(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3641692号
(P3641692)
(45)発行日　平成17年4月27日(2005.4.27)　(24)登録日　平成17年2月4日(2005.2.4)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
A61K 35/12	A61K	35/12	
A61K 48/00	A61K	48/00	ADU
A61K 49/00	A61K	49/00	Z
C07H 21/04	C07H	21/04	B

請求項の数 37　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-505204
(86)(22)出願日	平成6年7月13日(1994.7.13)
(65)公表番号	特表平9-504165
(43)公表日	平成9年4月28日(1997.4.28)
(86)国際出願番号	PCT/US1994/007878
(87)国際公開番号	WO1995/003422
(87)国際公開日	平成7年2月2日(1995.2.2)
審査請求日	平成13年6月26日(2001.6.26)
(31)優先権主張番号	08/096,039
(32)優先日	平成5年7月22日(1993.7.22)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/250,162
(32)優先日	平成6年5月27日(1994.5.27)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ルードヴィッヒ　インスティテュート　フォー　キャンサー　リサーチ
アメリカ合衆国　ニューヨーク州１０１５８、ニューヨーク、サード　アベニュー　６０５
(74)代理人
弁理士　北村　修一郎
(74)代理人
弁理士　中村　稔
(72)発明者　ヴァン　デン　エィンデ　ペノワ
ベルギー国　ベー１２００　ブリュッセル　ユーセーエル　７４５９　アベニュー　ヒポックラテ　７４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＧＡＧＥ腫瘍拒絶抗原前駆体の発現を決定する事による疾患診断法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号:1で示されるヌクレオチド配列からなる単離核酸分子。

【請求項２】

配列番号:1で示されるヌクレオチド配列に対して、ストリンジェント条件下でハイブリダイズし、腫瘍拒絶抗原前駆体をコードする単離核酸分子であって、該単離核酸分子は、MAGE腫瘍拒絶抗原前駆体又はBAGE腫瘍拒絶抗原前駆体をコードしない単離核酸分子。

【請求項３】

配列番号:1のヌクレオチド51－467からなる単離核酸分子。

【請求項４】

請求の範囲第１項記載の単離核酸分子に対して相補的である単離mRNA分子。

【請求項５】

請求の範囲第１項記載の核酸分子で形質移入された宿主細胞。

【請求項６】

請求の範囲第２項記載の核酸分子で形質移入された宿主細胞。

【請求項７】

請求の範囲第３項記載の核酸分子で形質移入された宿主細胞。

【請求項８】

プロモーターに機能的に結合された請求の範囲第１項記載の単離核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項９】
プロモーターに機能的に結合された請求の範囲第２項記載の単離核酸分子を含む発現ベクター。
【請求項１０】
プロモーターに機能的に結合された請求の範囲第３項記載の単離核酸分子を含む発現ベクター。
【請求項１１】
宿主細胞が、HLA－Cw6を発現する哺乳動物細胞である、請求の範囲第５項記載の宿主細胞。
【請求項１２】
宿主細胞が、HLA－Cw6を発現する哺乳動物細胞である、請求の範囲第６項記載の宿主細胞。
【請求項１３】
宿主細胞が、HLA－Cw6を発現する哺乳動物細胞である、請求の範囲第７項記載の宿主細胞。
【請求項１４】
HLA－Cw6をコードする核酸分子を更に含む、請求の範囲第８項記載の発現ベクター。
【請求項１５】
HLA－Cw6をコードする核酸分子を更に含む、請求の範囲第９項記載の発現ベクター。
【請求項１６】
HLA－Cw6をコードする核酸分子を更に含む、請求の範囲第10項記載の発現ベクター。
【請求項１７】
（ｉ）請求の範囲第１項記載の単離核酸分子、及び
（ii）HLA－Cw6をコードする核酸分子
それぞれの単離された部分を含む発現キット。
【請求項１８】
（ｉ）請求の範囲第２項記載の単離核酸分子、及び
（ii）HLA－Cw6をコードする核酸分子
それぞれの単離された部分を含む発現キット。
【請求項１９】
（ｉ）請求の範囲第３項記載の単離核酸分子、及び
（ii）HLA－Cw6をコードする核酸分子
それぞれの単離された部分を含む発現キット。
【請求項２０】
請求の範囲第１項、第２項又は第３項記載の核酸分子によりコードされた単離腫瘍拒絶抗原前駆体。
【請求項２１】
正常な睾丸細胞を含まない対象体から分離されたサンプルを、請求の範囲第２項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするプローブ核酸分子と接触させ、疾患の検出として該核酸分子への該プローブのハイブリダイゼーションを検出することを含む疾患検出方法。
【請求項２２】
配列番号:1のヌクレオチド配列51－476を含む核酸分子によりコードされた腫瘍拒絶抗原前駆体の発現によって特徴付けられる疾患検出方法であって、患者から分離されたサンプルを、該配列又はその発現生成物に対して特異的な薬剤と接触させ、疾患の検出として該薬剤と該配列又は該発現生成物との間の相互反応を検出する事を含む、検出方法。
【請求項２３】
該疾患がメラノーマである請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項２４】
該疾患がメラノーマである請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項２５】
該疾患が乳癌である請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項２６】
該疾患が乳癌である請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項２７】
該疾患が喉頭又は咽頭腫瘍である請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項２８】
該疾患が喉頭又は咽頭腫瘍である請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項２９】
該疾患がサルコーマである請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項３０】
該疾患がサルコーマである請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項３１】
該疾患が睾丸精上皮腫である請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項３２】
該疾患が睾丸精上皮腫である請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項３３】
該疾患が膀胱癌である請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項３４】
該疾患が膀胱癌である請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項３５】
該疾患が結腸癌である請求の範囲第21項記載の方法。
【請求項３６】
該疾患が結腸癌である請求の範囲第22項記載の方法。
【請求項３７】
配列番号:2及び配列番号:3から成る群から選ばれる単離核酸分子。
【発明の詳細な説明】
関連出願
この出願は、1993年７月22日出願の特許出願番号第08/096,039号の一部継続出願である。
発明の分野
本発明は、腫瘍拒絶抗原前駆体をコードする核酸分子に関し、特に本発明は、その腫瘍拒絶前駆体が、とりわけHLA－Cw6分子で表示される、少なくとも１つの腫瘍拒絶抗原に変えられる遺伝子に関する。問題のこの遺伝子は、他の公知の腫瘍拒絶抗原前駆体コード配列に関連するとは思われない。
背景及び従来技術
外来の、即ち異種物質を認識して反応する哺乳動物の免疫系の過程は複雑なものである。この免疫系の重要な一面は、Ｔリンパ球又は「Ｔ細胞」応答である。
この応答は、Ｔ細胞が認識して、ヒト白血球抗原（HLA）、又は主たる組織適合性複合体（MHCs）と称する細胞表面分子とペプチドとの複合体と相互反応する事を必要とする。このペプチドは、HLA/MHC分子を表す細胞によって変化させられる巨大分子由来のものである。これに関しては、メール等（Male et al.）のAdvanced Immunology（J.P.Lipincott Company,1997）、特に６～10章参照。Ｔ細胞とHLA/ペプチド複合体との相互反応は、HLA分子とペプチドの特定の組合せの為の特異なＴ細胞を要求する事を制限する。特異なＴ細胞が存在しなければ、そのパートナー複合体が存在してもＴ細胞応答は存在しない。
同様に、特異な複合体が存在せずＴ細胞が存在しても応答は存在しない。この機構は、外来物質に対する免疫系応答、自己免疫異常及び細胞異常に対する応答に含まれる。多くの研究が、蛋白質がHLA結合ペプチドに変えられるこの機構について注がれてきた。これに関しては、バリナガ（Barinaga）、Science257:880（1992）；フレモント等（Fremont et al.）、Science257:919（1992）；マツムラ等（Matsumura et al.）、Science257:927（1992）；ラトロン等（Latron ey al.）、Science257:964（1992）を参照。

