

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6192537号
(P6192537)

(45) 発行日 平成29年9月6日 (2017.9.6)

(24) 登録日 平成29年8月18日 (2017.8.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A
 A 6 1 K 39/00 H
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 9 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2013-522265 (P2013-522265)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月5日 (2011.8.5)
 (65) 公表番号 特表2013-535209 (P2013-535209A)
 (43) 公表日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/063538
 (87) 国際公開番号 W02012/017081
 (87) 国際公開日 平成24年2月9日 (2012.2.9)
 審査請求日 平成26年7月10日 (2014.7.10)
 審判番号 不服2016-14943 (P2016-14943/J1)
 審判請求日 平成28年10月5日 (2016.10.5)
 (31) 優先権主張番号 10008233.8
 (32) 優先日 平成22年8月6日 (2010.8.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 510184704
 ルードヴィヒ・マクシミリアン・ユニヴェ
 ルズィテート ミュンヘン
 ドイツ連邦共和国 80539 ミュンヘ
 ン, ゲシュヴィスター・ショループラッツ
 1
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (74) 代理人 100173185
 弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞の標的抗原の同定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T細胞の標的抗原を同定する方法であって、

(a) 以下の細胞 (a a) および (a b) を接触させ：

(a a) 以下を発現する細胞：

(i) 所定の対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を含有する機能性T細胞受容体複合体；および

(i i) レポーター遺伝子の発現によるシグナルを通してT細胞活性化を評価するためのリードアウト系

(a b) 以下を保有する抗原提示細胞：

(i i i) 4 - 2 0 アミノ酸のペプチドをコードする核酸配列を含む複数のベクターを含み、前記ペプチドはT細胞の標的抗原の可能性があり、M H C 分子によって提示され得るものであり、かつ、前記ペプチドはランダム核酸配列にコードされるペプチドライブラリー；および

(i v) (i) のT細胞受容体によって認識されるM H C 分子

(b) 該リードアウト系を用いてT細胞の活性化を評価し；

(c) リードアウト系がT細胞活性化を示している細胞と接触している単一の活性化抗原提示細胞を単離し；

(d) 標的抗原または該標的抗原をコードする核酸分子を同定することを含む上記方法。

10

20

【請求項 2】

(d) の標的抗原の同定が該標的抗原をコードする核酸分子のシーケンシングを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

(d) の標的抗原の同定が、抗原の少なくとも 1 つのミモトープの同定を含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

抗原提示細胞がペプチドライブラリーを増幅する能力がある細胞である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載される方法。

【請求項 5】

レポーター遺伝子によってコードされるレポータータンパク質が蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物から成る群から選択される、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

患者特異的 T 細胞抗原を同定する方法であって、

(A) 該患者から得たサンプルから T 細胞を単離し；

(B) (A) で単離した T 細胞から、対合する T 細胞受容体 鎖および 鎖を同定し；そして

(C) 請求項 1 から 5 のいずれかに記載される方法に従って T 細胞抗原を同定し、ここで、機能性 T 細胞受容体および T 細胞活性化のリードアウト系を含有する細胞は、(B) で同定された、対合する T 細胞受容体 鎖および 鎖を発現する、
ことを含む、上記方法。

【請求項 7】

段階 (B) において、SEQ ID NO: 1 - 9 のプライマーから選択されるプライマーまたはプライマー・セットを用いて T 細胞受容体を発現する T 細胞から得た該核酸分子を増幅することを含む方法に従って該 T 細胞受容体 鎖および 鎖の可変領域、超可変領域、および / または結合領域をコードする核酸分子を同定することによって、対合する T 細胞受容体 鎖および 鎖を同定する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 15 - 38 のプライマーから選択されるプライマーまたはプライマー・セットを用いて該核酸分子を増幅させることによって、対合する T 細胞受容体 鎖の可変領域、超可変領域、および / または結合領域をコードする核酸分子を同定することを更に含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

該方法が以下の段階：

(i) 以下を含むプライマー・セットを用いて核酸分子を増幅し：

(a) SEQ ID NO: 1 - 9 のプライマー；および / または

(b) SEQ ID NO: 15 - 38 のプライマー；

(ii) SEQ ID NO: 39 - 47 のプライマーを含むプライマー・セットを用いて (i) (a) の反応産物を増幅し；そして / または

(iii - a) 以下を用いて (ii) の反応産物を増幅し：

(a) SEQ ID NO: 13 のプライマー；および

(b) SEQ ID NO: 14 のプライマー；そして / または

(iii - b) 以下を用いて (i) (b) の反応産物を増幅する：

(a) SEQ ID NO: 48 - 83 のプライマー・セット；および

(b) SEQ ID NO: 12 のプライマー；

ことを含む、請求項 7 または 8 に記載される方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T 細胞の標的抗原を同定する方法に関し、該方法は

10

20

30

40

50

(a) 以下の細胞 (a a) および (a b) を接触させ :

(a a) 以下を発現する細胞 :

(i) 所定の対合する T 細胞受容体 鎖および 鎖を含有する機能性 T 細胞受容体複合体 ; および

(i i) T 細胞活性化のリードアウト系

(a b) 以下を保有する抗原提示細胞 :

(i i i) ランダム核酸配列にコードされるペプチドライブラリー ; および

(i v) (i) の T 細胞受容体によって認識される M H C 分子

(b) 該リードアウト系を用いて T 細胞の活性化を評価し ;

(c) リードアウト系が T 細胞活性化を示している細胞と接触している抗原提示細胞を単離し ;

(d) 標的抗原または該標的抗原をコードする核酸分子を同定する

ことを含む。本発明は更に、T細胞受容体 鎖の可変領域、超可変領域、および/または結合領域をコードする核酸分子を同定する方法、並びに、該本発明の方法に、対合するT細胞受容体 鎖の可変領域、超可変領域、および/または結合領域をコードする核酸分子を同定することを更に包含させた方法に関する。本発明の方法は、患者に特異的なT細胞抗原を同定する方法に関し、該方法は、(A) 該患者から得たサンプルからT細胞を単離し ; (B) (A) で単離したT細胞から、対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を同定し ; そして、(C) 本発明の方法に従ってT細胞抗原を同定し、ここで、機能性T細胞受容体およびT細胞活性化のリードアウト系を含有する細胞は、(B) で同定された、T細胞由来の対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を発現する、ことを含む。本発明は更に、本発明の方法によって同定されたT細胞抗原を含有する組成物、ペプチドライブラリー、並びに、抗原提示細胞およびプライマーまたはプライマー・セットの調製法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

本明細書では、特許出願および製造者の取扱説明書を含む多くの文献を引用する。それらの文献の開示は、本発明の特許性に関連性があると見なされるものではなく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。より具体的には、全ての参考文献は、個々の文献が参照によって具体的かつ個別に組み込まれることが示されるのと同じ程度まで、参照によって組み込まれる。

【 0 0 0 3 】

T細胞は、多くの感染性疾患、腫瘍性疾患、および自己免疫疾患において重要な役割を果たすが、ごくわずかの例外を除いて、ヒト病原性T細胞の標的抗原は解明されていない。それらの標的抗原に対するT細胞の特異性は、そのヘテロ 2 量体超可変T細胞受容体 (T C R) 分子によって決定され、それらの分子は、M H C 分子によって提示される抗原性ペプチドを認識する。免疫防御においては、M H C 分子は「自己」に由来するが、抗原性ペプチドは「非自己」、すなわち、ウイルスまたは微生物ペプチドに由来する。一般に、M H C クラス I 分子は細胞内 (ウイルス) 起源のペプチドを C D 8 + T 細胞に提示し、一方、M H C クラス II 分子は食作用を受けた (微生物) ペプチドを C D 4 + T 細胞に提示する。更に、「自己」M H C 分子は「自己」ペプチドも提示するが、これらは通常、T細胞寛容のために無視される。自己免疫疾患においては、寛容が破綻し、「自己」ペプチドの認識によって慢性炎症、臓器機能の攪乱、または組織破壊が起こると推測される。T細胞の更なる重要な役割は腫瘍防御の際に起こるもので、T細胞は抗腫瘍反応を起こしうる。しかしながらこの場合、それらは腫瘍関連抗原を認識する。

【 0 0 0 4 】

多くの研究グループによる様々な技術を適用した膨大な努力にもかかわらず、これまでのところ、T細胞抗原を決定するための簡便で信頼性があり、偏りのない方法は存在しない。一つの理由は、ストレートな生化学技術 (例えば免疫沈降またはアフィニティークロマトグラフィー) を使用できないことであり、これは、T C R の M H C / ペプチド複合体への親和性が桁違いに低いことによる。それらの技術は一般に、抗体または慣例的な受容

