野で周知であったことから、当該技術的特徴は先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴ではない。また、請求項7の各選択肢に基づいて把握される発明と請求項1の間に他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項1～5、8～11、13～16、18、22～29

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/018618

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/245264	A1	10.12.2020	JP	2022-535102	A	
				US	2022/0315634	A1	
				GB	201908012	D	
				EP	3980449	A1	
				CN	113966342	A	
				KR	10-2022-0018566	A	
				AU	2020287902	A	
				CA	3141744	A	
				IL	288673	A	
				SG	11202112416X	A	
WO	2007/018198	A1	15.02.2007	JP	2013-47230	A	
JP	2016-528221	A	15.09.2016	US	2016/0185856	A1	
				[0002]			
				WO	2015/014659	A1	
				EP	3027648	A1	
JP	2006-519610	A	31.08.2006	US	2005/0084873	A1	
				Examples 3, 4			
				WO	2004/080418	A2	
				EP	1605961	A2	
				KR	10-2007-0034465	A	
				CN	101072797	A	
WO	2007/018199	A1	15.02.2007	US	2009/0239806	A1	
				EP	1923463	A1	