

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4840858号
(P4840858)

(45) 発行日 平成23年12月21日 (2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日 (2011.10.14)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/06 Z N A

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 L

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 8 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2006-73159 (P2006-73159)
 (22) 出願日 平成18年3月16日 (2006.3.16)
 (65) 公開番号 特開2007-246451 (P2007-246451A)
 (43) 公開日 平成19年9月27日 (2007.9.27)
 審査請求日 平成21年3月16日 (2009.3.16)

(73) 特許権者 899000079
 学校法人慶應義塾
 東京都港区三田2丁目15番45号
 (74) 代理人 110000176
 一色国際特許業務法人
 (72) 発明者 戸田 正博
 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大
 学医学部内
 (72) 発明者 植田 良
 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大
 学医学部内

審査官 福澤 洋光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 10 の配列を有するペプチド。

【請求項 2】

配列番号 10 の配列を有するペプチドを提示した抗原提示細胞。

【請求項 3】

配列番号 10 の配列を有するペプチドを含有する癌ワクチン。

【請求項 4】

配列番号 10 の配列を有するペプチドを提示した抗原提示細胞を含有する癌ワクチン。

【請求項 5】

配列番号 10 の配列を有するペプチドを提示した抗原提示細胞によって誘導され、S O X 6 を発現する細胞を認識する T 細胞を含有する癌ワクチン。

【請求項 6】

S O X 6 を発現する癌細胞に対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の癌ワクチン。

【請求項 7】

グリオーマに対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の癌ワクチン。

【請求項 8】

肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、または白血病に対す

10

20

る癌ワクチンであることを特徴とする請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の癌ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌ワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、腫瘍免疫学において、免疫細胞による腫瘍抗原認識機構がかなり解明されてきた。それによると、まず、抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cells または DC) は、細胞内で、腫瘍が発現するタンパク質を分解する際に生じた 8 ~ 10 個のアミノ酸からなる抗原ペプチドを、主要組織適合性抗原複合体 (major histocompatibility complex または MHC ; ヒトでは、human leukocyte antigen または HLA) と共に細胞表面に提示する。細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte または CTL) は、樹状細胞表面の HLA クラス I に結合した抗原ペプチドを認識し、活性化・増殖し、腫瘍内に侵入し、抗原ペプチドが由来するタンパク質を有する腫瘍細胞に対し細胞障害を生じる (Arch.Surg. (1990) 126: 200 ~ 205)。

10

【0003】

この機構を利用して、腫瘍の治療方法として癌ワクチンが開発されてきた。例えば、腫瘍特異的タンパク質由来の抗原ペプチドを細胞表面に提示する樹状細胞を in vitro で作製し、増殖させ、腫瘍患者に投与したり、その樹状細胞によって教育された細胞障害性 T 細胞を投与したりすることにより、腫瘍患者の体内で腫瘍免疫を誘導させる。あるいは、腫瘍特異的タンパク質を腫瘍患者に投与し、患者の体内で、腫瘍免疫機構の全過程を誘導させるのである (Science (1991) 254: 1643 - 1647; Exp.Med. (1996) 183: 1185 - 1192; J.Immunol. (1999) 163: 4994 - 5004; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1995) 92: 432 - 436; Science (1995) 269: 1281 - 1284; J.Exp.Med. (1997) 186: 785 - 793)。

20

【0004】

メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原 gp100 ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン - 2 を静脈内投与することにより、42% の患者で腫瘍の縮小が認められている (Nature Medicine (1998) 4: 321)。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、腫瘍免疫を効率的に誘導することのできる腫瘍特異的タンパク質は、一部の腫瘍において、ほんの少数の例が知られているだけである。

【0006】

そこで、本発明は、腫瘍免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激された T 細胞、およびこれらのペプチドや細胞を利用した癌ワクチン、及びそれらを用いた腫瘍患者の治療方法を提供することを目的としてなされた。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、転写因子である SOX6 が、グリオーマに発現していることを既に見いだしていたが (Ueda et al., Oncogene 23, 1420-1427, 2004)、他の腫瘍においても発現していることを見出した (実施例 2 参照)。この知見に基づき、SOX6 の様々な部分ペプチドに対し、HLA クラス I 拘束性に細胞障害性 T 細胞に認識されるかどうか調べたところ、樹状細胞に添加したとき、効率よく細胞障害性 T 細胞によって認識されるいくつかの部分ペプチドを同定することができ、本発明の完成に至った。

【0008】

本発明にかかるペプチドは、配列番号 10 の配列を有する。このペプチドを提示した抗

50

原提示細胞、及びこの抗原提示細胞によって誘導され、S O X 6を発現する細胞を認識するT細胞も、本発明の技術的範囲に属する。このT細胞は細胞障害性T細胞であることが好ましく、S O X 6を発現する細胞は、グリオーマ、肝癌細胞、肺癌細胞、膵癌細胞、食道癌細胞、メラノーマ細胞、前立腺癌細胞、乳癌細胞、腎癌細胞、または白血病細胞であることが好ましい。

【0009】

さらに、本発明にかかる癌ワクチンは、配列番号10の配列を有するペプチド及び/又は配列番号1～3の各配列を有するペプチドから選択される一つ以上のペプチド、上記抗原提示細胞、上記T細胞のうち、少なくとも一つを含有する。この癌ワクチンは、S O X 6を発現する癌細胞に対する癌ワクチンであり、特にグリオーマ、肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、または白血病に対する癌ワクチンであることが好ましい。

10

【0010】

本発明にかかる腫瘍治療方法は、ヒト及びヒト以外の脊椎動物に対しこの癌ワクチンを用いることを特徴とする。

【発明の効果】

【0011】

本発明によって、腫瘍免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激されたT細胞、およびこれらのペプチドや細胞を利用した癌ワクチン、及びそれらを用いた腫瘍患者の治療方法を提供することが可能になった。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

30

【0013】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0014】

== H L A クラス I と結合性が高いペプチドのスクリーニング ==

40

ウェブサイト上のデータベースであるBioInformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) のHLA Peptide Binding predictions Program を用い、S O X 6 遺伝子がコードするアミノ酸配列から、H L A クラス I と結合性が高い、9～10アミノ酸残基のペプチド配列を特定した。日本人のH L A クラス I のタイプは、H L A - A 2 と H L A - A 2 4 が多く、これらで日本人全体の約80%をカバーする。なお、日本人に多いH L A - A の遺伝子型として、H L A - A 2 はA 0 2 0 1 及びA 0 2 0 6、H L A - A 2 4 はA 2 4 0 2 が挙げられ、本明細書では、細胞の遺伝子型としてA 0 2 0 1、A 2 4 0 2 と記載した場合、記載したアレルを少なくとも一つ有することを意味する。

【0015】

50

ここでは、A24に対する結合性についてスクリーニングした。表1に、このスクリーニングによって得られたスコアの高いペプチド配列の例を示す。

【表1】

| HLAタイプ | 長さ | 名前 | 配列 | スコア | 配列番号 |
|--------|----|----------|------------|------|------|
| A24 | 9 | SOX6-504 | RFENLGPQL | 72 | 1 |
| | 9 | SOX6-628 | PYYEEQARL | 24 | 2 |
| | 10 | SOX6-360 | SYNHKQIEQL | 300 | 3 |
| | 10 | SOX6-539 | KAMNGSAAKL | 13.2 | 5 |

10

【0016】

これらのペプチドを実際に合成し、抗原として抗原提示細胞である樹状細胞表面に投与したとき、HLAクラスI分子に結合することにより細胞表面に提示され、細胞障害性T細胞に認識されることで特異的な細胞障害性T細胞を誘導できるペプチドを同定するため、樹状細胞と共培養された細胞障害性T細胞のヒト・グリオーマ細胞に対する反応性を調べた。その結果、配列番号1～3のペプチドを細胞表面に提示する樹状細胞が効率よく細胞障害性T細胞を刺激し、また各ペプチドの刺激により樹立された細胞障害性T細胞がSOX6を発現するグリオーマ細胞を効率よく認識することが明らかになった。

【0017】

以下の実施例には、これらの実験結果を示すことにより、配列番号1～3のペプチドを抗原提示細胞に添加すると、それらのペプチドがHLA上に提示され、共培養したT細胞を刺激することにより抗原特異的なT細胞を誘導し、この抗原特異的なT細胞はSOX6を発現するグリオーマ細胞と反応するか、またはSOX6を発現する細胞に対し細胞障害性を有することを示す。このことから、配列番号1～3のペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、及びその抗原提示細胞の刺激によって樹立された細胞障害性T細胞は、グリオーマに対する癌ワクチンとして有用であることがわかる。

20

【0018】

さらに、このようにして明らかになったペプチドの一つであるSOX6-504の配列（配列番号1：RFENLGPQL）に変異を導入し、同様にHLA-A2402に対する結合親和性などを調べたところ、下記の実施例に示すように、配列番号10（RYENLGPQL）の配列を有するペプチドSOX6-504M（表2）によって刺激し、誘導した細胞障害性T細胞は、SOX6-504によって刺激し、誘導した細胞障害性T細胞より、増殖能や細胞傷害活性が高いことが明らかになった。