10

20

30

40

50

体-リガンド相互作用のためのものであるため、解離定数がナノモルまたはそれ未満の範囲であれば有効に機能するが、解離定数が通常 10^{-6} M より高い T C R - M H C / ペプチド相互作用では機能しない (Rudolphら (2006) ; J.D.Stoneら (2009))。

【 0 0 0 5 】

これまでに、インビトロにおいて、自己免疫抗原または腫瘍抗原に対する既知の、または正当な候補 T 細胞株を作製することによって、いくつかの抗原が同定され、その後、合成ペプチドを用いて正確なエピトープがマッピングされた。

【 0 0 0 6 】

他のアプローチでは、腫瘍組織または自己免疫組織の M H C 分子からの抗原ペプチドの溶出、および質量分析による解析が行われた (Coxら, 1994 ; Fissoloら, 2009) 。

10

【 0 0 0 7 】

第 3 の方法は、ランダム合成ペプチドライブラリーを用いるものである (Nino-Vasquezら, 2005) 。このアプローチは、T C R 分子が確定された配列または構造ではなく、パターンを認識するという考えに基づく。すなわち、標的構造の認識は多特異性である (「無差別 (promiscuous) 」または「縮重 (degenerate) 」ともいう) (Wucherpfennigら, 2007) 。それらのライブラリーは、1 つの位置を除いて全ての位置に無作為のアミノ酸を含有し、それによって、「認識パターン」、すなわち野生型ペプチドのミモトープを同定することができ、その後、データベース検索によってそれらを同定できる。それらのアプローチは、特異性および多特異性間で好適なバランスを示す T C R に限定される。特異性が高すぎる場合は、少数の活性化ペプチドはライブラリー中で希薄であり過ぎ、特異性が低すぎる場合は、もはやパターンを認識することができない。これらのアプローチは、T C R の多特異性の程度を判定するのに好適であるが、これまでのところ、ほとんどの場合で、新規の未知抗原の同定はできていない。

20

【 0 0 0 8 】

第 4 に、c D N A ライブラリーが、特に腫瘍 T 細胞抗原の研究に用いられてきた。それらは、S V 4 0 起点を有するプラスミドを介して C O S 細胞にトランスフェクトするか (Van der Bruggenら, 1991 ; Wongら, 1999 ; Boonら, 2006) 、またはレトロウイルスコンストラクトを介して好適な宿主細胞にトランスフェクトされた (Smithら, 2001) 。いずれの場合でも、トランスフェクトした細胞からプラスミドまたはウイルス粒子を回収し、細菌内で増幅することができる。通常、多くのプラスミドプールを用い、陽性プールにつ

いて更なるラウンドのトランスフェクションを行い、単一の抗原を有するプラスミドが単離および特性決定されるまでこれを行う。それらの増幅法は、当然、生化学またはコンビナトリアル合成ペプチドライブラリーに比較して有利である。いくつかの腫瘍抗原が検出されたが、それらの方法は、一般的な適用には到っていない。理由は様々である：ライブラリーは通常、罹患組織 (多くの場合、入手不能である) に由来し、膨大な数のクローンを、困難かつ高価な細胞毒性アッセイまたはサイトカインアッセイ (これは、多量の T 細胞を必要とするため、更なる制約となる) によってスクリーニングしなければならない。しかし、最も重要なのは、c D N A ライブラリーから発現されるタンパク質が、広範かつ正確なプロセッシングを必要とすることである。従って、インビトロで使用される A P C のプロセッシング・パターンは、元の A P C のプロセッシング・パターンと同一でなければなら

30

40

【 0 0 0 9 】

第 5 の戦略は、ファージディスプレイ・ライブラリーに関連する。ここでは、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞が、組換え M H C 分子の結合溝にランダムペプチドライブラリーを提示する (Crawfordら, 2004 ; Wangら, 2005 ; Crawfordら, 2006) 。これらのライブラリーを、蛍光オリゴマー化可溶性 T C R 分子でスクリーニングする。この技術では、クラス I およびクラス II 制限的 T C R を活性化することが知られているペプチドのミモトープは明らかになるが、幾分複雑である。最も重大な欠点は、上記のように、T C R の M H C / ペプチドリガンドへの親和性が、周知の通り低いことである。これは、陽性昆虫細胞クローンの検出の妨げとなる。T C R のオリゴマー化により、親和性の上昇によって

50

認識は促進されるが、この制限を完全に克服するものではないと推測される。更に、ライブラリークローニングは、相同組換え（構築されるライブラリーのサイズは限定されている）またはバキュロウイルスDNAへの直接クローニング（サイズが大きいために、困難である）によってのみ可能である。

【0010】

国際特許W02003068800号は、HLA分子に結合し、ペプチドとHLA分子の複合体に特異的な細胞傷害性T細胞を刺激する、単離されたペプチドについて記載している。国際特許W02003068800号では、抗原提示細胞の組換えコンビナトリアル・ペプチドライブラリーでのトランスフェクションは企図されていない。

【0011】

10

米国特許第6,037,135号は、HLA結合ペプチドの作製法を開示しているが、それらのMHC分子への負荷、および、それらのペプチドをコードするペプチドライブラリーを介した抗原提示細胞による抗原の提示については、開示していない。

【0012】

要約すると、過去に使用された種々の技術の中には、場合によって、既知の抗原のミモトープの検出を可能とするものもあったが、これまでに知られていない抗原が発見されたのは、稀なケースだけであった。従って、T細胞抗原同定の分野における上記の進歩にも関わらず、新規のT細胞抗原を偏りなく同定するための、改善された方法を提供する必要性が未だ残されている。

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】W02003/068800

【特許文献2】W02003/068800

【特許文献3】US 6,037,135

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

この必要性は、特許請求の範囲に記載する態様の規定によって対処される。

【0015】

30

従って、本発明は、T細胞の標的抗原を同定する方法に関し、該方法は

(a) 以下の細胞 (aa) および (ab) を接触させ：

(aa) 以下を発現する細胞：

(i) 所定の対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を含有する機能性T細胞受容体複合体；および

(ii) T細胞活性化のリードアウト系

(ab) 以下を保有する抗原提示細胞：

(iii) ランダム核酸配列にコードされるペプチドライブラリー；および

(iv) (i) のT細胞受容体によって認識されるMHC分子

(b) 該リードアウト系を用いてT細胞の活性化を評価し；

40

(c) リードアウト系がT細胞活性化を示している細胞と接触している抗原提示細胞を単離し；

(d) 標的抗原または該標的抗原をコードする核酸分子を同定することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】使用したトランスフェクタントに関する概略図。58 T細胞ハイブリドーマを、以下でトランスフェクトすることに成功した：TCR JM22のTCR 鎖および 鎖（それぞれ、プラスミドpRSVneoおよびpRSVhygroに挿入されたもの）（58-JM22細胞と称する）、ヒトCD8 および 鎖（IRES - 2 配列で連結され、プラスミドpLPC-CD8 IR

50

ES によって作製したレトロウイルスに挿入されたもの) (58-JM22-CD8細胞と称する)、および、パッケージング細胞株 G P + E および s G F P (pcDNA6に挿入され、N F A T の制御下にあるもの) (58-JM22-CD8-sGFP細胞と称する)。抗原提示細胞 (A P C) として C O S - 7 細胞を使用し、これを、プラスミド p R S V 中の HLA-A2*0201 をコードするプラスミド pRSV-A2、および、pcDNArc-library (これは、コントロールペプチド f l u (58-66) をコードするか、または、コンビナトリアル・ランダムペプチドライブラリーの場合は、HLA-A2アンカー位置である 2、6、および 9 位を一定にしたもの) で一過性共トランスフェクトした (それぞれ、pcDNArc-flu(58-66) および pcDNArc-A2-269 と称する)。

【図 2】58-JM22-CD8-sGFP細胞とHLA-A*0201でトランスフェクトしたC O S - 7 細胞との共培養の蛍光顕微鏡分析。58-JM22-CD8-sGFP細胞は活性化すると緑色蛍光を発する。C O S - 7 細胞は、未トランスフェクト細胞 (COS-7empty) として使用するか、または、HLA-A*0201での安定的 (COS-7-A2stable) もしくは一過性 (COS-7-A2trans) トランスフェクションを行った。ペプチド f l u (58-66) を、化学的に合成されたペプチド (flu(58-66)-peptide) として添加するか、または、該ペプチドをコードするプラスミド (pcDNArc-flu(58-66)) としてトランスフェクトした。合成ペプチドhCMV(184-192) (HLA-A*0201に結合するが、TCR JM22によって認識されない) および空プラスミドpcDNA-emptyを陰性コントロールとして使用した。更に、完全長インフルエンザ基質タンパク質 (pcDNA-flu(1-252)) でのトランスフェクションも行った。以下のトランスフェクタントを示す： a : COS-7-A2stable + flu(58-66)-peptide ; b : COS-7empty + flu(58-66)-peptide ; c : COS-7-A2stable + pcDNA-flu(58-66) ; d : COS-7empty + pcDNA-flu(58-66) ; e : COS-7-A2trans + pcDNA-flu(58-66) ; f : COS-7-A2trans + pcDNA-empty ; g : COS-7-A2trans + pcDNA-flu(1-252) ; h : COS-7-A2stable + hCMV-peptide。