Ｔ細胞が細胞異常を認識するこの機構は、又癌に係わるものであった。例えば、PCT出願PCT/US92/04354（1992年５月22日出願、1992年11月26日公開（参考として組み入れられる））には、細胞表面で発現するペプチドに変えられ、特異CTLs（細胞溶解性Ｔリンパ球、以下「CTLs」という）による腫瘍細胞の溶解へと導く事の出来る一連の遺伝子が開示されている。この遺伝子は、「腫瘍拒絶抗原前駆体」、即ち「TRAP」分子をコードすると言われ、それから得られるペプチドは「腫瘍拒絶抗原」即ち「TRAs」と称される。

この一連の遺伝子に関する詳しい情報については、トラバーサリ等（Traversari et al.）、Immunogenetics35:145（1992）；ファン　デル　ブルッゲン等（van der Bruggen et al.）、Science254:1643（1991）を参照。又、米国特許出願第807,043号（1991年12月12日出願）（現在特許番号未定）を参照。

参考として組み入れられる米国特許出願第938,334号の開示では、MAGE－１遺伝子は、HLA－A1分子で表されるノナペプチドに変えられる腫瘍拒絶抗原前駆体をコードすると説明されている。この引用例は、特定のHLA分子に対する特定のペプチドの公知の特異性を与えた事を教示し、１つのHLA分子に結合し、他には結合しない特定のペプチドを期待させる。このことは、異なる個体は異なるHLA表現型を保有するので重要である。結果として、特異HLA分子のパートナーとしての特定ペプチドの同定は、診断的且つ治療的結果を持つが、これらは、その特定のHLA表現型の個体にとって意味があるだけである。細胞異常が１つの特定のHLA表現型に限定されるものではなく、目標とされる治療が、組織における異常細胞の表現型の知識を要求するが故に、この分野では更に研究の必要性が存在する。

参考として組み入れられる米国特許出願第8,446号（1993年１月22日出願）では、MAGE－１発現生成物は、第２のTRAに変えられると言う事実が開示されている。この第２のTRAはHLA－Ｃクローン10分子と表される。この開示は、与えられたTRAPは、複数のTRAsを生成する事が出来る事を示す。

ここに参考として組み入れられる米国特許出願第994,928号（1992年12月22日出願）では、チロシナーゼ、或る種の正常細胞（例えば、メラノサイト）によって産生される分子は腫瘍細胞に変えられ、HLA－A2分子で表されるペプチドを生成する事が教示されている。

全体を参考として組み入れる米国特許出願第08/032,978号（1993年３月18日出願）では、チロシナーゼ由来のものではない第２のTRAは、HLA－A2分子で表される事が教示されている。このTRAは、TRAP由来のものであるが、非－MAGE遺伝子によりコードされている。この開示は、特定のHLA分子は、異なる資源由来のTRAsを表示してもよい事を示す。

ここに参考として組み入れられる1993年６月17日出願の米国特許出願（出願番号未定）では、関連のない腫瘍拒絶抗原前駆体、所謂「BAGE」前駆体が開示されている。このBAGE前駆体はMAGEファミリーとは関連がない。