30

【表2】

| HLAタイプ | 長さ | 名前 | 配列 | スコア | 配列番号 |
|--------|----|-----------|--------------------|-----|------|
| A24 | 9 | SOX6-504 | R <u>F</u> ENLGPQL | 72 | 1 |
| | 9 | SOX6-504M | R <u>Y</u> ENLGPQL | 720 | 10 |

【0019】

従って、配列番号10の配列を有するペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、及びその抗原提示細胞の刺激によって樹立された細胞障害性T細胞は、グリオーマに対する癌ワクチンとして有用である。

40

【0020】

＝癌ワクチンの投与方法＝

現在、癌ワクチンとして、腫瘍特異的癌抗原、癌抗原提示細胞、または癌抗原反応性細胞障害性T細胞を腫瘍患者に投与する方法が開発されている。本発明においては、SOX6の部分ペプチドを用いているので、治療（予防も含まれる）対象となる腫瘍は、SOX6が発現している腫瘍であれば何でもよく、特にSOX6を高レベルに発現しているグリオーマ、肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、また

50

は白血病も治療対象の一つとなる。主な治療対象は、こうした腫瘍を有するヒト患者であるが、腫瘍を有するヒト以外の脊椎動物でもかまわない。

【 0 0 2 1 】

治療対象となる腫瘍を有する患者に対し投与する癌ワクチンは、腫瘍特異的癌抗原となりうる配列番号 1 ~ 3 または 1 0 をもつペプチドを含有してもよい。この場合、あらかじめ患者の H L A クラス I のタイプを調べ、それに適したペプチドを用いる。ここでは、患者の H L A クラス I タイプが A 2 4 である場合に、配列番号 1 ~ 3 または 1 0 のペプチドを投与する。投与するペプチドは、一種類であっても複数種類であってもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されることはない。また、投与する際には、免疫誘導能を高めるアジュバントなどとともにペプチドを投与してもよい。また、投与されるペプチドは、生体内で分解されにくくするような修飾が施されていてもよい。

10

【 0 0 2 2 】

また、上記癌ワクチンは、配列番号 1 ~ 3 または 1 0 を有するペプチドを提示した抗原提示細胞を含有してもよい。ここで、細胞表面に提示されているペプチドは、配列番号 1 ~ 3 または 1 0 を有するペプチドそのものでもよく、糖やリン酸などで修飾されてもよい。抗原提示細胞としては、樹状細胞の他にマクロファージ、B 細胞等が考えられるが、抗原提示能の高さなどから、樹状細胞が好ましい。以下、樹状細胞の単離方法の例を記述する。

【 0 0 2 3 】

20

まず、脊椎動物個体の末梢血から単核球を単離する。この単核球は、治療対象となる個体自身から分離することが好ましいが、他の個体から単離してもよい。また、この単核球は C D 1 4 陽性であることが好ましい。単離した単核球を、GM-CSF と IL-4 で 7 日前後培養すると、未熟な樹状細胞に分化誘導することができる。このようにして分化誘導された樹状細胞は、抗原提示分子である M H C 分子を高発現している。この未熟な樹状細胞の H L A クラス I タイプを調べ、A 2 4 である場合は、配列番号 1 ~ 3 または 1 0 のペプチドを添加する。添加するのは、人工合成ペプチドに限らず、ペプチドを発現させた細胞の抽出物 (extract や lysate) や精製物などでもよい。こうして得られた抗原提示樹状細胞を、腫瘍を有する個体に投与する。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、生理的な樹状細胞の抗原提示が、樹状細胞投与部位の所属リンパ節にて行なわれることを考えると、リンパ節内への直接投与が好ましい。

30

【 0 0 2 4 】

また、上記癌ワクチンは、配列番号 1 ~ 3 または 1 0 由来のペプチドを提示した抗原提示細胞の刺激によって樹立された T 細胞を含有してもよい。配列番号 1 ~ 3 または 1 0 由来のペプチドを提示した抗原提示細胞に対し、T 細胞を共培養し、抗原提示細胞で刺激する。このようにして樹立された T 細胞を腫瘍を有する個体に投与してもよい。ここでの T 細胞は、細胞障害性 T 細胞が好ましいが、ヘルパー T 細胞等でもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腫瘍内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、細胞障害性 T 細胞の場合、抗原を発現する細胞を直接攻撃できるため、腫瘍内投与が好ましい。

40

【 実施例 】

【 0 0 2 5 】

< 実施例 1 > 抗原を提示した樹状細胞による細胞障害性 T 細胞の活性化

= = 実験初日 = =

H L A クラス I のタイプが A 2 4 (遺伝子型は A 2 4 0 2) の健常人末梢血から、以下のように単核球を分離した。まず、ヘパリン 5 m l で洗浄したシリンジで、末梢血を 5 0 m l 採血した。等量の Lymphoprep (Fresenius kabi Norge AS, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) を転倒混和し、遠心 (2 0 、 2 0 0 0 rpm、35 分間 、ブレイキなし) し、中間層を吸引して採取した。これに P B S を加えて再混濁し、遠心 (2 0 、 2 0 0 0 rpm、10 分間)

50

する操作を3回繰り返して、得られた単核球を洗浄した。

【0026】

この単核球を初代細胞培養用培養皿(FALCON MULTIWELL PRIMARIA 24 well)に 5×10^6 個/ウエルの密度で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で4時間培養した。培養液はAIM-V(GIBCO)とRPMI-1640を1:1に混合したもの(基本培養液)を用いた。培養皿の底面に接着した細胞を回収し、 4×10^5 個/ウエルの密度で新しい24ウエルの培養皿に播種し、GM-CSF(10ng/ml)、IL-4(1ng/ml)添加した基本培養液を用いて、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で7日間培養し、樹状細胞を分化させた。

【0027】

= = 実験7日目 = =

培養7日目に分化した樹状細胞を抗原提示細胞(antigen presenting cells; APCs)として用いた。得られた樹状細胞をirradiate (60Gy)したのち、合成・精製したペプチド(配列番号1~3及び5のSOX6由来のペプチド)を $10 \mu\text{M}$ 添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で2時間培養して細胞に結合させ、PBSで2回洗浄し、刺激細胞(stimulator cells)とした。なお、コントロールとして、SOX6由来のペプチドのかわりにサイトメガロウイルス(CMV)由来のペプチド(配列番号4: QYDPVAALFF、Provenzano et al., Transfusion 43, pp1567-1574参照)を用いた実験を行った。

【0028】

一方、この日(培養7日目当日)、実験15日目に樹状細胞を得るために、初日と同じ操作で単核球を培養した。

その過程で、単核球を4時間培養後、培養皿に接着せず、培養上清に浮遊している細胞を回収し、 1×10^7 個の細胞に対しIMag anti-human CD8 particules-DM (BD Biosciences社) $100 \mu\text{l}$ を、4、30分間反応させた。磁石を用いてCD8陽性細胞を吸着・回収し、応答細胞(responder cells)とした。

【0029】

このようにして得られた応答細胞 2×10^5 個を、上記刺激細胞のウエルに添加し、共培養した。なお、培養液として、IL-1 (10 unit/ml)、IL-2(20 unit/ml)、IL-4(1 ng/ml)、IL-6(125 unit/ml)、IL-12(1 ng/ml)を添加した基本培養液を用いた。

【0030】

= = 実験15日目 = =

培養7日目から培養し、分化させた樹状細胞を用いて、上記と同様の操作で刺激細胞を調整した。

また、培養7日目より刺激細胞と共培養した応答細胞を回収し、新たに調整した刺激細胞と、同様に共培養した。ただし、培養液は培養7日目に用いた上記培養液においてIL-12を含まない培養液を用いた。

なお、実験22日目に樹状細胞を得るための単核球の培養を、同様にして、新たに始めておいた。

【0031】

= = 実験22日目 = =

実験15日目と同様に、刺激細胞と共培養を続けている応答細胞を回収し、新たに調整した刺激細胞と共培養した。

なお、樹状細胞を得るための単核球の培養を始めたが、24ウエルの培養皿ではなく、96ウエルの培養皿を用い、 4×10^4 個/ウエルに調整して播種し、培養した。

【0032】

= = 実験29日目 = =

96ウエルで培養した単核球を用いて分化誘導した樹状細胞に、 $0 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ の各濃度のSOX6由来のペプチドあるいは $0 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ の各濃度のCMV由来のペプチドを添加して、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で2時間培養して細胞に結合させ、PBSで2回洗浄し、ターゲット細胞として用いた。