【図 3】H L A およびペプチドでトランスフェクトしたC O S - 7 細胞との共培養後の58-JM22-CD8-sGFP細胞のF A C S スキャン。図 2 と同じ組み合わせである。

【図 4】pcDNA-sGFPおよびpRSV-HLA-A2でのC O S - 7 細胞のトランスフェクション。トランスフェクション効率は、内因性 s G F P 蛍光、および抗体 B B 7 . 2 (Proimmune社) での H L A - A 2 の染色によって測定した (黒線、黒塗り部分)。トランスフェクションは全て一過性とした。s G F P 分析の場合は、トランスフェクトしていない細胞を陰性コントロールとした。H L A - A 2 分析の場合は、アイソタイプ・コントロール抗体BD-555743を使用した (コントロール：灰色の線、白塗り部分)。a : pcDNA-sGFPでの単独トランスフェクション ; b : pRSV-HLA-A2での単独トランスフェクション ; c : pcDNA-sGFP およびpRSV-HLA-A2での共トランスフェクション ; s G F P 分析 ; d : pcDNA-sGFPおよびpRSV-HLA-A2での共トランスフェクション ; H L A - A 2 分析 ; e : pcDNA-sGFPおよびpRSV-HLA-A2での共トランスフェクション ; 二重陽性細胞の分析。

【図 5】58-JM22-CD8-sGFP細胞と、HLA-A*0201およびプラスミドpcDNArc-A2-269にコードされたライブラリーで共トランスフェクトしたC O S - 7 細胞との共培養の蛍光顕微鏡分析。陽性58-JM22-CD8-sGFP細胞は、活性化すると緑色蛍光を発する。陽性細胞の頻度は、非活性化細胞 10^6 当たり約 3 個であった。陽性細胞を矢印で示す。a : 透過光。C O S - 7 細胞 (不規則な形状) およびT C R トランスフェクトT細胞ハイブリドーマ (円形) を示す ; b : s G F P 蛍光 (472nm - 520nm) は活性化T C R トランスフェクトT細胞ハイブリドーマを示す ; c : P E チャネル (545nm - 605nm)、蛍光は検出されていない。これは、検出された s G F P 蛍光が自己蛍光によるものでないことの証拠である。

【図 6】抗原ミモトープの同定につながるプロトコルの概要。まず、活性化された緑色蛍光T C R トランスフェクタントを、下部の、活性化プラスミドを保有する抗原提示細胞と共に選別採取する。プラスミドの挿入断片をクローニングし、細菌にトランスフェクトする。細菌クローンを計数するために、細菌クローンの画分を寒天プレート上に播種する。その後、500個の独立した細菌クローンを含有する細菌のサブプールを、30またはそれ以上作製する。それらをC O S - 7 細胞にトランスフェクトし、再び試験する。陽性サ

10

20

30

40

50

ブプールから更なるサブプールを作製する。それらの各サブプールには、より少ないクローンが含有される。最後に、単一細菌クローンを解析する。陽性クローンのシーケンシングを行い、抗原性ミモトープを解明する。

【図7】親ペプチド f l u (5 8 - 6 6)、および、コンビナトリアル・ランダムペプチドライブラリー-pcDNArc-A2-269によって発見されたミモトープ # 1 - # 4 のアミノ酸配列。ミモトープ # 2 は 2 回観察された。このライブラリーでは、2 位、6 位、および 9 位の H L A - A 2 アンカーをコードするアミノ酸を固定した(灰色のハイライト部分)。T C R J M 2 2 と接触することが知られている 4 位、5 位、および 8 位のアミノ酸 (Stewart-Jones ら 2003) を、点線の囲み部分で示す。模倣ペプチド中の、親ペプチドと異なるアミノ酸を丸印で示す。

10

【図8】縮重 V プライマーによる V - / - 鎖の増幅。V プライマー・セットおよび V プライマー・セットを合一した場合の、単一反応で完全長 T C R V および V 遺伝子レパートリーを増幅する能力を、多重 R T - P C R により、末梢血 T 細胞由来の m R N A を用いて試験した。5 0 0 細胞の R N A の転写および増幅を、ワンステップ R T - P C R により、単一細胞 P C R と同じプロトコルで、9 個の V プライマーおよび 2 4 個の V プライマーのセットを用いて行った。次いで、個別の V プライマーまたは V プライマーを用い、個別の P C R 反応で、P C R 産物を増幅した。(A) 同じ 9 個の V プライマー (V p 1 - 9) およびネステッド C プライマーを用い、多重 P C R 産物の 0 . 5 μ l 画分を P C R (9 4 で 3 0 秒 / 5 3 で 3 0 秒 / 6 8 で 3 0 秒を 3 5 サイクル、そして、最終伸長を 6 8 で 1 5 分) で増幅した。全ての V p 1 - 9 プライマー (レーン 1 - 9) で、期待されたサイズの P C R シグナルを得た。(B) これと同時に、個別の反応で 2 4 個の異なる V プライマーを使用して、多重 P C R 産物から T C R V レパートリーを増幅した。V セミ・ネステッド増幅を、V 増幅と同様に行った。全ての V プライマー (上段および下段のレーン 1 - 1 2) で、期待されたサイズの P C R シグナルを得た。(C) 第 2 のセミ・ネステッド P C R を、F A M 標識した C プライマーおよび個別の V 遺伝子ファミリーのプライマーを用いて、第 1 の多重 P C R から実施した。P C R 産物を P O P 6 ゲルに供し、遺伝子シーケンサーで解析した。全ての V ファミリーがポリクローナルな分布を示し、これは、多重 V プライマー・セットによっていずれの機能性 V ファミリーも増幅できることを示している。

20

【図9】単一 T 細胞からの 3 段階 T C R V 鎖増幅。第 1 の前増幅の後、第 2 のラン・オフ P C R 段階を実施してユニバーサル・プライマー部位を導入した。その後、第 3 のセミ・ネステッド P C R を行い、ユニバーサル・プライマーおよび C (2) ネステッドプライマーを用いてそれぞれの再構成 T C R V 遺伝子を増幅した。

30

【図10】単一 T 細胞の単離。単一細胞での T C R 解析のために、モノクローナル抗体でコーティングした磁気ビーズで T 細胞を標識し、倒立顕微鏡下で吸引採取し、P C R バイアルに移して R T - P C R を行った。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明に従って使用する「T細胞の標的抗原」という用語は、T細胞によって認識され、これと結合する抗原に関連する。T細胞への抗原の結合により、該T細胞の活性化が起こる。T細胞標的抗原は、T細胞受容体 (T C R) および C D 3 複合体から成る機能性 T 細胞受容体複合体によって認識される。T細胞標的抗原は、抗原提示細胞 (A P C) の表面上に存在する主要組織適合抗原複合体 (M H C) 分子によって提示される。本発明によれば、「T細胞の標的抗原」はペプチドエピトープをいう。ペプチドエピトープが M H C 分子と複合体を形成している場合は、本明細書では「抗原 - M H C 複合体」と記載する。M H C クラス I 分子によって提示される標的抗原は、C D 8 + T 細胞によって認識され、一般的に、細胞内に由来する (例えばウイルス標的抗原)。M H C クラス I I 分子によって提示される標的抗原は、C D 4 + T 細胞によって認識される。それらは一般的に、食作用を受けた、細胞外に由来するペプチド (例えば、微生物由来のペプチド) である。T細胞の標的抗原は、ホスト生物にとって外因性のものに由来してもよい (例えばウイル