上で引用された論文、特許及び特許出願で提示される研究は、大部分はMAGEファミリー遺伝子及び関係のないBAGE遺伝子に関するものである。

ここにおいて、付加的腫瘍拒絶抗原前駆体が、細胞によって発現される事が見出された。これらの腫瘍拒絶抗原前駆体を、「GAGE」腫瘍拒絶抗原前駆体と称する。これらは、MAGEファミリー遺伝子ともBAGE遺伝子とも同族関係を示さない。斯くして、本発明は、TRAPsをコードする遺伝子、腫瘍拒絶抗原前駆体それ自身、及びこれらの利用に関するものである。

本発明は、更に以下の記述に従って詳述される。

【図面の簡単な説明】

図１は、CTLクローン76/6を用いた細胞溶解の研究を示す。

図２は、種々の形質移入体と比較対象物で得られた腫瘍壊死因子（TNF）のリリースアッセイを示す。

好適な実施態様の詳細な説明

実施例１

メラノーマ細胞株、MZ2－MELを、標準の手順で、患者のMZ2から採取されたメラノーマ細胞から株化した。この細胞株は、例えば、ここにその全体を参考として組み入れるPCT出願PCT/US92/04354（1992年５月22日出願、1992年11月26日公開）に開示されている。この

細胞株が株化されたら、そのサンプルを放射線照射し、これを非増殖性にした。これらの照射細胞を、それらに対して特異な細胞溶解性Ｔ細胞クローン（CTLs）の単離に使用した。末梢血単核細胞（PBMCs）のサンプルを患者のMZ2から採取し、照射メラノーマ細胞に接触させた。この混合物を、メラノーマ細胞の細胞溶解につき観察し、メラノーマ細胞によって表示されるペプチドとHLA分子の複合体に対する特異なCTLsが、サンプル中に存在した事を示した。

使用したこの細胞溶解アッセイは、ヘリン等（Herin et al.）、Int.J.Cancer39:390－396（1987）に従ったクロムリリースアッセイであり、その記述は参考として組み入れられる。このアッセイをここに記述する。目標メラノーマ細胞は、in vitroで育成し、次いでDMEM中に10^7細胞/mlで再懸濁し、10mM HEPESと30％FCSで補充し、Na（^{51}Cr）O_4の200μCi/mlで、37℃で45分間培養した。標識化細胞をDMEMで３回洗浄し、10mM HEPESを補充した。これを、次いで10mM HEPESと10％FCSで補充したDMEM中に再懸濁し、その後、10^3細胞を含む100μｌの液を、96ウエルマイクロプレートに分散した。PBLsのサンプルを100μｌの同じ培地に添加し、アッセイを繰り返し行った。プレートを、100gで４分間遠心分離に掛け、８％CO_2雰囲気中で、37℃で４時間培養した。

プレートを再度遠心分離に掛け、上澄み液の100μｌの液を収集し、計量した。^{51}Crリリースの割合は、以下の様に計算した。

％^{51}Crリリース＝［（ER－SR）／（MR－SR）］x100

ここで、ERは、観察された、実験的^{51}Crリリース、SRは、200μｌの培地単独での10^3標準化細胞を培養する事によって測定された自然リリース、MRは、100μｌの0.3％トリトン（Triton）Ｘ－100を添加して得られる最大リリースである。

高いCTL活性を示したこれらの単核血サンプルを拡張し、限界希釈を介してクローン化し、同じ方法を使用して再度スクリーニングした。CTLクローンMZ2－CTL76/6はこの様にして単離した。このクローンを以後「76/6」と称する。

同じ方法を、メラノーマ細胞株同様に目標K562細胞を試験するのに使用した。図１は、このCTLクローンが認識してメラノーマ細胞株、即ちMZ2－MELであってK562ではない株を溶解する事を示す。このクローンを、次いで、上に述べたと同じ方法で、他のメラノーマ細胞株及び自己由来EBV－形質転換Ｂ細胞に対して試験した。図１は、エプシュタインバールウイルス（Epstein Barr Virus）（EBV）で形質転換された自己由来Ｂ細胞は溶解せず、しかもMZ2－MEL3.0はCTLクローン76/6で溶解されるのに、抗原Ｆを発現しないこの細胞株MZ2－MEL.4F$^-$突然変異株は溶解しない事を示す。故に、このクローンは、この抗原に対して特異的である事が明らかである。

上に提示された結果は、HLA分子がTRAを表示する事とは無関係である。

溶解した細胞株、即ちMZ2－MELは、HLA－A1、HLA－A29、HLA－B37、HLA－B44、HLA－Cw6及びHLA－Ｃクローン10を発現する事が知られている。ここに報告されていないがこの実施例のプロトコールに従う実験では、HLA分子A29、B44及びＣクローン10の発現を喪失したMZ2－MELの補助株（subline）を試験した。この補助株は溶解し、存在している分子が、A1、B37又はCw6の１つである事を示した。

実施例２

76/6が、目標細胞と接触した時に腫瘍壊死因子（TNF）を産生するかを決定するために、更に検討を行った。使用した方法は、トラバーサリ等（Traversari et al.）、Immunogenetics35:145－152（1992）、により開示された方法であり、その記述は参考として組み入れられる。要するに、CTL株のサンプルを、培養培地で、目的とする目標細胞のサンプルと組み合わせた。24時間後、この培養からの上澄み液を除去し、次いでTNF－感受性WEHI細胞上で試験した。