共培養を続けている応答細胞を回収し、エフェクター細胞として 2×10^4 個に調整し

10

20

30

40

50

た細胞を、こうして新たに調整したターゲット細胞のウェルに添加し、共培養した。

【0033】

= = 実験31日目 = =

上記共培養から培養上清を回収し、以下のようにIFN- ELISAを行った。

前日に、一次抗体(anti-human IFN- monoclonal Ab, Endogen)を0.5 μg/mlにPBSで希釈し、98ウェル・プレート(Nunc Maxisorp)に1ウェルあたり100 μlを添加し、4 で一晩放置してプレートをコートした。実験当日、1ウェルあたり300 μlの5% FCS含有PBSで室温1時間処理し、ブロッキングした。ウェルを0.2% Tween-20含有PBSで3回洗浄した後、共培養から回収した培養上清50 μlを添加し、ビオチン化2次抗体(Endogen、5% FCS含有PBSで0.5 mg/mlに調整したもの)を50 μl添加し、室温で2時間放置した。ウェルを0.2% Tween-20含有PBSで3回洗浄した後、ストレプトアビジン結合HRP (ExtraAvidine peroxidase conjugate, SIGMA E-2886、5% FCS含有PBSで4000倍希釈したもの)を100 μl添加し、室温で30分放置した。ウェルを0.2% Tween-20含有PBSで3回洗浄した後、TMBを基質にして発色させた(TMBは、TMB tablet 1錠をDMSO 1mlに溶解しリン酸クエン酸バッファー9mlを加えて調整した)。25 μlの1N H₂SO₄を添加し、反応を停止した。プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定し、既知の濃度のIFN- で予め作製した標準曲線からIFN- の濃度を算出し、結果を図1に示した。

【0034】

= = 結果 = =

HLA-A24に結合し得ると予想されたSOX6由来ペプチド(表1参照)のうち、SOX6-360、SOX6-504、およびSOX6-628を添加された樹状細胞との共培養により刺激された細胞障害性T細胞(エフェクター細胞)は、各々の抗原ペプチドを提示した樹状細胞をターゲットとして共培養した時、様々なコントロールに比して、IFN- 放出量が増加した(図1)。このことは、SOX6ペプチドに由来するペプチド(SOX6-360、SOX6-504、およびSOX6-628)を抗原提示細胞に添加すると、それらのペプチドを提示する抗原提示細胞が得られ、得られた抗原提示細胞によってT細胞を刺激することにより各ペプチドを特異的に認識するT細胞が誘導されたことを示す。

【0035】

<実施例2> SOX6由来ペプチドによる刺激によって樹立された細胞障害性T細胞のSOX6発現細胞に対する反応性

[1] SOX6の発現解析

SOX6を発現している細胞を明らかにすることにより、具体的にどのような細胞が、本発明の方法の対象となるかを調べた。

【0036】

= = RT-PCRによる解析 = =

ヒト正常組織(成人脳及び精巣、及びヒト胎児脳)、グリオーマ細胞株(GI-1、U87、及びT98G)、患者から単離されたグリオーマ組織(グリオブラストーマ組織、及びアストロサイトーマ組織)、ヒト腫瘍細胞株(888mel、928mel、586mel、LK2、PC9、LU99、RERF-LC-MA、TE8、PK56、PK1、PC3、MDA231、RCC6、RCC8、KU7、及びMolt4)におけるSOX6のmRNAの発現を定量的PCRにより解析した。

【0037】

RNAを単離する材料としての細胞は、以下のように入手した。まず、グリオーマ細胞株SF126とMarcusはHealth Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)から購入した。U-87-MG とT98G (glioma), GI-1 (gliosarcoma), 888mel, 928mel と586mel (melanoma) Molt4 (leukemia and lymphoma), PC9, LU99, LK2, RERF-LC-MA (lung cancer), RCC6 and RCC8 (renal cell cancer), TE8 (esophageal cancer), PK1 と PK59 (pancreas c

ancer)、MDA231 (breast cancer) は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入した。また、グリオーマ組織は、慶應義塾大学倫理委員会承認(No. 12-21-2)の説明文に対して同意の得られた手術患者の腫瘍検体より得た。これらの細胞株、または組織から、RNeasy (キアゲン社)を用いて全RNAを単離した。また、ヒト正常組織の全RNAはCLONTECH Laboratories, Inc.より購入した。これらの全RNAに対し、AMV Reverse transcriptase XL (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan)及びオリゴdTプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。

【0038】

これらのcDNAに対し、以下のように定量的PCRを行い、SOX6のmRNAの発現について検討した。SOX6に対するプライマーは

forward primer, 5'-GATGCCATCAACTCCACAGC-3' (配列番号6)

reverse primer, 5'-GCTGCAGAGCCATTCTATTGC-3' (配列番号7)

を用い、内部コントロールとしての-actinに対するプライマーは

forward primer, 5'-GGCACCCAGCACCAATGAAG-3' (配列番号8)

reverse primer, 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' (配列番号9)

を用いた。定量的PCRの条件は95 10分、その後、変性を95 で30秒、アニーリングを60 で1分の過程を50サイクル行い、最後に伸長反応を72 で1分間行った。結果を図2Aに示した。なお、各組織でのSOX6の発現量は、それぞれの組織におけるアクチンの発現量で標準化した。

【0039】

= ウェスタン・ブロッティングによる解析 =

次に、タンパク質レベルでのSOX6の発現をウェスタン・ブロッティングによって調べた。まず、上記と同様にして得られた細胞を回収し、破碎バッファー(最終濃度20mM HEPES、最終濃度0.25Mショ糖を純水950mlに加え、PH 7.5に調整した)と共にDounce型ホモジナイザーにいれ、氷上にて細胞を破碎した。破碎液を1000gで7分間遠心し、上清を破棄し、核や未破碎細胞を含む沈殿を回収した。この沈殿に、SDSゲル用ローディングバッファーを加えて溶解し、電気泳動用サンプルとした。これらのサンプルを、SDS-PAGEを用い、各レーンに20µgずつ泳動した。メンブレンにトランスファーし、10µg/mlに調製した抗SOX6抗体(CHEMICON社)によってSOX6タンパク質を認識し、AP結合ヤギ抗ウサギIgG (Fc) 抗体 (2000倍希釈、Cappel, Aurora, Ohio)を反応させた後、Nitro blue tetrazolium (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の混合液にて発色させた。結果を図2Bに示した。

【0040】

= 結果 =

SOX6は、これまでに発現が報告された、ヒト胎児脳、成人精巣、グリオーマ細胞株、グリオーマ組織のみならず、メラノーマ、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平上皮肺癌、食道癌、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎癌、慢性骨髄性白血病、T細胞性白血病由来の細胞株においても、発現が検出された。(図2A)。

【0041】

一方、正常組織におけるSOX6タンパク質の発現は、精巣以外では検出されなかった(図2B)。更に、SOX6は、グリオーマ細胞株(Marcus、U87、KNS-42、SF126)だけでなく、肺癌細胞株(PC9)、肝細胞癌株(HepG2)、膵臓癌株(Panc-1)においては、タンパク質レベルでも発現が検出された。

【0042】

以上より、SOX6は、ヒト成人正常組織においては精巣しか発現が検出されないものの、腫瘍細胞においては、広く発現が検出された。このことは、SOX6由来のペプチドを用いた癌ワクチンが、グリオーマだけでなく、多種の腫瘍に効果があることを示している。さらに、正常組織では、ほとんど発現が検出されないため、この癌ワクチンは副作用が少ないと考えられる。

【 0 0 4 3 】

[2] エフェクター細胞から放出される IFN- γ 量による、S O X 6 発現細胞に対する反応性の評価

= = 実験 2 9 日目 = =

この日まで、実施例 1 と同様にしてエフェクター細胞を調整した。なお、単核球を得る健常人の H L A クラス 1 のタイプを A 2 4 (遺伝子型は A 2 4 0 2) とし、添加したペプチドとして配列番号 1 ~ 3 のペプチドを用い、コントロールのペプチドとして C M V 由来のペプチド (配列番号 4 : Q Y D P V A A L F F) を用いた。

【 0 0 4 4 】

一方、マイトマイシン (2 0 0 pg/ml) を添加した培養液 (AIM-V (GIBCO) と RPMI - 1640 を 1 : 1 に混合したもの) を用い、3 7 °C、5 % C O ₂ 存在下で、ヒト・グリオーマ細胞 K N S - 8 1 (H L A - A 2 4 と S O X 6 が共に発現しており、H L A - A 2 は発現していない細胞) を 6 0 分間培養したのち、5 回 P B S で洗浄した後、9 6 ウェルの培養皿 (COSTER 3 595-96 well) に、5 × 1 0 ³ 個 / ウェルに調整し、ターゲット細胞として播種した。

【 0 0 4 5 】

このターゲット細胞に対し、エフェクター細胞を 0 個 (グラフでは、エフェクター細胞 : ターゲット細胞 (E / T ratio) = 0)、5 × 1 0 ⁴ 個 (E / T ratio = 10)、1 × 1 0 ⁵ 個 (E / T ratio = 20)、2 × 1 0 ⁵ 個 (E / T ratio = 40) のそれぞれを加え、共培養した。

【 0 0 4 6 】

なお、コントロールとして、ヒト・グリオーマ細胞 K N S - 8 1 の代わりに、C I R - 2 4 細胞 (H L A - A 2 4 が発現しており、S O X 6 は発現していない細胞) とグリオーマ細胞 U 8 7 (H L A - A 2 と S O X 6 が共に発現しており、H L A - A 2 4 は発現していない細胞) を用いて、実験を行った。