40

50

スまたは微生物ペプチド)。標的抗原は、自己由来、例えば腫瘍関連抗原、または、ホスト生物において自己免疫応答を引き起こす自己抗原であってもよい。

【0018】

好ましい態様では、T細胞の標的抗原は、CD8 + T細胞の標的抗原である。

【0019】

本明細書で使用する「機能性T細胞受容体複合体」という用語は、T細胞の活性化を引き起こす能力を有する複合体をいう。T細胞受容体複合体は、6つのサブユニットから成る。T細胞受容体は、2つのサブユニット(本明細書では、「鎖」とも記載する)、すなわちTCR および から成り、これらはジスルフィド結合によってヘテロダイマーを形成しており、TCR 受容体複合体の可変領域、超可変領域、および結合領域を含有し、これが抗原/MHC複合体と相互作用し、それによって単一の抗原結合部位が形成される。T細胞の亜群では、T細胞受容体はTCR および サブユニットから成る。更に、TCR の 鎖および 鎖は保存(定常)領域を有し、それらの領域はCD3複合体タンパク質と相互作用してTCRを膜に固定する。T細胞受容体複合体は、4つのCD3サブユニットを更に含有する。各CD3複合体は、1つのCD3 サブユニット、1つのCD3 サブユニット、および2つのCD3 サブユニットを含有する。CD3 サブユニットの一方はCD3 サブユニットとヘテロダイマーを形成し、他方のCD3 サブユニットはCD3 サブユニットとヘテロダイマーを形成する。抗原の結合によって、それらのTCRヘキサマーが架橋され、活性化される。その後、(鎖によって、更に下流の細胞内化合物にシグナルが伝達される。T細胞受容体複合体の機能性は当該分野で公知の方法を用いて分析することができ、それらには例えば以下の測定がある: タンパク質および他の細胞内分子(例えばIP3)のリン酸化および脱リン酸化、T細胞へのCa²⁺流入、サイトカイン(例えばインターフェロン- 、インターロイキン(IL-2、-4、-6、-17など)、TNF-)の生成、パーフォリンおよびグランザイムを含有する細胞傷害性顆粒の分泌、または標的細胞の細胞死(Smith-Garvinら(2009); Murphyら"Janeway's Immunobiology" 2008, 第7版)。

【0020】

本発明によれば、「所定の対合するT細胞受容体 鎖および 鎖」という用語は、単一分子タイプのT細胞受容体に由来する 鎖および 鎖、すなわち、対を成す 鎖および 鎖をいう。言い換えると、それらの鎖は、対合して、機能性T細胞受容体のヘテロダイマーを成す。これに関して使用する「所定の」という用語は、目的のT細胞受容体を示すT細胞受容体鎖の意図的な選択をいい、本発明の方法によってこれに対して該当する抗原が同定される。好ましくはT細胞受容体は脊椎動物T細胞受容体であり、より好ましくは哺乳動物T細胞受容体である。更に好ましくは、T細胞受容体はウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、または霊長類動物由来のT細胞受容体である。最も好ましくは、T細胞受容体はヒトT細胞受容体である。

【0021】

T細胞受容体鎖は、当該分野で公知の任意の方法によって得ることができる。それらには、例えばSeitzら(2006)に報告されている方法があり、該方法では、形態学的に特性決定されている単一細胞からTCR鎖をクローニングする。それらの細胞は、例えば生検組織のレーザー・マイクロダイセクションによって、患者から採取したサンプルから得てもよい。更に、配列が既知であるT細胞受容体を使用してもよく、その場合は、細胞(a a)を、該T細胞受容体鎖をコードする核酸分子でトランスフェクトすることによって鎖を得てもよい。

【0022】

本発明によれば、「T細胞活性化のリードアウト系」という用語は、T細胞受容体の活性化の際に測定可能なシグナルを生ずる系をいう。通常、T細胞受容体の活性化により、該T細胞受容体を発現する個別のT細胞の活性化が起こる。従って、リードアウト系によってシグナルが得られれば、これは、抗原提示細胞によって提示された抗原とT細胞受容体との結合を介してT細胞の活性化が起こったことを示す。細胞(a a)において発現さ

れたT細胞受容体の該活性化により、シグナル（例えばレポータータンパク質の発現）が生じる。T細胞の活性化に際して測定可能なシグナルを得るのに好適なレポーター遺伝子の非制限的な例として、酵素、例えば - ガラクトシダーゼ、CAT、 - グルクロニダーゼ、ペルオキシダーゼ、 - キシロシダーゼ、カテコールジオキシゲナーゼ（XylE）、トレハラーゼ（TreA）、アルカリホスファターゼ、または分泌型アルカリホスファターゼ、並びに、蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物がある。それらのリードアウト系は当該分野で公知であり、例えばSuter-Crazzolaraら（1995）またはShanerら（2005）に報告されている。

【0023】

このように、細胞（aa）は、機能性T細胞受容体複合体、および、T細胞の活性化を示すリードアウト系の発現を特徴とする。それらの細胞は、T細胞受容体複合体を含有する任意の細胞（例えば、T細胞受容体複合体を天然に発現する細胞、または、T細胞受容体もしくはT細胞受容体複合体で形質転換もしくはトランスフェクトした細胞）であることができる。それらの細胞も、T細胞受容体トランスフェクタントと称する。それらの細胞の非制限的な例として、T細胞、T細胞ハイブリドーマ、リンパ腫、および人工的に不死化したT細胞がある（Katakuraら（1998））。好ましくは、細胞（aa）はT細胞ハイブリドーマである。T細胞ハイブリドーマは当該分野で公知であり、Ozakiら（1988）；Shirahataら（1998）；Chenら（2007）に報告されている方法、または以下の実施例に記載する方法によって得てもよい。

【0024】

好ましくは、細胞（aa）は、単一分子タイプのT細胞受容体のみを発現する。それらの細胞は、例えば野生型T細胞であるか、または、内因性T細胞受容体を有さず、目的のT細胞受容体でトランスフェクトもしくは形質転換されたT細胞ハイブリドーマであってもよい。

【0025】

別の態様では、既に内因性T細胞受容体を発現している細胞を、目的の、更なるT細胞受容体でトランスフェクトまたは形質転換することができる。その場合、目的のT細胞受容体を改変して、内因性T細胞受容体の鎖と目的のT細胞受容体の鎖との間でヘテロ2量体化が起こらないようにする。それらの改変は当該分野で公知であり、それらに限定される訳ではないが、目的のT細胞受容体鎖の定常領域の接合部分への変異型アミノ酸の導入、または、不均一性が非常に低いT細胞（例えばオリゴクローナルまたはモノクローナルT細胞集団）をレシピエントとして選択する（Vossら（2008）；Cohenら（2007）；Kubalilら（2007）；Weinholdら（2007）；van Loenenら（2010）；Bendleら（2010））。好ましくは、種々の分子タイプのT細胞受容体を発現する細胞を本発明の方法に使用する場合、種々の細胞（例えば、目的のT細胞受容体を単一の内因性T細胞受容体と共に発現する細胞で、該内因性T細胞受容体が第1のラウンドの、または先のラウンドのスクリーニングで細胞中に含有されていたT細胞受容体と異なるもの）を用いて、更なるラウンドのスクリーニングを行う。好ましくは、それらの更なるラウンドのスクリーニングで使用する細胞は、同定される抗原が目的のT細胞受容体の抗原であって内因性T細胞受容体の抗原ではないことを確かにするために、目的のT細胞受容体のみを発現するものとする。

【0026】

本明細書で使用する「抗原提示細胞」という用語は、抗原を、主要組織適合抗原複合体（MHC）との複合体としてその表面上に提示する細胞をいう。MHCを発現し、抗原を提示するものであれば、いずれの細胞も、本発明にかかる抗原提示細胞として好適である。インビボにおいて抗原提示細胞として作用する可能性のある細胞としては、例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、または活性化された上皮細胞が挙げられるが、線維芽細胞、グリア細胞、脾臓細胞、または血管内皮細胞も挙げられる。それらの細胞は、下に記載するペプチドライブラリーでトランスフェクトまたは形質転換した後、本発明に従って使用することができる。また、MHCを内因的に発現しない細胞を使用してもよく、その場合、好適なMHCを該細胞に形質転換またはトランスフェクトする。

【0027】

本発明にかかる「ランダム核酸配列にコードされるペプチドライブラリー」という用語は、ペプチドの集合体、すなわちライブラリーをいい、ここで、ペプチドは無作為な配列を有する核酸配列にコードされている。言い換えれば、それらの核酸配列は、ランダムに選択された、可能性のある様々な配列バリエーションを示す。すなわち、ペプチドライブラリーが、例えば9アミノ酸長のペプチドを表す場合、コードする核酸配列は27ヌクレオチド長であり、つまり、それぞれの可能性のあるヌクレオチドの組み合わせは合計 $4^{27} = 1.8 \times 10^{16}$ の異なる核酸配列に相当する。好ましくは、ペプチドライブラリーは、少なくとも 10^3 個の異なる核酸配列、例えば少なくとも 10^4 個、少なくとも 10^5 個、少なくとも 10^6 個、少なくとも 10^7 個、少なくとも 10^8 個、少なくとも 10^9 個、少なくとも 10^{10} 個、少なくとも 10^{11} 個、少なくとも 10^{12} 個、少なくとも 10^{13} 個、少なくとも 10^{14} 個、少なくとも 10^{15} 個、または少なくとも 10^{16} 個の異なる核酸配列を有する核酸配列群にコードされる。最も好ましくは、ペプチドライブラリーは、所定のペプチド長についての、全ての可能な順列に相当する核酸配列群にコードされるものである。更に、種々の長さのペプチドを含むペプチドライブラリーも本明細書で企図され、該ライブラリー中にも上記の数の核酸配列群が準用される。