細胞株MZ2－MEL43、即ち引用参考例におけると同様に上で検討されたMZ2－MEL細胞株の補助株は、極めて強力な応答を与えた。これを次の実験に使用した。

実施例３

実施例２の結果は、MZ2.MEL.43が目的物の目標抗原を表示した事を示した。そこで、これをcDNAライブラリー調製の為の全mRNA源として使用した。

全RNAは、この細胞株から単離した。このmRNAを、良く知られた技術に従って、オリゴ－dT結合キット（oligo－dT binding kit）を使用して単離した。mRNAを確保したら、Not I部位を含むオリゴdTプライマーを使用して、逆転写でcDNAに転写し、次いで第２ストランド合成（second strand synthesis）を行った。このcDNAを、次いでBstX Iアダプターに結合し、Not Iで消化し、セファクリル（Sephacryl）Ｓ－500HRカラム上でサイズ画分化し、BstX I及びpcDNA－Ｉ－AmpのNot I部位に間接的にクローン化した。この組み換えプラスミドを、次いでDH5α大腸菌バクテリアの中にエレクトロポレーションした。100の組み換えバクテリアの合計1500プールをマイクロウエルに播種した。殆ど全てのバクテリアは挿入物（insert）を含んでいたので、各々は約100のcDNAsを含んでいた。

それぞれのプールを飽和するまで増殖し、プラスミドDNAを、アルカリ溶解及び酢酸カリウム沈殿で、フェノール抽出なしで抽出した。

実施例４

実施例３で開示したライブラリーの調製に続いて、cDNAを、真核細胞に形質移入した。ここで述べられる形質移入を繰り返して行った。COS－７細胞のサンプルを、15,000細胞／ウエルで、10％ウシ胎児血清で補充したダルベッコ変性イーグルス培地（Dulbecco's modified Eagles Medium）（DMEM）において、組織培養平底マイクロウエル中に播種した。この細胞を、37℃で一昼夜培地し、培養を除去して、10％Nu血清、400μg/ml DEAE－デキストラン及び100μMクロロキン、更に100ngのプラスミドを含むDMEM培地の50μl/ウエルで置き換えた。

上で示した様に、この溶解研究は、HLA分子が抗原を表示した事を立証しなかった。結果として、抗原（A1、B37、Cw6）を表示出来たHLA分子のそれぞれのcDNAを、細胞を同時形質移入する為に、別々に使用した。

具体的には、ライブラリーでの形質移入で使用したのと同じプロトコールを使用して、pCD－SRαにクローン化されたHLA－A1に対するcDNAの28ng、pcDNA－Ｉ－AmpでのHLA－B37に対するcDNAの50ng、又はpcDNA－Ｉ－AmpでのHLA－Cw6に対するcDNAの75ngを使用した。

形質移入は、複数のウエル中で行ったが、HLA－Cw6形質移入体の500プールだけは、単一ウエル中で試験出来た。37℃での４時間培養の後、培地を除去し、10％DMSOを含むPBSの50nlで置き換えた。この培地を２分後に除去し、10％FCSで補充したDMEMの200μｌで置き換えた。

培地でのこの変換の後、COS細胞を37℃で24－48時間培養した。培地を、次いで捨て、1000～3000のCTLクローン76/6細胞を、IL－２の20～30U/mlで補充した10％プールヒト血清を含むイスコーブ（Iscove）培地の100μｌに添加した。上澄み液を24時間後に除去し、トラバーサリ等（Traversari et al.）、Immunogenetics35:145－152（1992）により開示された方法（その記述は参考として組み入れられる）により、WEHI細胞上でのアッセイで、TNF含有量を決定した。

HLA－A1で形質移入された1500プール、及びHLA－B37で形質移入された1500プールは、15～20pg/ml又は２～6pg/mlのそれぞれの濃度に対してTNFリリースを刺激した。60pg/mlより多くを生成した一つのプールを除いて、大部分のHLA－Cw6形質移入体は３～20pg/mlを生成した。このプールを次の研究の為に選択した。

実施例５

選択したプールのバクテリアをクローン化し、600のクローンを試験した。プラスミドDNAをそれらから抽出し、上に述べたのと同じ方法でCOS細胞の新しいサンプル中に形質移入し、この細胞を、CTLクローン76/6の刺激の為に再度試験した。94の陽性クローンが見つかった。これらの内の一つで、cDNAクローン2D6と称するものを更に試験した。比較試験では、COS細胞は、cDNAクローン2D6とHLA－Cw6、HLA－Cw6単独又は2D6単独で形質移入した。対照細胞株MZ2－MEL　F^-とMZ2－MEL　F^+も使用した。CTL上澄み液中へのTNFリリースは、上で引用した様にWEHI細胞上でそれを試験する事によって測定した。生き残っているWEHI細胞の光学濃度はMTTを使用して測定した。図２は、HLA－Cw6とcDNA－2D6で形質移入したCOS細胞と、細胞株MZ2－MEL　F^+が、CTLクローン76/6からのTNFリリースを刺激した事を示した。これは、HLA－Cw6が対象のTRAを表示した事を示している。

実施例６

cDNA－2D6を、公知の技術に従って配列分析した。配列調査は、プラスミドインサートが、既知の遺伝子又は蛋白質に対して相同性を示さない事を明らかにした。

配列番号１は、以後「GAGE」と称する同定された遺伝子の為のcDNAヌクレオチド情報を表す。推定上のオープンリーディングフレームは、この分子の51～467の塩基の所に位置している。