【 0 0 4 7 】

= = 実験 3 1 日目 = =

上記共培養から培養上清を回収し、IFN- γ ELISA を行った。図 3 に結果を示す。

【 0 0 4 8 】

= = 結果 = =

S O X 6 由来の部分ペプチド (S O X 6 - 5 0 4、および S O X 6 - 6 2 8) を用いて誘導された細胞障害性 T 細胞 (エフェクター細胞) は、ターゲット細胞であるグリオーマ細胞 (K N S - 8 1) に反応して、コントロールに比して細胞数比依存的に IFN- γ 放出量の増加を示した (図 3)。このことは、S O X 6 - 5 0 4 または S O X 6 - 6 2 8 を提示している抗原提示細胞を用いて刺激することにより樹立した T 細胞は、S O X 6 と H L A - 2 4 を発現しているグリオーマ細胞 (K N S - 8 1) を特異的に認識し得ることを示す。樹立した T 細胞は U 8 7 (H L A - A 2 0 1 と S O X 6 が共に発現しているが H L A - A 2 4 は発現していない細胞) に反応しないことから、これらの S O X 6 特異的 T 細胞は H L A - A 2 4 拘束性に抗原を認識することが示された。

【 0 0 4 9 】

[3] エフェクター細胞の細胞傷害活性による、S O X 6 発現細胞に対する反応性の評価

= = 実験 2 8 日目 = =

この日まで、実施例 1 と同様にしてエフェクター細胞を調整した。なお、単核球を得る人の H L A クラス 1 のタイプを A 2 4 (A 2 4 0 2) とし、添加したペプチドとして配列番号 1 及び 2 のペプチドを用いた。なお、本実施例では、単核球を得るための末梢血には、健常人末梢血 (結果は図 4) だけでなく、グリオーマ患者末梢血 (結果は図 5) も用いた。

【 0 0 5 0 】

ターゲット細胞として、H L A - A , B 欠損ヒト B 細胞株 C I R に H L A - A 2 4 0 2 の c D N A を導入した C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 株に S O X 6 遺伝子を導入した C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、C I R に H L A - A 0 2 0 1 の c D N A と S O X 6 遺伝子を導入した C I R - A 0 2 0 1 - S O X 6、H L A - A 2 4 と S O X 6 を共に発現し

10

20

30

40

50

ているグリオーマ細胞 (Marcus、S F 1 2 6、K N S - 4 2)、H L A - A 2 4 と S O X 6 を共に発現している他の癌細胞 (肝細胞癌由来 H e p G 2、肺癌由来 P C 9) を準備した。なお、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6 細胞及び C I R - A 0 2 0 1 - S O X 6 細胞で S O X 6 が発現していることは、上記ウエスタン・ブロッティングによって確認した (図 2 B)。

【 0 0 5 1 】

これらの細胞 5×10^6 個に対して $500 \mu\text{l}$ の Fetal Bovine Serum (F B S)、 ^{51}Cr ($1.85 \text{ MBq} / 50 \mu\text{l}$) を $50 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 60 分振蕩培養した。その後洗浄を 3 回行い、 $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$ に調整して 96 穴プレート (COSTER 3595-96 well) の各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。

10

【 0 0 5 2 】

この ^{51}Cr でラベルしたターゲット細胞に対し、ウエルあたり、エフェクター細胞を 3×10^5 個 (E/T ratio=60)、 1.5×10^5 個 (E/T ratio=30)、 7.5×10^4 個 (E/T ratio=15) のそれぞれを加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 4 時間培養した。

【 0 0 5 3 】

各ウエルの cpm (cpm experimental release) を計測し、特異的溶解度 (Percentage of specific lysis) を以下の式から算出した。

$$\text{特異的溶解度} = (\text{cpm} - \text{csr}) / (\text{cmr} - \text{csr}) \times 100$$

(なお、csr (cpm spontaneous release) はエフェクター細胞を含まない培地を添加したウエルの cpm であり、cmr (cpm maximal release) はエフェクター細胞を含まない $0.1\% \text{ Triton X}$ を添加したウエルの cpm である。)

20

【 0 0 5 4 】

= = 結果 = =

C I R - A 2 4 - S O X 6、グリオーマ細胞由来 Marcus、グリオーマ細胞由来 S F 1 2 6、グリオーマ細胞由来 K N S - 4 2、肝癌由来 H e p G 2、肺癌由来 P C 9 は、H L A - A 2 4 と S O X 6 を発現している細胞である。図 4 (健康人由来の末梢血リンパ球から C T L を誘導した場合) 及び図 5 (グリオーマ患者由来の末梢血リンパ球から C T L を誘導した場合) に示したように、S O X 6 - 5 0 4 または S O X 6 - 6 2 8 を添加され樹状細胞との共培養により刺激された細胞障害性 T 細胞 (エフェクター細胞) である C T L (S O X 6 - 5 0 4) と C T L (S O X 6 - 6 2 8) は、これらの H L A - A 2 4 と S O X 6 を発現している細胞を E/T ratio 依存性に溶解した。

30

【 0 0 5 5 】

一方、S O X 6 を発現しているが H L A - A 2 4 を発現していない細胞 C I R - A 0 2 0 1 - S O X 6 や、H L A - A 2 4 を発現しているが S O X 6 を発現していない細胞 C I R - A 2 4 0 2 に対する溶解性が低いことから、C T L (S O X 6 - 5 0 4) と C T L (S O X 6 - 6 2 8) は、H L A 拘束性に S O X 6 を発現する細胞を広く、特異的に傷害し得ることが示された。

【 0 0 5 6 】

[4] エフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性

S O X 6 由来のペプチドの刺激により樹立したエフェクター細胞の、S O X 6 と無関係なペプチドを表面に有する細胞に対する細胞障害活性を調べることにより、エフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性を調べた。

40

【 0 0 5 7 】

基本的には、実施例 2 [3] と同様に実験を行ったが、ターゲット細胞として、

(1) H L A - A 2 4 と S O X 6 が共に発現しているグリオーマ細胞株 Marcus

(2) H L A - A 2 4 を発現していて S O X 6 を発現していない C I R - A 2 4 0 2 に、配列番号 1 を有するペプチド S O X 6 - 5 0 4 を結合させた C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 5 0 4) または配列番号 2 を有するペプチド S O X 6 - 6 2 8 を結合させた C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 6 2 8)

(3) 非特異的細胞障害を測定するためのコントロールとして、C I R - A 2 4 0 2 に対

50

し、CMV由来の無関係なペプチド（配列番号4）を結合させたCIR-A2402（CMV）

（4）無処理のCIR-A2402

を用いた。実施例2[3]に記載の手順にて、上記細胞を 5×10^3 / 100 μ lに調整して96穴プレートの各ウェルに100 μ lずつ添加した。

【0058】

エフェクター細胞として、ペプチドSOX6-504の刺激により樹立したCTL（SOX6-504）とペプチドSOX6-628の刺激により樹立したCTL（SOX6-628）を準備した。エフェクター細胞はウェルあたり 1×10^5 個（ET ratio = 20 : 1）を、96穴プレート上のターゲット細胞に添加した。これらを37℃、5% CO₂存在下で4時間培養後、各ウェルのcpm (cpm experimental release)を計測し、特異的溶解度（Percentage of specific lysis）を上記式から算出した。図6に結果を示す。

【0059】

CTL（SOX6-504）及びCTL（SOX6-628）は、HLA-A24とSOX6が共に発現しているMarcusや、SOX6由来のペプチドSOX6-504またはSOX6-628を結合させたCIR-A2402に対する溶解率は、無関係なペプチドであるペプチドを結合させたCIR-A2402や無処理のCIR-A2402に対する溶解率に比べて高かった。このことから、CTL（SOX6-504）及びCTL（SOX6-628）は、それぞれSOX6-504及びSOX6-628を提示した細胞に対し、特異的に細胞障害を起こすことが示された。

【0060】

このように、本実施例では、SOX6由来のペプチドで誘導されたエフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性が高いことが示され、従って、SOX6由来のペプチドが癌ワクチンとして用いられた時、副作用が低いと考えられる。

【0061】

<実施例3> 変異導入型SOX6由来ペプチドによる刺激によって樹立された細胞障害性T細胞のSOX6発現細胞に対する反応性

[1] 変異導入型ペプチドSOX6-504Mを提示した樹状細胞による細胞障害性T細胞の活性化と増殖能の評価

基本的には、実施例1と同様の手順で細胞障害性T細胞（CTL：エフェクター細胞）を誘導した。単核球を得る末梢血として、同様にHLAクラス1のタイプがA2402の健常人末梢血を用い、添加したペプチドとして、SOX6-504（配列番号1）及びSOX6-504M（配列番号10）を用いた。

【0062】

== CTL細胞数の変化の測定 ==

ペプチド特異的CTL樹立の過程で、7日目に 2×10^5 個/ウェルに調整したCD8陽性T細胞のウェル当たりの細胞数を、経時的に（14日目、21日目、28日目）測定した。SOX6-504の刺激により樹立したCTL（SOX6-504）とSOX6-504Mの刺激により樹立したCTL（SOX6-504M）のそれぞれに対し、3ウェルずつで実験を行った。それぞれ細胞を回収した時点で、IMag anti-human CD8 particles-DMでCD8陽性T細胞を単離し、細胞数を測定した。結果を図7のグラフに示す。