10

【0028】

更に、MHC複合体の標的抗原の多くで、いわゆるアンカー部位が抗原およびMHC間の結合に必要であることが知られている。これらのアンカー部位が知られている場合は、それらの位置に一定のアミノ酸を導入し、それ以外の位置だけをランダム化することによって、ランダム核酸配列を作製することができる。種々のMHCのアンカー部位が知られている。その中には、例えば実施例に記載するHLA-A2があり、アンカー部位は2位のイソロイシン、6位のバリン、および9位のロイシンである(Rammenseeら(1999))。更なるアンカーも当該分野で公知であり、例えばRammenseeら(1999)に報告されている。

20

【0029】

本明細書に使用する「ペプチド」という用語は、最大50個のアミノ酸から成る一群の分子を指す。ペプチドは、2量体、3量体、およびそれ以上のオリゴマーを形成していてもよい、すなわち、1つより多い分子から成ってもよく、それらの分子は同一であっても、同一でなくてもよい。それに伴い、対応するより高次の構造は、ホモ2量体またはヘテロ2量体、ホモ3量体またはヘテロ3量体等と称する。「ペプチド」という用語は(「ペプチド」が「タンパク質」と同義に使用される場合)、天然に修飾されたペプチドを意味し、修飾は、例えばグリコシル化、アセチル化、ホスホリル化などによってなされる。それらの修飾は当該分野で公知である。好ましくは、ペプチドは最短で少なくとも4アミノ酸長、例えば、少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも78アミノ酸長、少なくともアミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、または、少なくとも10アミノ酸長である。また、好ましくは、ペプチドは最大50アミノ酸長、例えば最大45アミノ酸長、最大40アミノ酸長、最大35アミノ酸長、最大30アミノ酸長、最大25最大アミノ酸長、最大20アミノ酸長である。明記していないそれらの中間の数も、本明細書で企図される。より好ましくは、MHCクラスI分子によって提示されるペプチドは、4から20アミノ酸長である。従って、該ペプチドは4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長であってもよい。また、好ましくは、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドは、4から50アミノ酸長である。クラスIIペプチドは、両端がMHC結合溝の外側に伸長しうるため、原理上は、どれだけ長くてもよい。エピトープ自体は、通常、8から10アミノ酸長である。従って、該ペプチドは4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長であってもよい。更に好ましくは、本発明のペプチドは8から10アミノ酸長である。最も好ましくは、ペプチドは9アミノ酸長である。

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本発明にかかる「核酸配列」には、DNA（例えばcDNAまたはゲノムDNA）およびRNAが含まれる。理解されるように、本明細書で使用する「RNA」という用語は、全ての形態のRNAを含み、好ましくはmRNAをいう。更に、当該分野で公知の核酸様配列、例えばDNAまたはRNAの合成または半合成誘導体、および混合ポリマーは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれも含まれる。本発明にかかるそれらの核酸様分子または核酸誘導体には、ホスホロチオエート核酸、ホスホルアミダイト核酸、2'-O-メトキシエチルリボ核酸、モルホリノ核酸、ヘキシトール核酸（HNA）、およびロックト核酸（LNA）がある（BraaschおよびCorey（2001）Chem Biol. 8, 1参照）。LNAはRNA誘導体であり、リボース環が、2'-酸素および4'-炭素間のメチレン結合によって拘束されている。それらが更なる非天然型または誘導型ヌクレオチド塩基を含有してもよいことは、当業者に容易に認識されるところである。

10

【 0 0 3 1 】

核酸配列のランダム性により、既知の標的配列に基づく考慮は必要とされない。従って、本発明に使用するペプチドライブラリーは、従前技術とは異なる。従前技術では、遺伝子の既知の配列に従って核酸配列を設計しなければならなかったが、本発明のライブラリーでは、完全にランダムな異なるペプチドの集団（それらの配列を事前に知る必要はない）によるスクリーニングによってT細胞の標的抗原を探索する。好ましい態様では、ペプチドライブラリー（単数または複数）をコードするランダム核酸配列は、野生型遺伝子をコードしない。つまり、「ランダム核酸配列」という用語は、特定のタンパク質またはcDNA（例えばmRNA由来のcDNA）をコードする完全長遺伝子を含まない。

20

【 0 0 3 2 】

好ましくは、ペプチドライブラリーのペプチドをコードする核酸配列をベクターに導入する。

【 0 0 3 3 】

好ましくは、ベクターはプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、または、それ以外の（例えば遺伝子操作で慣例的に使用される）ベクターである。本発明の核酸配列を市販のベクターに挿入してもよい。非制限的な例として、以下のような、哺乳動物細胞での発現に適合するベクターが挙げられる：pREP（Invitrogen社）、pcDNA3（Invitrogen社）、pCEP4（Invitrogen社）、pMC1neo（Stratagene社）、pXT1（Stratagene社）、pSG5（Stratagene社）、EB0-pSV2neo、pBPV-1、pdBPVMMTneo、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pLZD35、pLXIN、pSIR（Clontech社）、pIRES-EGFP（Clontech社）、pEAK-10（Edge Biosystems社）、pTriEx-Hygro（Novagen社）、およびpCINeo（Promega社）。

30

【 0 0 3 4 】

ベクターの改変法は、SambrookおよびRussel（2001）を参照されたい。一般にベクターは、クローニングまたは発現のための1つまたはそれ以上の複製起点（ori）および遺伝システム、ホストにおける選択のための1つまたはそれ以上のマーカー（例えば抗生物質耐性）、および1つまたはそれ以上の発現カセットを含有することができる。好適な複製起点（ori）には、例えばColE1複製起点、SV40ウイルス複製起点、およびM13複製起点がある。

40

【 0 0 3 5 】

ベクターに挿入されるコード核酸配列は、例えば標準的な方法によって合成するか、または天然の供与源から単離することができる。コード配列の転写調節要素および/または他のアミノ酸コード配列へのライゲーションは、確立された方法を用いて実施することができる。真核細胞において確実に発現させるための転写調節要素（発現カセットの一部）は、当業者に公知である。これらの要素は、転写を開始させる調節配列（例えば翻訳開始コドン、プロモーター、エンハンサー、および/またはインスレーター）、内部リボソーム侵入部位（IRES）（Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98（2001）, 1471-1476）、および、必要により、転写の停止および転写物の安定化のためのポリAシグナルを含有する。更なる調節要素には、転写エンハンサー、翻訳エンハンサー、および/または、天

50

然で結合している、もしくは非相同のプロモーター領域を含んでもよい。好ましくは、本発明の核酸配列は、それらの発現制御配列に機能的に結合し、それによって真核細胞における発現が可能となる。ベクターは、更なる調節要素として、分泌シグナルをコードするヌクレオチド配列を更に含んでもよい。それらの配列は当業者に公知である。更に、使用する発現系によって、発現されたポリペプチドを細胞内コンパートメントに誘導する能力を有するリーダー配列を、本発明のポリヌクレオチドのコード配列に付加してもよい。それらのリーダー配列は当業者に公知である。

【0036】

転写開始を確実にするための調節要素の例として考えられるものには、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40 プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、LacZ プロモーター、Gal10 プロモーター、ヒト伸長因子1 プロモーター、CMV エンハンサー、CaMKキナーゼプロモーター、オートグラファ・カリフォルニア核多角体病ウイルス (Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus) (AcMNPV) 多角体プロモーター、またはSV40 エンハンサーがある。真核細胞における更なる調節要素の例として、核酸配列の下流に位置する転写終了シグナル (例えばSV40-ポリA部位またはtk-ポリA部位) またはSV40、LacZ、およびAcMNPVの核多角体病ウイルス (polyhedral) ポリアデニル化シグナルがある。

【0037】

更に、好ましくは、本発明のベクターは選択マーカーを含有する。選択マーカーの例として、ネオマイシン、アンピシリン、およびハイグロマイシン耐性などがある。特異的に設計したベクターにより、異なる宿主 (例えば細菌 - 真菌細胞または細菌 - 動物細胞) 間でDNAをシャトルすることが可能となる。

【0038】

本発明の発現ベクターは、本発明の核酸配列およびコードされるペプチドの複製および発現を引き起こす能力を有する。記載した調節要素を含有する好適な発現ベクターは当該分野で公知であり、例えばOkayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1 (Pharmacia社)、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen社。別記の実施例で使用したもの)、pSPORT1 (GIBCO BRL社)、Gatewayプラスミド (Invitrogen社)、またはpGEMHE (Promega社) がある。