実施例７

cDNAの配列分析に続いて、実施例６の様に、正常組織の細胞がこの遺伝子を発現したかを決定する為の実験を行った。これを決定する為に、以下に示す様に、ノーザンブロッティング（Northern blotting）を、組織及び腫瘍細胞株上で行った。このブロッティング試験は、配列番号１の完全な配列のcDNAを使用した。次いでPCRを使用して結果を確認した。

表１．遺伝子ＧＡＧＥの発現

正常組織	
ＰＨＡ－活性化Ｔ細胞	－
ＣＴＬクローン８２／３０	－
肝臓	－
筋肉	－
肺	－
脳	－
腎臓	－
胎盤	－
心臓	－
皮膚	－
睾丸	＋
腫瘍細胞株	
メラノーマ	７／１６
肺癌	１／６
サルコーマ	０／１
甲状腺延髄癌	０／１
腫瘍サンプル	
メラノーマ	１／１

実施例８

上に述べたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びGAGE遺伝子情報を利用して、正常組織と腫瘍についての詳細な分析を行った。

先ず始め、全RNAを、慣用の方法を使用して特定のサンプルから採取した。これを、cDNAの調製の為に使用した。このcDNAを作製する為に使用したプロトコールは、逆転写酵素バッファー5xの４μｌ、各dNTPの１μｌ、（10mM）、ジチオスレイトールの２μｌ（100mM）、dT－15プライマーの２μｌ（20μｍ）、RNアジン（RNasin）（40単位／μｌ）の0.5μｌ及びＭ－MLV逆転写酵素（200単位／μｌ）の１μｌを一緒にする事を含む。次に、6.5μｌのテンプレートRNA（１μg/3.25μｌ水、又は合計２μｇのテンプレートRNA）を添加した。混合物の全容量は20μｌであった。これを混合し、42℃で60分間培養し、その後

氷上で冷却した。次いで、合計80μｌの水を添加し、合計100μｌとした。この混合物を、PCRに使用するまで－20℃で貯蔵した。PCRを行う為のプライマー

5′－AGA CGC TAC GTA GAG CCT－3′

（センス）及び

5′－CCA TCA GGA CCA TCT TCA－3″

（アンチセンス）

配列番号２及び３をそれぞれ使用した。この試薬は、30.5μｌの水、５μｌのPCRバッファー10x、１μｌの各dNTP（10μＭ）、2.5μｌの各プライマー（20μＭ）、及び0.5μｌの重合酵素「ダイナザイム（Dynazyme）」（２単位／μｌ）を含み、全容量を45μｌとした。cDNAの５μｌ全部を添加した（これは100ngの全RNAに相当した）。この混合物を組合せ、鉱油１滴で層状にした。この混合物を熱循環系（thermocycler block）に移し、94℃に予熱し、増幅を30サイクル行った。各サイクルの内容は次の通りであった。

最初の変性:94℃、４分
変性:94℃、１分
アニーリング:55℃、２分
エクステンション:72℃、３分
最終エクステンション:72℃、15分

このサイクルの後、10μｌの液を、1.5%アガロースゲル上に流し、臭化エチジウムで染色した。

上に示したプライマーを使用して増幅されたcDNAは、238塩基対合フラグメント（pair fragment）を生成する。汚染ゲノムDNAが存在しても、その増幅はない。

結果を以下の表２に示す。これらの結果は、GAGEを発現する唯一正常な組織は睾丸であり、一方、メラノーマ、肺、乳房、喉頭、咽頭、サルコーマ、睾丸精上皮腫、膀胱及び結腸を含む多数の腫瘍がこの遺伝子を発現する事を示している。

この様にして、GAGE遺伝子の発現を分析する事により、これらの腫瘍のどれについても分析が出来る。

表２

遺伝子ＧＡＧＥの発現のＲＴ－ＰＣＲ分析

正常組織	
心臓	－
脳	－
肝臓	－
肺	－
腎臓	－
脾臓	－
リンパ球	－
骨髄	－
皮膚	－
神経	－
メラニン細胞	－
線維芽細胞	－
前立腺	－
睾丸	＋
卵巣	－
乳房	－

副腎	－
筋肉	－
胎盤	－
臍帯	－

腫瘍

	細胞株	腫瘍サンプル	
メラノーマ	40/63	46/146	(32%)
肺癌			
類表皮癌		10/41	(24%)
腺癌		4/18	
小細胞肺癌	6/23	0/2	
乳癌		15/146	(10%)
頭部及び頸部腫瘍			
喉頭		6/15	(40%)
咽頭		3/13	
サルコーマ	1/4	6/18	(33%)
睾丸精上皮腫		6/6	(100%)
膀胱癌		5/37	(14%)
前立腺癌		2/20	
結腸癌	5/13	0/38	
副腎癌	0/6	0/45	
白血病	3/6	0/19	

前述のサンプルは、腫瘍拒絶抗原前駆体をコードする核酸分子の単離を示す。この「TRAP」をコードする分子は、然しながら、上に示した引用例に記載された、以前に開示されたMAGE及びBAGEコード配列とは相同ではない。故に、本発明の一観点は、配列番号１で示すヌクレオチド配列を含む単離核酸分子である。この配列は、引用例に開示されたそれら遺伝子のいずれの配列と比較しても分かる通り、MAGEでもなければBAGEコード配列でもない。また、本発明の一部は、非－MAGE及び非－BAGE腫瘍拒絶抗原前駆体をコードするが、ストリンジェント条件下において前述開示のヌクレオチド配列を含む核酸分子に対して交雑する核酸配列でもある。ここで使用される「ストリンジェント条件」と言う言葉は、当該分野においてはよく知られているパラメーターであり、更に詳しくは、ここで使用される「ストリンジェント条件」とは、1M NaCl、１％SDS及び10％デキストラン硫酸中でのハイブリダイゼーションを意味する。この後、2xSSCで、５分間、室温でのフィルターの２回洗浄及び、2xSSC、0.1％SDSで、30分間の１回洗浄が行われる。他の条件、試薬等が使用