【0063】

[2] SOX6-504Mによる刺激によって樹立された細胞障害性T細胞の細胞傷害活性の評価

基本的には、実施例1で述べたように、ペプチド特異的CTLを誘導し、実施例2[3]と同様の手順で細胞傷害活性を測定した。単核球を得る末梢血は、HLAクラス1のタイプがA2402の健常人末梢血を用いた。

【0064】

ターゲット細胞としては、HLA-A、B欠損ヒトB細胞株CIRにHLA-A2402のcDNAを導入したCIR-A2402、CIR-A2402株にSOX6遺伝子を

導入したCIR-A2402(CIR-A2402-SOX6)、SOX6遺伝子を導入したCIR-A0201(CIR-A0201-SOX6)、HLA-A24とSOX6が共に発現しているグリオーマ細胞(Marcus、SF126、KNS-42)、肺癌由来のPC9細胞株、肝癌由来のHepG2株を用い、E/T ratioは、20/1、60/1、0/1の3通りで実験を行った。37℃、5%CO₂存在下で4時間共培養後、各ウエルのcpmを計測し、特異的溶解度を上記式から算出した。結果を図8に示す。

【0065】

さらに、健常人末梢血及びグリオーマ患者末梢血由来のペプチド特異的CTLを、再度樹立し、CIR-A2402、CIR-A2402-SOX6、グリオーマ細胞(Marcus、SF126)を用いて、上記実験より6日前の22日目に⁵¹Cr release cytotoxicity assayを行った。結果を図9(健常人末梢血由来のCTL)と図11(グリオーマ患者末梢血由来のCTL)に示す。

【0066】

= 結果 =

健常人末梢血由来のSOX6-504-CTLとSOX6-504M-CTLは、HLA-A24とSOX6が共に発現している細胞である、CIR-A2402-SOX6、Marcus、SF126、KNS-42、PC9、HepG2をE/T ratio依存性に溶解した。また、その特異的溶解度は、SOX6を発現しているがHLA-A2402を発現していない細胞CIR-A0201-SOX6や、HLA-A2402を発現しているがSOX6を発現していない細胞CIR-A2402に対する特異的溶解度に比べて低いことから、SOX6-504-CTLとSOX6-504M-CTLは、HLA拘束性にSOX6を発現する細胞に対し、特異的に細胞障害を起こし得ることが示された(図8)。

【0067】

22日目に⁵¹Cr release cytotoxicity assayを行っても、28日目の測定と同様の結果が得られた(図9)。このデータを用いて、CTL(SOX6-504M)とCTL(SOX6-504)の間で、同じターゲット細胞に対する特異的溶解度の違いが容易に比較できるように図示した(図10)。このように、CTL(SOX6-504M)の細胞傷害活性は、CTL(SOX6-504)の細胞傷害活性に比べて高いことが明らかである。

【0068】

なお、同様の結果はHLA-A2402陽性グリオーマ患者由来の末梢血リンパ球から誘導したCTLにおいても確認された(図11)。

【0069】

[3] SOX6-504Mの刺激により誘導されたCTL(SOX6-504M)の、SOX6-504に対する効果

基本的には、実施例2[3]と同様に実験を行ったが、ターゲット細胞として、

(1) HLA-A24とSOX6が共に発現しているグリオーマ細胞株Marcus

(2) HLA-A24を発現していてSOX6を発現していないCIR-A2402に、ペプチドSOX6-504(配列番号1)を結合させたCIR-A2402(SOX6-504)

(3) 非特異的細胞障害を測定するためのコントロールとして、CIR-A2402に対し、CMV由来の無関係なペプチド(配列番号4)を結合させたCIR-A2402(CMV)

(4) 無処理のCIR-A2402

を用いた。実施例2[3]に記載の手順にて、上記細胞を⁵¹Crでラベルし、5×10³/100μlに調整して96穴プレートの各ウェルに100μlずつ添加した。

【0070】

エフェクター細胞として、ペプチドSOX6-504Mの刺激により樹立したCTL(SOX6-504M)を準備した。エフェクター細胞はウェルあたり1×10⁵個(ET ratio=20:1)を、96穴プレート上のターゲット細胞に添加した。これらを37℃、

5 % C O₂ 存在下で 4 時間培養後、各ウエルの cpm を計測し、特異的溶解度を上記式から算出した。図 1 2 に結果を示す。

【 0 0 7 1 】

= = 結果 = =

C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) は、ネガティブコントロールである C I R - A 2 4 0 2 (C M V) や C I R - A 2 4 0 2 に対する特異的溶解度と比較し、Marcus や、C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 5 0 4) に対し、高い特異的溶解度を示した。このことから、変異型ペプチドを用いて誘導される C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) が、腫瘍が本来 H L A 上に提示する野生型ペプチドである S O X 6 - 5 0 4 を提示した細胞を特異的に認識し、細胞傷害を起こすことができることが示された。

10

【 0 0 7 2 】

< 結論 >

以上より、配列番号 1 0 を有するペプチドを用いて、その抗原ペプチドを提示した抗原提示細胞を作製することができ、さらに、その抗原提示細胞によって刺激することにより、各ペプチドのみならず S O X 6 を発現した細胞を認識する、特異的 T 細胞が誘導されることが示された。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 3 】

【図 1】本発明における実施例において、H L A - A 2 4 と結合することが予想された S O X 6 由来のペプチドを添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性 T 細胞 (エフェクター細胞) を、それら H L A - A 2 4 結合性の S O X 6 由来のペプチドを提示した樹状細胞をターゲットとして共培養した時に、放出される IFN- を測定した結果を表すグラフである。

20

【図 2 A】本発明における実施例において、定量的 R T - P C T による S O X 6 の発現解析の結果を示した図である。

【図 2 B】本発明における実施例において、ウェスタン・ブロッティングによる S O X 6 の発現解析の結果を示した図である。

【図 3】本発明における実施例において、H L A - A 2 4 と結合することが予想された S O X 6 由来のペプチドを添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性 T 細胞 (エフェクター細胞) を、H L A - A 2 4 及び S O X 6 を発現するグリオーマ細胞 (K N S - 8 1) をターゲットとして共培養した時に、放出される IFN- を測定した結果を表すグラフである。

30

【図 4】本発明における実施例において、H L A - A 2 4 0 2 の健常人末梢血から単離され、S O X 6 由来のペプチド S O X 6 - 5 0 4 及び S O X 6 - 6 2 8 を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性 T 細胞 (C T L : エフェクター細胞) に対し、C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、Marcus、S F 1 2 6、K N S - 4 2、H e p G 2、P C 9 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。

【図 5】本発明における実施例において、H L A - A 2 4 0 2 のグリオーマ患者末梢血から単離され、S O X 6 由来のペプチド S O X 6 - 5 0 4 及び S O X 6 - 6 2 8 を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性 T 細胞 (C T L : エフェクター細胞) に対し、C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、Marcus、S F 1 2 6 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。

40

【図 6】本発明における実施例において、H L A - A 2 4 0 2 の健常人末梢血から単離され、S O X 6 由来のペプチド S O X 6 - 5 0 4 (A) または S O X 6 - 6 2 8 (B) を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性 T 細胞 (C T L : エフェクター細胞) に対し、(A) Marcus、C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 5 0 4)、C I R - A 2 4 0 2 (C M V)、C I R - A 2 4 0 2 または (B) Marcus、C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 6 2 8)、C I R - A 2 4 0 2 (C M V)、C I R - A 2 4 0 2 をターゲット細胞と

50

して共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。

【図 7】本発明を用いた実施例において、H L A - A 2 4 0 2 の健常人末梢血由来の C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) の増殖能を、経時的な (7 日目、 1 4 日目、 2 1 日目、 2 8 日目) 細胞数の変化として測定した結果を表すグラフである。

【図 8】本発明を用いた実施例において、H L A - A 2 4 0 2 の健常人末梢血由来の C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) 及び C T L (S O X 6 - 5 0 4) をエフェクター細胞とし、C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、C I R - A 0 2 0 1 - S O X 6、Marcus、S F - 1 2 6、K N S - 4 2、P C 9、H e p G 2 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。なお、ターゲット細胞の特異的溶解度の測定は、実験開始後 2 8 日目に行った。

10

【図 9】本発明を用いた実施例において、H L A - A 2 4 0 2 の健常人末梢血由来の C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) 及び C T L (S O X 6 - 5 0 4) をエフェクター細胞とし、C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、Marcus、S F - 1 2 6 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。なお、ターゲット細胞の特異的溶解度の測定は、実験開始後 2 2 日目に行った。

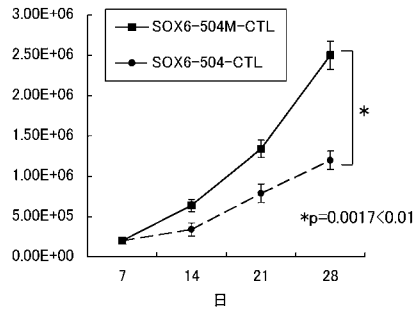
【図 1 0】図 9 のグラフを、同じターゲット細胞に対する特異的溶解度を比較した棒グラフとして表した図である。