【0039】

上記の本発明の核酸配列は、直接、または、以下を介して細胞内に導入されるように設計することができる: エレクトロポレーション (例えばMultiporator (Eppendorf社) またはGenepulser (BioRad) を使用)、PEI (Polysciences社 (米国ウォリントン、ドイツ エッペルハイム))、 Ca^{2+} によるトランスフェクション、または、リポソーム (例えば「リポフェクタミン」 (Invitrogen社))、非リポソーム化合物 (例えば「Fugene」 (Roche社))、リポソーム、ファージベクター、またはウイルスベクター (例えばアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス)。更に、バキュロウイルス系、または、ワクシニアウイルスもしくはセムリキ森林熱ウイルスに基づく系を、本発明の核酸配列の真核生物発現系として使用してもよい。

【0040】

本明細書では、「MHC」という用語はHLAと同義に使用する。本発明にしたがえば、「T細胞受容体によって認識されるMHC分子」を使用することが必要条件である。従って、CD8+ T細胞標的抗原のスクリーニングを行う場合、細胞(ab)によって発現されるMHCは、MHCクラスIでなければならず、また、CD4+ T細胞標的抗原のスクリーニングでは、MHCはMHCクラスIIでなければならない。更に、細胞(aa)によって発現されるT細胞受容体によって認識される、特定のMHCを使用する必要がある。検討を行っているT細胞受容体によって認識されるMHCをコードする特定のHLA遺伝子が未知の場合、予備実験を実施し、被験体 (例えば患者) の全対立遺伝子から発現させた一連のMHC (HLA) 分子全てを、当該分野で十分確立されている方法を用いてスクリーニングしてもよい。それらの方法は、例えば以下に報告されている: Robins on Jら (2003) (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/citations.html> 参照) ; Bettinotti

10

20

30

40

50

ら (2003) ; Marshら (2010)。

【 0 0 4 1 】

従って、目的の T 細胞受容体を発現する細胞 (a a) は、該 T 細胞受容体の抗原を提示する細胞 (a b) と接触すると、活性化される。T 細胞の活性化はリードアウト系によって観察することができ、これによって、(a b) と (a a) との細胞複合体の単離、または、活性化細胞 (a b) のみの単離を便宜に行うことができる。細胞の単離方法は、当該分野で公知であり、それらには、限定される訳ではないが、手作業による細胞の選別採取、または、ロボット、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション、または F A C S (蛍光活性化セルソーティング) の使用による自動化選別採取がある。それらの方法は、例えば Murray (2007) または Tungら (2007) 、並びに、以下の実施例に報告されている。

10

【 0 0 4 2 】

抗原提示細胞 (a b) の単離後、該個別細胞に含有されるペプチドライブラリーのペプチド (単数または複数) をコードする核酸分子を単離する。核酸分子の単離法は当該分野で公知であり、また、代表的な方法を以下の実施例に記載する。標的抗原またはそれをコードする核酸分子を同定する前に、該核酸分子を増幅してもよい。増幅には、例えば P C R 法 (更なる詳細は後述する) 、および / または、細菌細胞への核酸分子のトランスフェクションおよびその後の細菌培養による核酸分子の増幅がある。

【 0 0 4 3 】

その後、増幅された核酸分子またはそれらの核酸分子にコードされるペプチドを同定する。本発明に関して使用する「同定」という用語は、標的抗原 (単数または複数) のアミノ酸配列または核酸配列を決定することをいう。核酸分子の同定法には、それに限定される訳ではないが、核酸シーケンシングがある。

20

【 0 0 4 4 】

その後、標的抗原または該標的抗原をコードする核酸分子を同定する。

【 0 0 4 5 】

本発明によれば、T 細胞の標的抗原を決定するための、偏りがなく、直接的な方法が提供される。以下の実施例に示すように、短鎖ペプチドをコードする組換えコンピナトリアルライブラリーおよび好適な M H C - I 分子を細胞 (例えば C O S 細胞) に共トランスフェクトすることにより、複雑なタンパク質プロセッシングを回避することができる。ライブラリーは、短鎖ペプチドをコードするランダムヌクレオチド配列を含有するプラスミドを含有する。それらのプラスミドは容易に回収できる。トランスフェクトした C O S 細胞を、例えば以下の実施例に示すように、細胞を用いてスクリーニングする。それらの細胞は、機能性 C D 3 および下流シグナリング分子を保有し、活性化 T 細胞核因子 (N F A T) を保有する細胞中、N F A T の応答要素の制御下で、T C R 鎖および 鎖 (T 細胞受容体トランスフェクタント) 、ヒト C D 8 鎖および 鎖、そして s G F P で共トランスフェクトしたものである (Fieringra, 1990 ; Karttunen および Shastri, 1991) 。好ましくは、これらの細胞は T C R でトランスフェクトした T 細胞ハイブリドーマである。これは、それらの細胞では無限数の「再生 (revived) 」 T 細胞を得ることができ、より問題の多い「本物の」 T 細胞クローンを構築する必要がないためである。

30

40

【 0 0 4 6 】

ライブラリーを提示する C O S 細胞の集密単層に、T C R トランスフェクタントを積層する。特定の単一 T C R トランスフェクタントがライブラリーからのペプチドによって活性化されると緑色が発生し、蛍光顕微鏡下、マイクロマニピュレーターを用いて、下部の該 C O S 細胞を選択採取することができる。この高スループット法によれば、数百万のライブラリーペプチドを数時間以内で試験することができる。この方法は、これまでに報告されている方法、すなわち、プラスミドをトランスフェクトした A P C のプールで細胞毒性または分泌されたサイトカインを測定する、または、数ラウンドの F A C S ソーティングによって行うものより、効率的である (Van der Bruggenら, 1991 ; Smithら, 2001 ; Nino-Vasquezら, 2005 ; Crawford ら, 2006) 。

50

【 0 0 4 7 】

その後、回収されたC O S細胞からのライブラリー・プラスミドを単離し、新たなラウンドのスクリーニングを行い、最後にシーケンシングを行うことができる。その後、T細胞受容体活性化モチーフを解析し、データベース内の既存のタンパク質と比較することができる。この方法の実行可能性は別記の実施例に記載しているが、ここでは、十分研究が行われているT C R J M 2 2 (Gotchら, 1987; Stewart-Jonesら, 2003; Ishizukaら, 2008) を使用しており、このT C RはH L A - A 2 およびインフルエンザ基質タンパク質ペプチドf l u (5 8 - 6 6) に特異的である。

【 0 0 4 8 】

本発明の方法の主な利点は、短鎖ペプチドをコードするプラスミドベクターを提供することによって、抗原提示細胞の抗原プロセッシング機構に依存しないことである。実施例に示すように、多数の抗原提示細胞がプラスミドp c D N Aでのトランスフェクション後、コードされたペプチド(例えばf l u (5 8 - 6 6))を効率的に提示する(図2 c、e)。また、実施例で実証するように、ペプチド(例えばf l u (5 8 - 6 6))は発現後、それらのH L A - A * 0 2 0 1への負荷が起こる場所である小胞体内腔に、効率的に輸送される。特筆すべきことに、完全長タンパク質f l u (1 - 2 5 2)は認識されなかった(図2 g)。これは、完全長タンパク質がC O S 7細胞によって正確にプロセッシングされないことを示唆しており、c D N Aライブラリーの一般的な問題、すなわち、それらが選択したA P Cのプロセッシング機構に依存することを示している。患者病変中の抗原提示に全く類似した状態をインビトロで得ることは不可能であると考えられ、それにはいくつかの理由がある：第1に、多くの場合、いずれの細胞がインサイチューで(自己)抗原を提示するかということさえ知られていない。第2に、例え知られたとしても、元のA P Cを回収および増殖することは、ほとんど不可能であるか、少なくとも非常に困難である。第3に、炎症組織における抗原のプロセッシングは、健常組織に比較して、変更されている可能性がある(Martinsonら, 2009)。このため、同一の親タンパク質から、全く異なるペプチド・スペクトラムが得られうる。第4に、抗原、すなわちc D N Aライブラリーを初代細胞に導入しなければならないが、そのトランスフェクション効率および形質転換効率は非常に低いことが知られている。本明細書に開示する方法は抗原のプロセッシングに全く依存しないため、これらの問題は全て解決される。更に、C O S細胞は高い有効性でトランスフェクトすることができ、そのサイトゾル中でプラスミドベクターを増幅し、それによって回収および分析が可能となる。