でき、同じか又はより高い程度のストリンジェンシーとなる。当業者は、この様な条件についてはよく知っているであろうから、ここには開示しない。
本発明は、原核（例えば、大腸菌）、又は真核（例えば、CHO又はCOS細胞）である宿主細胞及び細胞株を形質移入するのと同様に、発現ベクターにおける配列の使用を包含する。発現ベクターは、関連配列、即ち上に開示されたそれらがプロモーターに操作的に結合される事を要求する。ヒト白血球抗原HLA－Cw6は、それらの遺伝子由来の腫瘍拒絶遺伝子を表示する事が見出されているので、発現ベクターも又HLA－Cw6をコードする核酸配列を含むことが出来る。ベクターが両方のコード配列を含む場合は、いずれか１つを正常に発現しない細胞を形質移入するのに使用出来る。腫瘍拒絶抗原前駆体コード配列は、例えば、宿主細胞が既にHLA－Cw6を発現する時は、単独で使用出来る。勿論、使用する事の出来る特定の宿主細胞についての制限は存在しない。２つのコード配列を含むベクターは、所望ならばHLA－Cw6発現細胞で使用され得る如くに、腫瘍拒絶抗原前駆体の遺伝子はHLA－Cw6を発現しない宿主細胞で使用出来る。
本発明は又、当業者が所望の発現ベクターを調製出来る様な所謂発現キットを包含する。その様な発現キットは、前に議論したコード配列のそれぞれの少なくとも別々の部分を含む。所望により、必要とされる前述の配列が含まれる限りにおいて、他の成分を添加してもよい。
本発明の核酸分子及びTRAPsを、前述開示のMAGE及びBAGEと区別する為に、本発明は、遺伝子とTRAPsのGAGEファミリーと称する。それ故、ここにおいて「GAGE」が使用される時は常に、前述開示の配列によってコードされた腫瘍拒絶抗原前駆体を意味する。「GAGEコード分子」及び類似の言葉は、核酸分子それ自身を述べるのに使用される。
ここにおいて開示される発明は、多数の用途を有し、その幾つかがここに開示される。第一に、本発明は、当業者がTRAPの発現で特徴付けられる疾患を診断する事を可能とする。これらの方法は、TRAP遺伝子及び／又はそれら由来のTRAs、例えばHLA－Cw6で表示されるTRAの発現の決定を含む。前者の場合は、その様な決定は、ポリメラーゼ連鎖反応を含む任意の標準核酸決定アッセイ又は標識ハイブリダイゼーションプローブを用いたアッセイにより行う事が出来る。後者の場合は、TRA及びHLAの複合体の為の結合パートナー、例えば抗体を使用したアッセイが特に好ましい。他の方法は、上に開示されたタイプのTNFリリースアッセイである。このアッセイを行う為には、睾丸細胞は通常はGAGEを発現しないので、これらが存在しない事を確かめる事が好ましい。然しながら、このことは、睾丸と他の細胞は常法により区別する事が出来るから、必須ではない。又、非－睾丸性サンプル中に睾丸細胞を存在させる事は、実際には不可能である。
TRAP遺伝子の単離は又、TRAP分子それ自身、特に配列番号１によりコードされたアミノ酸配列を含むTRAP分子の単離を可能とする。TRAとして、又はTRAとHLA、例えばHLA－Cw6の複合体として存在した時のこれら単離分子は、アジュバントの様な物質と結合して、TRAP分子の発現で特徴付けられる疾患治療に有用なワクチンを造ることが出来る。更に、ワクチンは、それらの表面でTRA/HLA複合体を表示する細胞、例えば非－増殖性癌細胞、非－増殖性形質移入体等から調製出来る。細胞がワクチンとして使用される全ての場合において、これらは、CTL応答を用意するのに必要な成分の１つ又は両方のコード配列で形質移入された細胞、又は形質移入なしに両分子を発現する細胞であり得る。更に、TRAP分子、その会合TRAsは、TRAとHLAの複合体同様に、当該分野において公知の標準的な方法を使用して、抗体を産生するのに使用出来る。
ここで使用される「疾患」とは、腫瘍拒絶抗原前駆体が発現するあらゆる病的状態を意味する。その様な疾患の例には、癌、特にメラノーマがある。メラノーマは、色素産生細胞の癌として良く知られている。
この開示を基にした治療手段は、TRA表現細胞、例えばHLA－Cw6細胞の溶解へと導く、被験者の免疫系での応答を前提条件とする。その手段の１つは、結果において異常細胞の表現型を持つ被験者に対する、複合体に対して特異なCTLsの投与である。in vitroでその様なCTLsを発生させる事は当業者の技術範囲内である。特に、血球の様な細胞のサンプルは、複合体を表示する細胞に接触させ、増殖の為の特異CTLを誘発する事ができる。標的細

胞は、例えば上に述べたタイプのCOS細胞の様な形質移入体であり得る。これらの形質移入体は、それらの表面において所望の複合体を表示し、目的のCTLと結合した時に、その増殖を刺激する。ここで使用した様なCOS細胞は、他の適当な宿主細胞同様に広く利用できる。