【図 1 1】本発明を用いた実施例において、H L A - A 2 4 0 2 のグリオーマ患者末梢血由来の C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) 及び C T L (S O X 6 - 5 0 4) をエフェクター細胞とし、C I R - A 2 4 0 2、C I R - A 2 4 0 2 - S O X 6、Marcus、S F - 1 2 6 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。なお、ターゲット細胞の特異的溶解度の測定は、実験開始後 2 2 日目に行った。

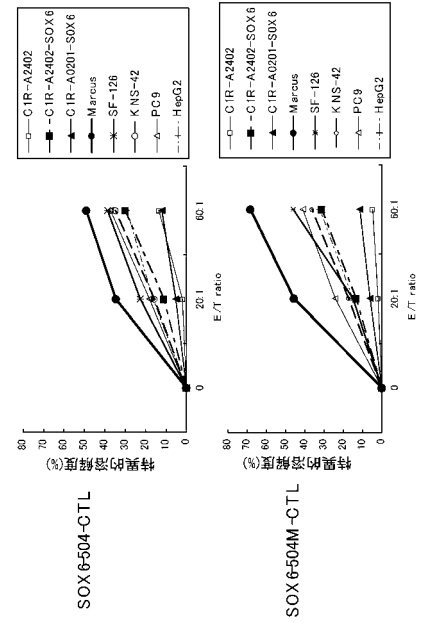
20

【図 1 2】本発明を用いた実施例において、C T L (S O X 6 - 5 0 4 M) をエフェクター細胞とし、Marcus、C I R - A 2 4 0 2 (S O X 6 - 5 0 4)、C I R - A 2 4 0 2 (C M V)、C I R - A 2 4 0 2 をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解度を示したグラフである。