【 0 0 4 9 】

本明細書に開示する結果は、ミモトープを同定し、それによって、天然に存在する親ペプチドを簡単なデータベース検索によって明確に同定できることを実証している。本発明の方法によって得られる、同定済みミモトープのリストは不完全でありうる。その理由は、一部のペプチドはC O S細胞のサイトゾル中でエンドペプチダーゼもしくはエキソペプチダーゼによって更に消化されるかもしれない、あるいは、他のペプチドは、その化学的特性のゆえに消失するかもしれない、すなわち、疎水性であって膜内に挿入されるか、または、タンパク質もしくは他の細胞成分に結合するかもしれないためである。実際に、化学的に合成したペプチドライブラリーに基づく方法が存在し、これによって、特定のT C Rの多特異性について包括的な概要が得られている(Nino-Vasquezら, 2005)。しかしながら、未知の抗原の同定に関する報告は稀である。これはおそらく、化学的に合成されたペプチドを、膨大な数の他のペプチドのプール中でしか分析できないためである。従って、「正しい」ペプチドはライブラリー中に存在するかもしれないが、その濃度が低すぎて検出できない。これに対して、本発明の高スループット法では、数百万個の陰性細胞から単一の活性化細胞を選別採取し、その後、陽性プラスミドを増幅することができる。従って、本発明の方法は実際的である：たとえミモトープのリストが不完全な可能性があっても、データベースで親ペプチドを発見するのに十分なミモトープを得ることができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法は、ファージライブラリーのスクリーニング法、または、検出手段として

オリゴマー化した可溶性 T 細胞受容体を使用する方法 (Crawfordら, 2006) を連想させるが、根本的な違いがある。それは、本発明は T C R - M H C / ペプチド相互作用の親和性の高さに依存しないことである。ファージライブラリーのスクリーニングはいくつかの選別段階を伴うため、相応の親和性が必要とされる。ファージライブラリーの一般的な適用、すなわち、抗体または受容体とリガンドの相互作用の検討では、確かに親和性の高さは十分である。これに対して、T 細胞受容体は、周知の通り親和性が低い。それらは一般に、抗体で観察されるものより数桁低い。T C R のオリゴマー化によってもこの欠点は解決できず、それは、そのようなアッセイのリードアウトも、感度が中度である結合アッセイであるためである。おそらくこれが、上記のように、未知の T 細胞抗原がこの方法によって未だ発見されていない理由である。これに対し、本発明は非常に高感度のバイオアッセイを使用する：細胞 (例えば T 細胞ハイブリドーマ) の活性化を測定するが、該細胞は、その抗原提示細胞に弱く結合するだけでよい。このアッセイの驚異的な感度によって、M H C / ペプチド複合体に対する T 細胞受容体の結合親和性の低さは相殺される。

10

【 0 0 5 1 】

本発明の方法は、科学的目的のみならず、医学的適用にも関連する。第 1 に、これは、一般的に適用できる方法である、すなわち、興味の対象であるあらゆる T 細胞に適用する。これはヒト T 細胞に限定されず、任意の種由来の任意の T C R の抗原認識特性を研究できる。これはもちろん、T 細胞が関与する多くの科学的疑問に関して非常に興味深いものである。技術的には、唯一の条件は、特定の M H C クラス I 分子が知られているか、または特定の M H C クラス II 分子が知られていることである。そうでない場合は、当該分野で確立された方法 (Robinson Jら (2003) ; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/citations.html> ; Bettinottiら (2003) ; Marshら (2010)) を用いて、候補となる対立遺伝子の全てから成る完全なセットを予備実験で同定しなければならない。その後、全ての候補 H L A 対立遺伝子を、本明細書に開示する方法で試験することができる。更に、多くの場合に (特にヒト由来サンプルを研究する場合に) 大きな問題となる初代細胞の作製は、T 細胞についても抗原提示細胞についても、必要としない。

20

【 0 0 5 2 】

しかしながら、最も重要な観点は医学分野である。T 細胞は多くの疾病に関与している。それらは感染および腫瘍を撃退し、自己免疫疾患では「自己」組織を攻撃する。ほとんどの場合、その正確な抗原は知られていない。これらのエピトープを知ることにより、科学者はその知識を診断および治療に利用することができる。このように、抗原は、感染および腫瘍を検出し、多くの自己免疫疾患の診断を改善するためのバイオマーカーとなりうる。更に、それらのバイオマーカーは、疾病の進行の予測に大きな価値を有するものでありうる。また、抗原を知るとは、治療的アプローチにも有益である。それらを感染または腫瘍に対するワクチン接種に用いることができる可能性がある (Boonら (2006))。また、それらによって、多くの自己免疫疾患 (例えば C D 8 + T 細胞が重要な役割を果たすことが知られている疾患、すなわち、多発性硬化症、乾癬、炎症性筋疾患、および他の多くの疾患) において、自己攻撃性 T 細胞クローンを選択的に除去または調節することが可能となりうる (FriesseおよびFugger, 2009 ; Dalakas, 2006 ; WalterおよびSantamaria, 2005)。

30

40

【 0 0 5 3 】

更に、抗原についての知見を得ることにより、その標的抗原への親和性を向上させるように操作した、新規の改善型 T 細胞受容体の合理的設計および開発が可能となる。それらの改善型 T 細胞受容体は、部位特異的変異導入による相補性決定領域中のアミノ酸の置換または導入によって作製することができる。改善型 T 細胞受容体を、科学的、診断的、および治療的目的で、インビトロおよびインビボにおけるその抗原の検出に使用することができる。それらを使用して、ある種の抗原を提示する細胞を検出、阻害、または除去 (毒性物質をカップリングさせることによって) してもよい。必要により、T 細胞受容体をオリゴマー化して親和性を向上させてもよい。従って、別の態様では、本発明は遺伝子操作した T 細胞受容体に関し、ここで、アミノ酸は野生型 T 細胞受容体と比較して改変されて

50

おり、該改変によって、改変されていないT細胞受容体に比較して標的抗原への親和性が増加している。

【0054】

更に、特定の抗原の知見を得ることにより、目的とする特定のT細胞受容体の改変型ペプチドリガンドの設計が可能になりうる。それらの改変型抗原は、T細胞寛容を誘導し、特定の抗原ワクチンの免疫原性を向上するのに重要でありうる。改変型および/または改善型T細胞抗原を合理的に設計する方法は、当該分野で公知である (Fontouraら (2005) ; BielekovaおよびMartin (2001)) 。

【0055】

好ましい態様では、本発明の方法は、上記方法の段階 (a) から (c) を、単一タイプの抗原をコードする単一分子タイプの核酸分子が単離されるまで反復することを含む。従って、段階 (a) から (c) を、少なくとも更に1回、例えば更に2回、更に3回、更に4回、更に5回、更に6回、更に7回、更に8回、更に9回、または更に10回反復してもよい。更に多くの回数での段階 (a) から (c) の反復も、本明細書で企図される。

【0056】

標準的な方法を用いてペプチドライブラリーを抗原提示細胞 (ab) に導入することによって、該細胞内に、コード核酸分子が1コピーより多く存在することになる。更に、培養液中に存在する核酸分子は、段階 (c) における該細胞の単離の際、抗原提示細胞と共に移動される。従って、本発明の方法の段階 (a) から (c) までは1ラウンドだけ実施すると、種々の抗原ペプチドをコードする核酸分子の多種多様なコピーを保有する抗原提示細胞、または、種々の抗原ペプチドをコードする核酸分子の多種多様なコピーが結合する対象となる抗原提示細胞が単離される。段階 (a) から (c) を反復することにより、正確な標的抗原をその後の段階 (d) で同定してもよい。理解されるように、段階 (a) を反復する際、抗原提示細胞は、前ラウンドのスクリーニングの段階 (c) で単離された抗原提示細胞から単離された核酸分子を保有する細胞である。

【0057】

以下の図6に、単一タイプの抗原をコードする単一分子タイプの核酸分子を得るための、これらの反復法の好ましい実施方法についての概略を示す。簡潔に記載すると、第1の段階で、活性化された緑色蛍光TCRトランスフェクタントを、その下部にある、活性化プラスミドを保有する抗原提示細胞と共に選別採取する。プラスミドの挿入断片をクローニングし、細菌にトランスフェクトする。細菌クローンを計数するために、細菌クローンの画分を寒天プレート上に播種する。その後、500個の独立した細菌クローンを含有する細菌のサブプールを、30またはそれ以上作製する。それらをCOS-7細胞にトランスフェクトし、再び試験する。陽性サブプールから更なるサブプールを作製する。それらの各サブプールには、より少ないクローンが含有される。最後に、単一細菌クローンを解析する。陽性クローンのシーケンシングを行い、抗原性ミモトープを解明する。

【0058】

別の好ましい態様では、細胞 (aa) は、CD8鎖、より好ましくはCD8鎖および鎖を更に発現する。

【0059】

細胞 (aa) 上でのCD8の更なる発現は、T細胞受容体 (TCR) の共受容体としての役割を果たす。CD8の細胞外IgV様ドメインは、MHCクラスI分子の3部分と相互作用する。この相互作用により、抗原特異的活性化の際、T細胞受容体発現細胞は、結合する標的細胞と近接した状態に保たれる。従って、本発明によれば、細胞 (aa) 上にCD8を更に発現させることにより、2つの細胞間の相互作用が更に向上する。