養子免疫細胞移入と言われる治療法（Greenberg,J.Immunol.136（５）:1917（1986）;Riddel et al.,Science257:238（７－10－92）;Lynch et al.,Eur.J.Immunol.21:1403－1410（1991）;Kast et al.,Cell59:603－614（11－17－89））を詳述する為に、所望の複合体を表示する細胞をCTLsと結合して、それらに特異なCTLsを増殖させる。増殖したCTLsを、次いで関連HLA分子を含む特定の複合体を表示する或る種の異常細胞で特徴付けられる細胞異常性を持つ被験者に投与する。このCTLsは異常細胞を溶解し、それによって所望の治療目標を達成する。

前述の治療は、被験者の異常細胞の少なくとも幾つかは、関連HLA/TRA複合体を表示する事を仮定している。これは、関連する配列、この場合はGAGE配列のDNA発現細胞の同定法及び特定のHLA分子を表示する細胞の同定法が非常に良く知られているため、極めて容易に決定出来る。関連複合体を表示する細胞が前述のスクリーニング法で同定されたならば、それらはCTLsを含む患者からのサンプルと結合出来る。細胞を表示する複合体が、混合CTLサンプルによって溶解されれば、GAGE由来の腫瘍拒絶抗原が存在しており、被験者は、上に示した治療手段にとって適切な候補者であると推定出来る。

養子免疫細胞移入は、本発明に関して利用できる治療法の唯一の形態ではない。CTLsは、又多数の手段を用いてin vivoでも誘発する事が出来る。１つの手段、即ち複合体を表示する非－増殖性細胞の使用は、上に詳しく述べられている。

このアプローチで使用される細胞は、複合体を正常に発現する細胞、例えば照射メラノーマ細胞又は複合体の発現に必要な遺伝子の一方又は両方を形質移入された細胞であってもよい。チェン等（Chen et al.,）、Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:110－114（January,1991）は、治療的養生法において、HPV　E7ペプチドを発現する形質移入細胞の使用を示して、このアプローチを実証している。

様々な細胞のタイプが使用出来る。同様に、目的の遺伝子の一方又は両方を含むベクターが使用出来る。ウイルス又はバクテリアベクターは特に好ましい。これらの系では、目的の遺伝子は、例えばワクチニアウイルス又はバクテリアBCGによって運ばれ、この物質は、事実上宿主細胞を「感染」させる。この細胞は目的の複合体を表示することとなり、そして自己由来のCTLsによって認識され、次いで増殖する。類似の効果は、目的のHLA/ペプチド複合体を表示する細胞を表示するHLA－Cw6中への導入を促進するために、腫瘍拒絶抗原又はそれ自身の前駆体をアジュバンドと結合する事により達成出来る。TRAPは、HLA分子のペプチドパートナーを生成する為に変えられ、一方TRAは更なる変更を必要とせずに表示される。

本発明の他の特徴は、当業者にとっては明らかであり、ここに繰り返すまでもないであろう。

使用された言葉及び表現は、記述の為の言葉として使用されるもので、限定の為のものではなく、表示及び開示された要旨又はその一部のいかなる均等物をも排除する為の言葉及表現の使用を意図するものではなく、様々な変更が本発明の範囲内において可能である事が認識される。

配列番号:1の情報

配列特性

（Ａ）配列の長さ:648塩基対

（Ｂ）配列の型　：核酸

（Ｃ）鎖の数　　：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

配列記述：配列番号:1

```
AGCTGCCGTC CGGACTCTTT TTCCTCTACT GAGATTCATC TGTGTGAAAT ATGAGTTGGC   60
GAGGAAGATC GACCTATCGG CCTAGACCAA GACGCTACGT AGAGCCTCCT GAAATGATTG  120
GGCCTATGCG GCCCGAGCAG TTCAGTGATG AAGTGGAACC AGCAACACCT GAAGAAGGGG  180
AACCAGCAAC TCAACGTCAG GATCCTGCAG CTGCTCAGGA GGGAGAGGAT GAGGGAGCAT  240
CTGCAGGTCA AGGGCCGAAG CCTGAAGCTG ATAGCCAGGA ACAGGGTCAC CCACAGACTG  300
GGTGTGAGTG TGAAGATGGT CCTGATGGGC AGGAGATGGA CCCGCCAAAT CCAGAGGAGG  360
TGAAAACGCC TGAAGAAGAG ATGAGGTCTC ACTATGTTGC CCAGACTGGG ATTCTCTGGC  420
TTTTAATGAA CAATTGCTTC TTAAATCTTT CCCCACGGAA ACCTTGAGTG ACTGAAATAT  480
CAAATGGCGA GAGACCGTTT AGTTCCTATC ATCTGTGGCA TGTGAAGGGC AATCACAGTG  540
TTAAAAGAAG ACATGCTGAA ATGTTGCAGG CTGCTCCTAT GTTGGAAAAT TCTTCATTGA  600
AGTTCTCCCA ATAAAGCTTT ACAGCCTTCT GCAAAGAAAA AAAAAAAA                648
```

配列番号:2の情報

配列特性

（Ａ）配列の長さ:18塩基対

（Ｂ）配列の型　：核酸

（Ｃ）鎖の数　　：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

配列記述：配列番号:2

AGA CGC TAC GTA GAG CCT　18

配列番号:3の情報

配列特性

（Ａ）配列の長さ:18塩基対

（Ｂ）配列の型　：核酸

（Ｃ）鎖の数　　：一本鎖

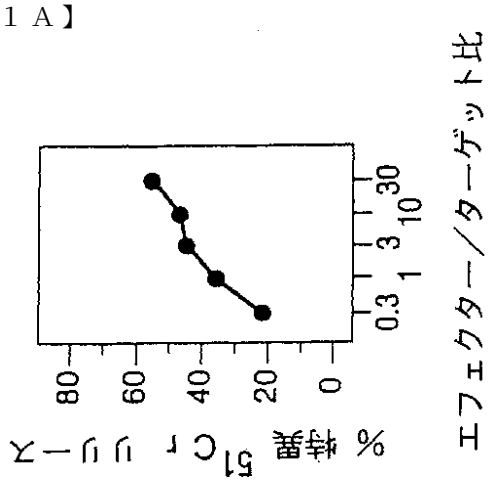
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