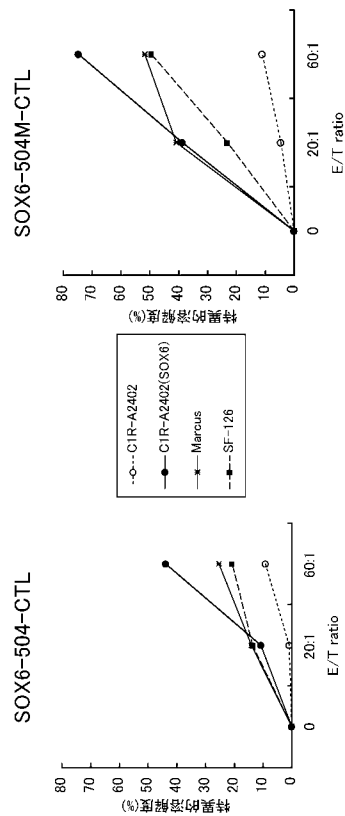
【図 7】



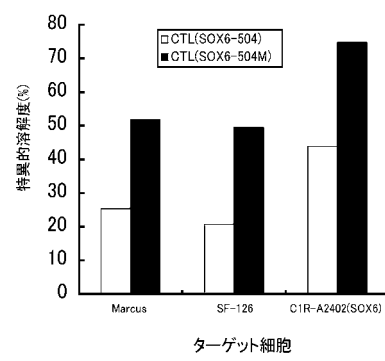
【図 8】



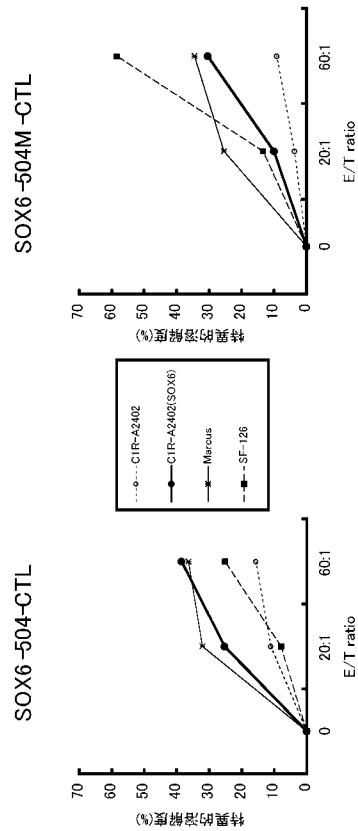
【図 9】



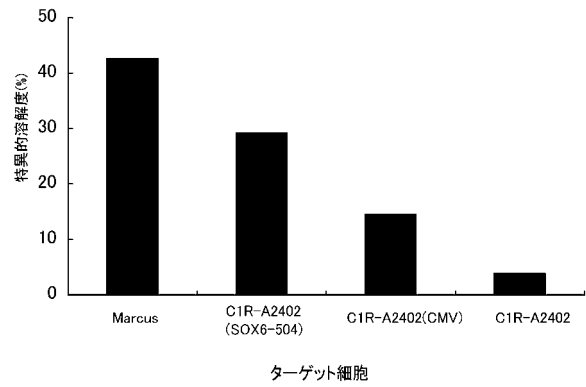
【図 10】



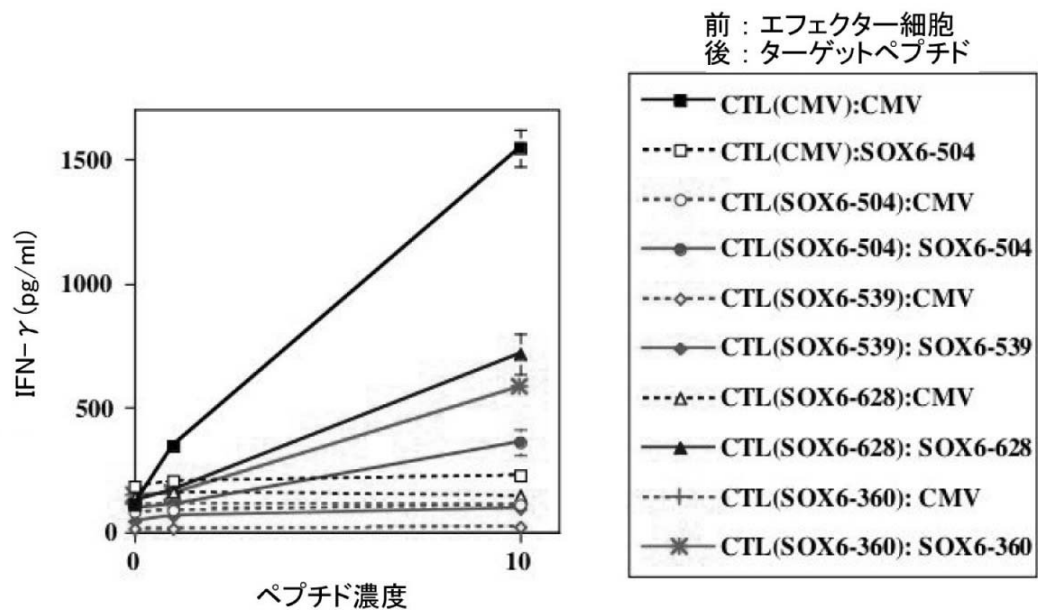
【図 1 1】



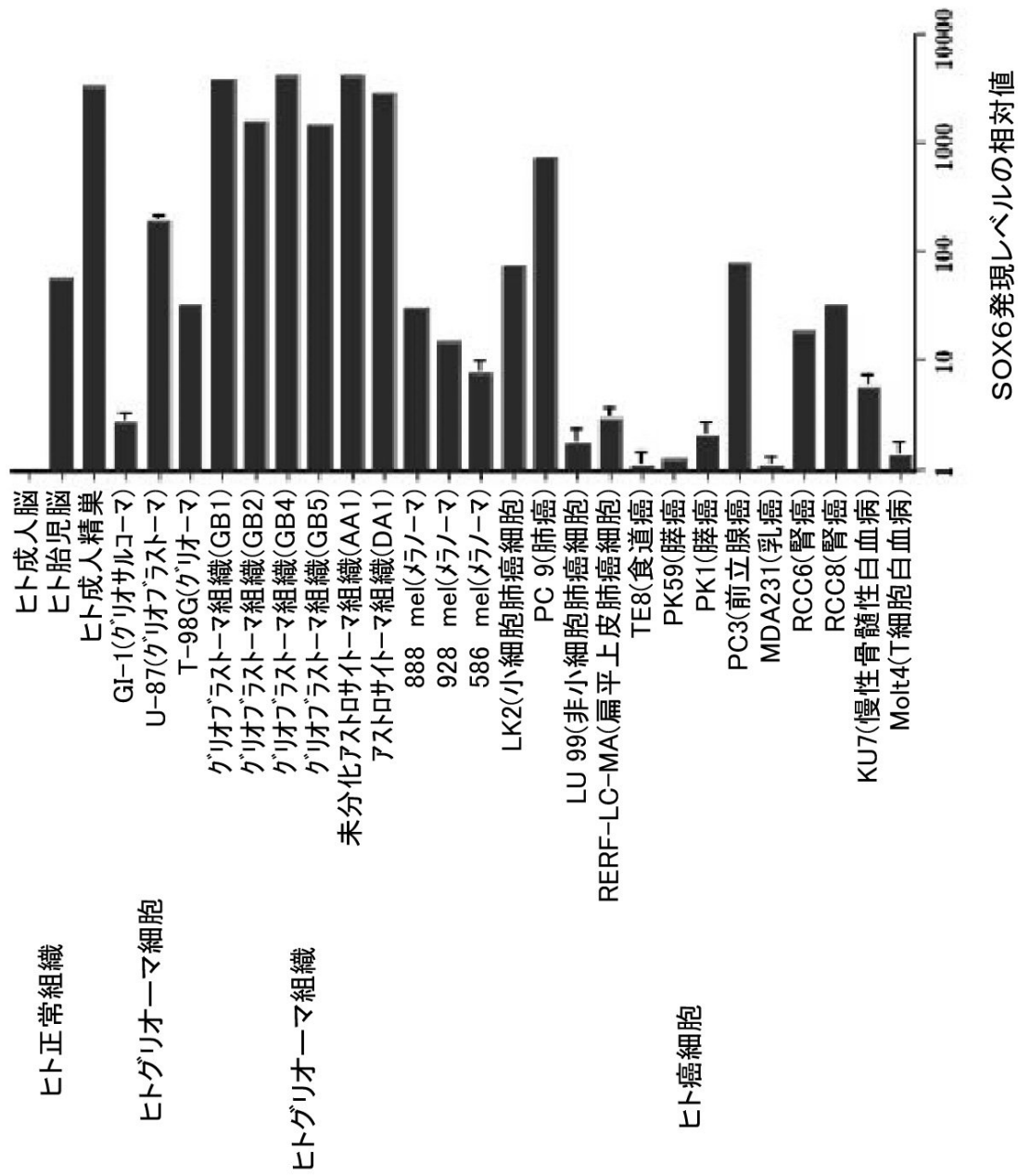
【図 1 2】



【図 1】

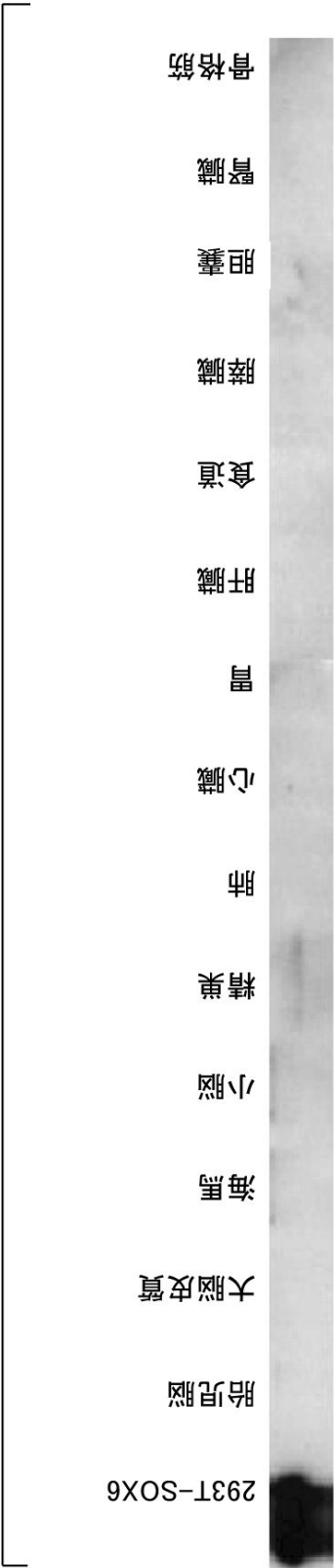


【図 2 A】

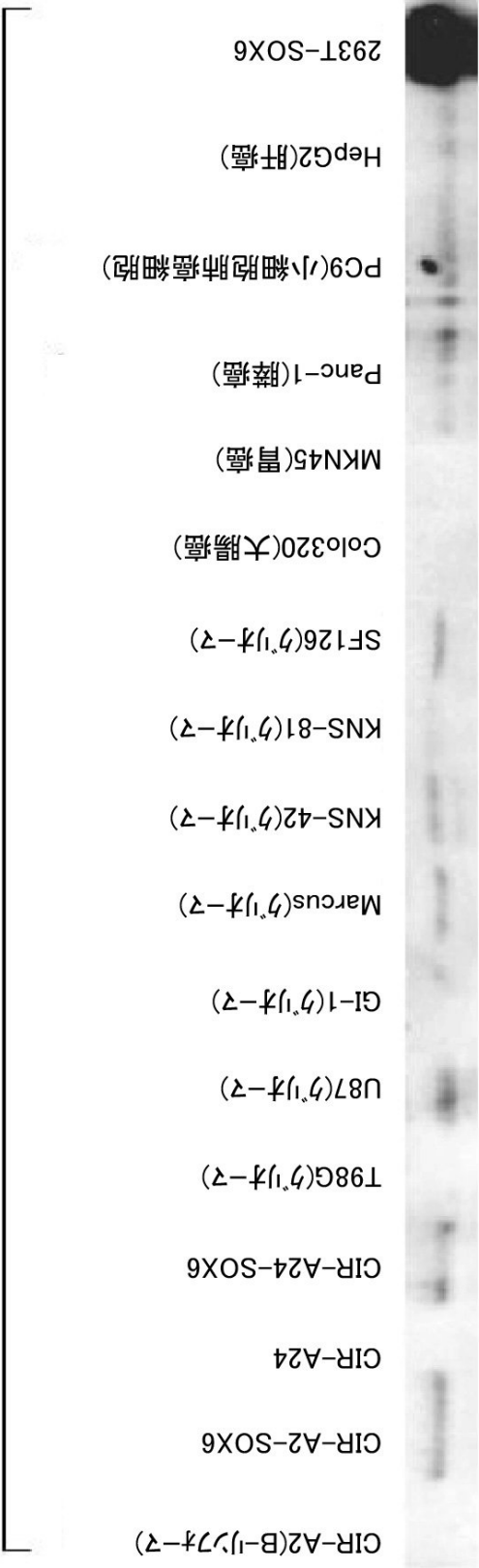


【図 2 B】

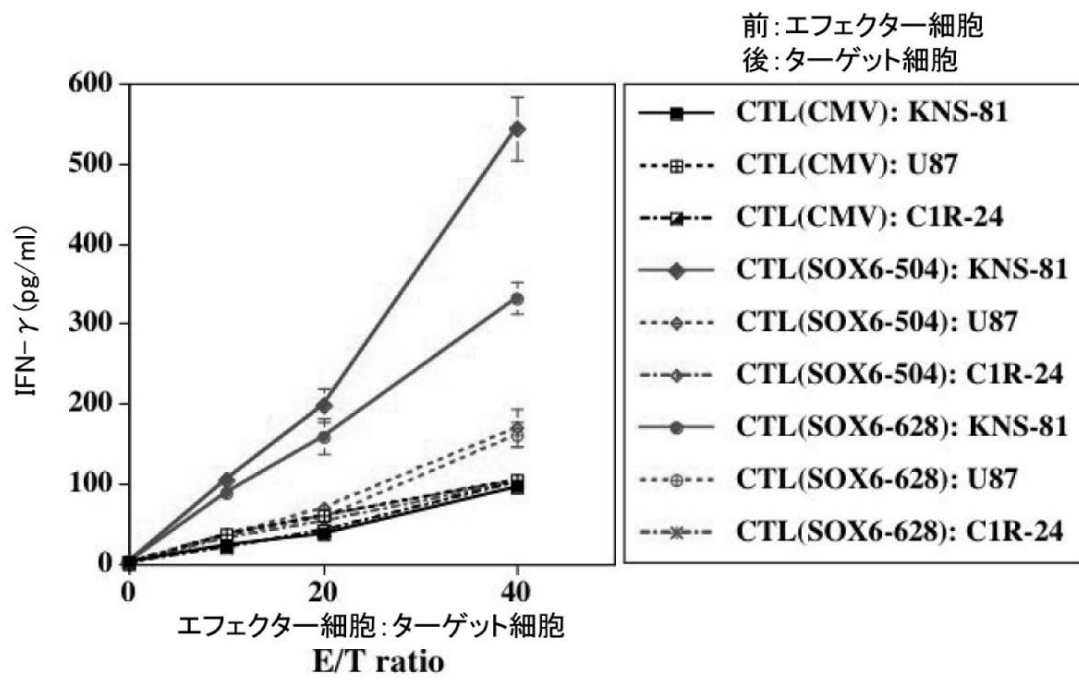