配列記述：配列番号:2

CCA TCA GGA CCA TCT TCA　18

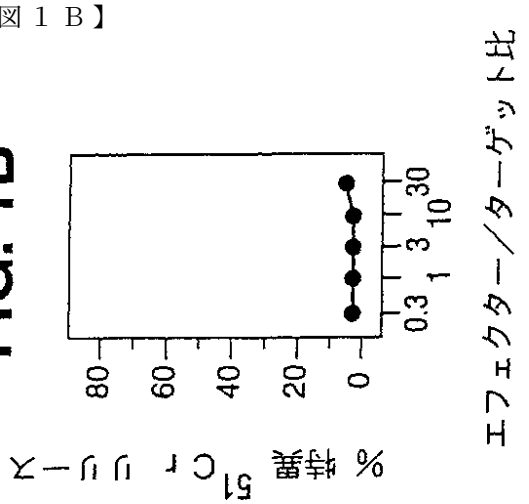
【図１Ａ】

FIG. 1A



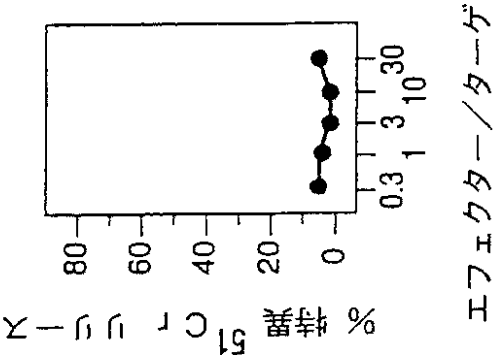
【図１Ｂ】

FIG. 1B



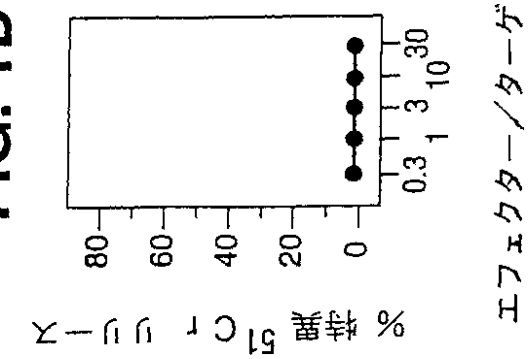
【図１Ｃ】

FIG. 1C



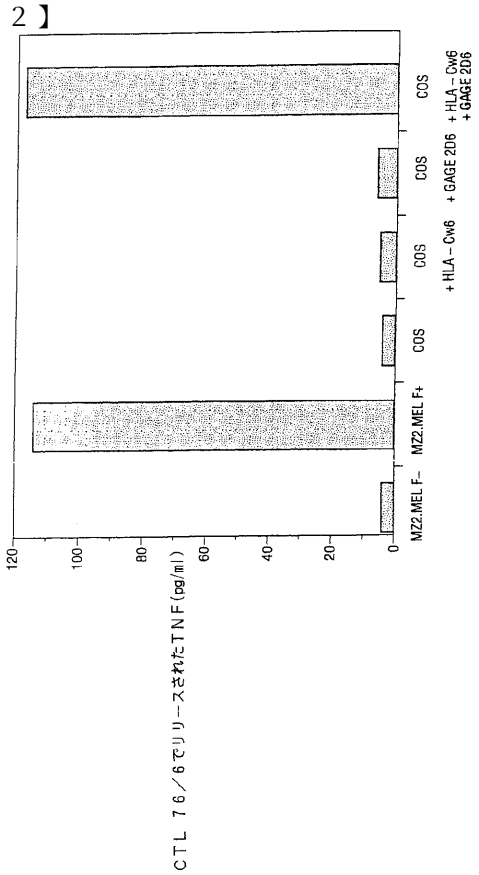
【図１Ｄ】

FIG. 1D



【図２】

FIG. 2


CTL 76／6でリリースされたTNF(pg/ml)
120
100
80
60
40
20
0
MZ2.MEL F-
MZ2.MEL F+
COS
COS
COS
COS
+ HLA－Cw6
+ GAGE 2D6
COS
+ HLA－Cw6
+ GAGE 2D6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	
C07K 14/47	C07K 14/47	
C07K 14/74	C07K 14/74	
C12N 5/10	C12P 21/02	C
C12P 21/02	C12Q 1/68	A
C12Q 1/68	G01N 33/566	
G01N 33/566	G01N 33/574	A
G01N 33/574	C12N 5/00	B

(72)発明者 ボーン ファルア ティリー
ベルギー国 ベー１２００ ブリュッセル ユーセーエル ７４５９ アベニュー ヒポックラテ ７４

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 Int.J.Cancer,1989年,Vol.44,p.634-640
J.Exp.Med.,1992年,Vol.176,p.1453-1457
Science,1991年,Vol.254,p.1643-1647

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12N 15/09 - 15/90
C12N 5/00
C12P 21/02
C12Q 1/68
C07K 14/47 - 14/74
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)