ヒト正常組織



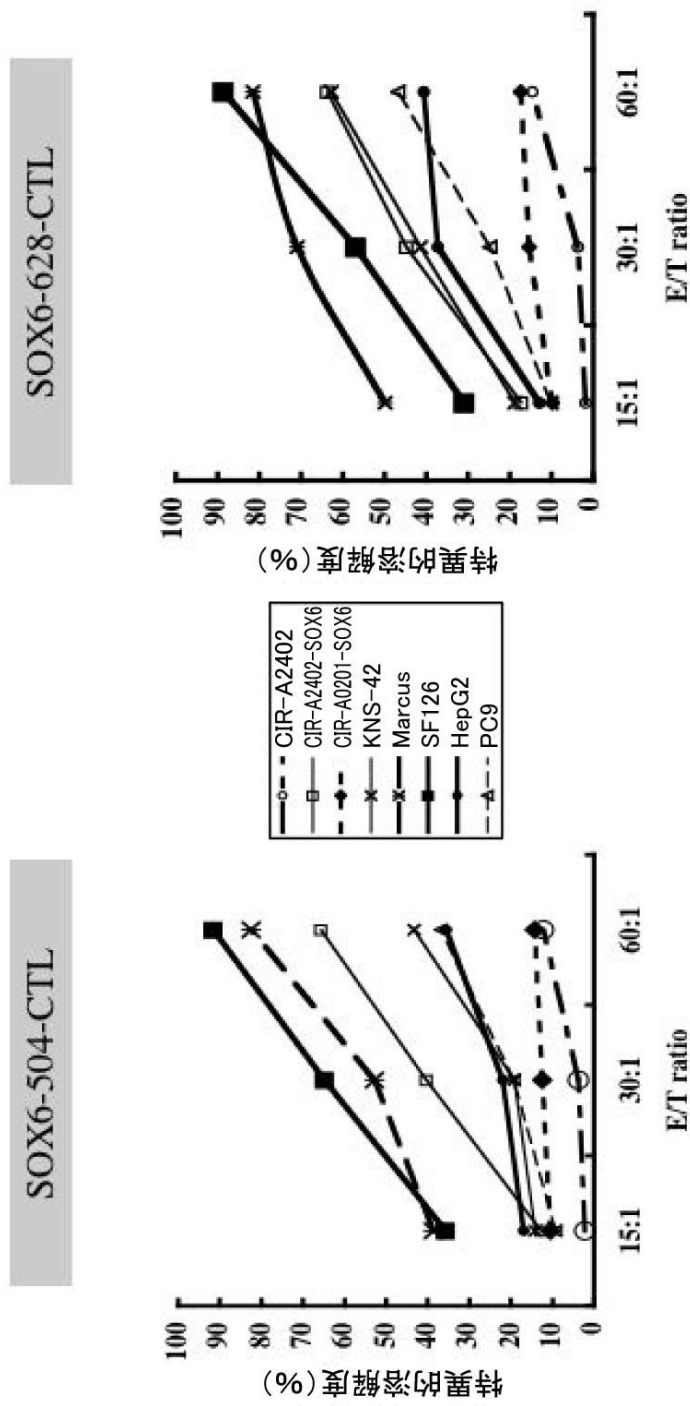
ヒト癌細胞株



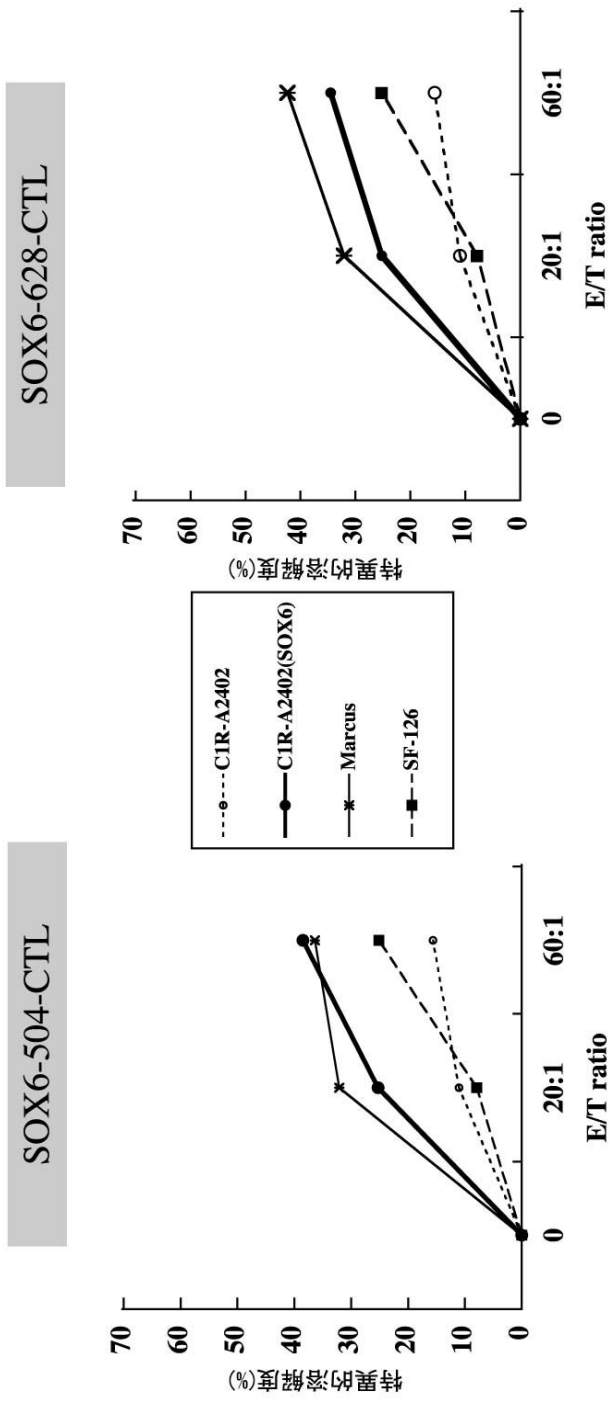
【図 3】



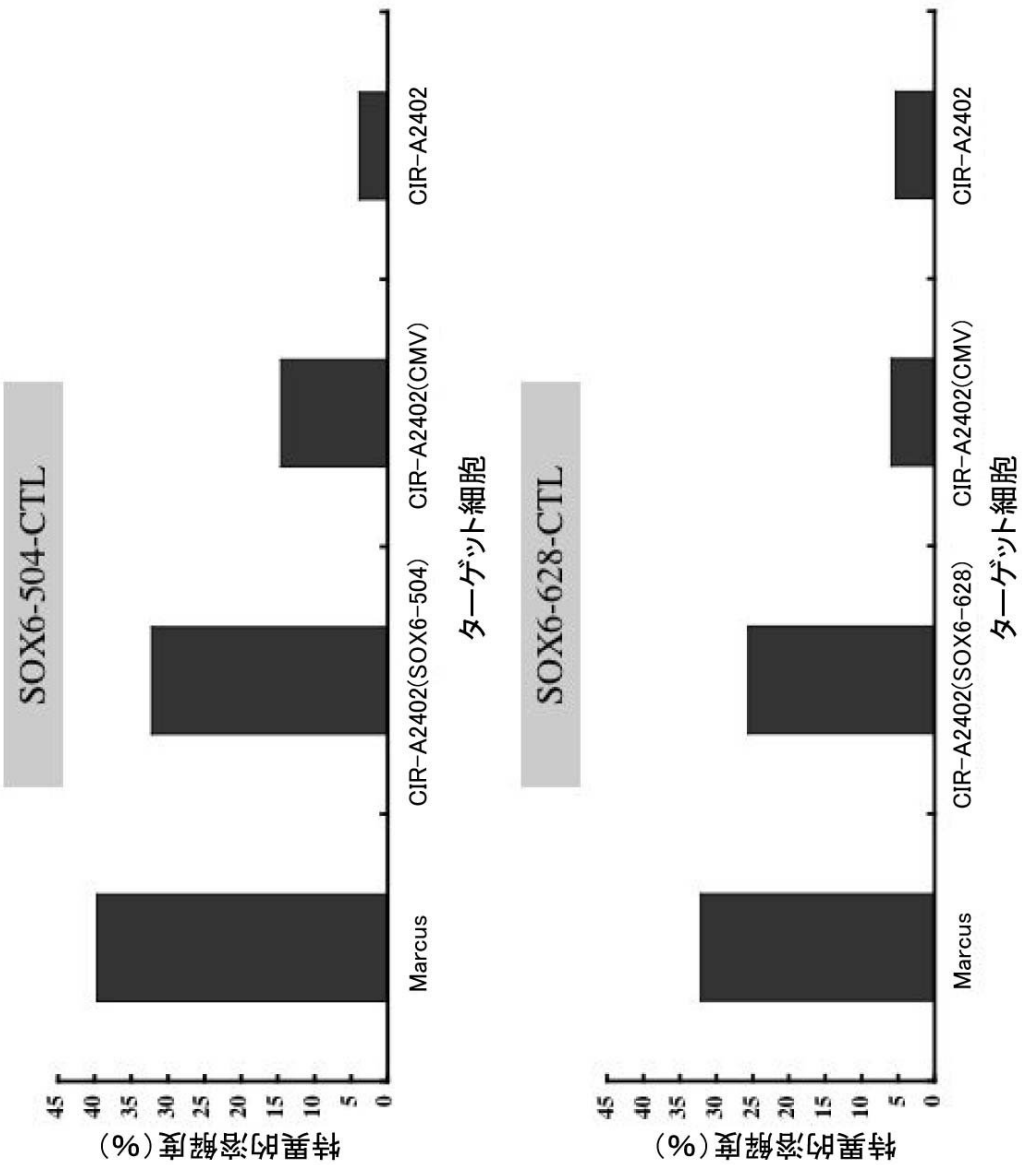
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0004840858000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第03/046182(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N1/00-15/90

C07K1/00-19/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

UniProt/GeneSeq

PubMed