【0060】

本発明の方法の別の好ましい態様では、(d)における標的抗原の同定は、該標的抗原をコードする核酸分子のシーケンシングを含む。

【0061】

シーケンシング法には、限定される訳ではないが、直接シーケンシング、自動DNAシ

10

20

30

40

50

ーケンサーでの蛍光SSCP、およびパイロシーケンシングによる配列解析法がある。これらの方法は当該分野で公知である。例えば以下参照：Adamsら（編）“Automated DNA Sequencing and Analysis”，Academic Press，1994；Alphey，“DNA Sequencing: From Experimental Methods to Bioinformatics”，Springer Verlag Publishing，1997；Ramonら，J. Transl. Med. 1 (2003) 9；Mengら，J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 (2005) 3419-3422。

【0062】

より好ましい態様では、該標的抗原をコードする核酸分子を、シーケンシングの前に増幅する。

【0063】

核酸分子の増幅法には、限定される訳ではないが、PCRおよびその変法、例えばRT-PCR（逆転写PCRとも呼ばれる）がある。PCRは当該分野で公知であり、標的配列の多数のコピーを作製するのに使用される。これは、自動サイクラー装置によって行われ、この装置は、非常に短時間で反応液を含有する容器を加熱および冷却できる。PCRは一般的に、以下から構成されるサイクルを多数回反復することから成る：（a）変性段階（DNA分子の両鎖を融解させ、前段階の全ての酵素反応を停止させる）；（b）アニーリング段階（融解したDNA分子鎖にプライマーを特異的にアニーリングさせる）；および（c）伸長段階（テンプレート鎖からの情報を用いて、アニールしたプライマーを伸長させる）。一般的に、PCRは、例えば以下を含有する50μlの反応液中で行うことができる：5μlの10x PCRバッファー、1.5mMのMgCl₂、200μMの各デオキシヌクレオチド3リン酸、0.5μlの各プライマー（10μM）、約10-100ngのテンプレートDNA、および1-2.5ユニットのTaqポリメラーゼ。増幅のためのプライマーは、標識されていても、未標識であってもよい。DNAの増幅は、例えばモデル2400サーマルサイクラー（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスター）を用い、以下の条件で行うことができる：94℃で2分間、次いで、アニーリング（例えば50℃、30秒間）/伸長（使用するDNAテンプレートの長さおよび酵素により、例えば72℃、1分間）/変性（例えば94℃、10秒間）から成るサイクルを30-40サイクル、そして、最終アニーリング段階（55℃、1分間）並びに最終伸長段階（72℃、5分間）。DNAテンプレート共に使用するのに好適なポリメラーゼには、例えばE. coli DNAポリメラーゼIまたはそのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、好熱菌から単離された熱安定性DNAポリメラーゼであるVent、Amplitaq、iProof、Pfu、およびKODがあり、これらの一部は、校正（proof-reading）機能および/または異なる至適温度を有する。しかしながら、特定の核酸分子を増幅するために異なる長さおよび/もしくは組成のプライマーを使用してPCR条件を最適化する方法、または、反応混液の容量をスケールダウンもしくはスケールアップするための方法は、当業者に公知である。増幅すべき核酸がRNAから成る場合は、「逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」（RT-PCR）を使用する。「逆転写酵素」という用語は、デオキシリボヌクレオチド3リン酸の重合化を触媒し、リボ核酸テンプレートに相補的なプライマー伸長産物を生成する酵素を意味する。RT-PCRは、RNAウイルスを用いて本発明の方法に使用するためのライブラリープラスミドをコードさせる場合に、特に適している。酵素により、プライマーの3'末端で合成が開始され、テンプレートの5'末端に向かって、合成が停止するまで進行する。RNA標的配列を相補的DNA（cDNA）配列に変換する好適な重合化剤の例として、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素および高度好熱菌（*Thermus thermophilus*）DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer社から販売されている、逆転写酵素活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼ）がある。一般に、最初の逆転写段階の後、第1の変性段階でゲノムRNA/cDNAデュプレックステンプレートを熱変性させ、DNA鎖を増幅テンプレートとして使用できる状態にする。高温RTにより、プライマーの特異性が高くなり、効率が向上される。米国特許出願第07/746,121号（1991年8月15日出願）は、「ホモジニアスRT-PCR」について開示しており、このPCRでは、逆転写およびPCR増幅段階の両方を同じプライマーおよびポリメ

10

20

30

40

50

ーゼで行うことができ、反応条件は、試薬を変更せずに両反応が起こるように最適化する。高度好熱菌DNAポリメラーゼ（逆転写酵素としても機能する熱耐性DNAポリメラーゼ）は、テンプレートにかかわらず、全てのプライマー伸長段階に使用することができる。両過程を、試薬を変更または添加するためにチューブを開けることなく、行うことができる；ただし、温度プロファイルは、第1のサイクル（RNAテンプレート）と残りの増幅サイクル（DNAテンプレート）間で調整する。RT反応は、例えば以下を含有する20 μ lの反応液中で行うことができる：4 μ lの5x AMV-RTバッファー、2 μ lのオリゴdT（100 μ g/ml）、2 μ lの10mM dNTP、1 μ lの総RNA、10ユニットのAMV逆転写酵素、およびH₂O（最終容量を20 μ lに調整）。反応は、例えば以下の条件を用いて行うことができる：反応液を70 で15分間保持し、逆転写を行わせる。次いで、反応温度を上昇させ、95 で1分間、RNA-cDNAデュプレックスを変性させる。その後、95 で15秒間/60 で20秒間から成るサイクルを2サイクル行った後、90 で15秒間/60 で20秒間から成るサイクルを38サイクル行う。最後に、反応温度を60 4分間保持して最終の伸長段階を行い、15 に冷却して、増幅したサンプルを更に処理するまでこの温度を維持する。上記の反応条件はいずれも、特定の状況の必要に応じてスケールアップしてもよい。

10

【0064】

当業者は、十分確立された方法を用いて、核酸分子のシーケンシングおよび増幅の両方に好適なプライマーを構築することができる。例えば、プライマーの配列は、ペプチドライブラリーをコードするランダム核酸配列の上流および下流隣接領域、例えば、該核酸配列を挿入したプラスミドバックボーン、ペプチドの発現に使用されるプロモーター配列、または他の調節配列（エンハンサー配列など）に関する知見に基づいて構築してもよい。

20

【0065】

本発明の方法の更なる好ましい態様では、(d)の標的抗原の同定は、抗原の少なくとも1つのミモトープを同定することを含む。

【0066】

本発明によれば、「ミモトープ」という用語は、抗原エピトープの構造を模倣した分子を指す。該分子は、例えばペプチドであってもよい。その模倣性により、ミモトープは、野生型抗原エピトープによって引き起こされるのと同じT細胞受容体応答を誘導する。従って、特定の抗原エピトープを認識するT細胞受容体は、その抗原エピトープを模倣するミモトープも認識する。好ましくは、ミモトープは、特定のT細胞受容体の天然の標的抗原エピトープと、そのアミノ酸構造（例えばアミノ酸配列および組成）において、例えばアミノ酸構造中の40個未満のアミノ酸、例えば30個未満のアミノ酸、20個未満のアミノ酸、15個未満のアミノ酸、10個未満のアミノ酸、5個未満のアミノ酸、4個未満のアミノ酸、3個未満のアミノ酸、そして最も好ましくは1個のアミノ酸が異なっている。

30

【0067】

本明細書で使用する「少なくとも1つのミモトープ」とは、所定の抗原に関する任意数の可能なミモトープをいう。これには、例えば少なくとも2個のミモトープ、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、または少なくとも10個のミモトープが含まれる。また、少なくとも15個、例えば少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも75個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、または少なくとも500個のミモトープも含まれる。

40

【0068】

この態様は、本発明の方法によってミモトープを同定できるという知見に基づき、その後、それをデータベース検索に使用して野生型抗原を同定することができる。このように、本発明の方法によって実際の抗原が直接同定されなくても、後述する実施例のように、該ミモトープを介して間接的に同定できる。

50

【 0 0 6 9 】

本発明の方法の別の好ましい態様では、抗原提示細胞は、ペプチドライブラリーを増幅する能力を有する細胞である。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用する「ペプチドライブラリーを増幅する能力を有する細胞」という用語は、核酸配列またはベクターを複製する能力のある細胞を指す。それらの細胞は当該分野で公知である。非制限的な例として以下がある：上記のSV40起点を有するプラスミドを使用する場合、大型T抗原を含有する細胞；Durocherら（2002）に報告されるEBNA系を含む細胞、またはウイルス（例えばレトロウイルス、アデノウイルス、またはレンチウイルス）で形質転換するのに好適な細胞で、それらのレトロウイルスベクターのホストとなり、それらを増幅しうるもの（Smithら（2001））。また、該系を内因的に発現しない細胞を使用してもよく、この場合、細胞は、単に、それぞれの系に必要とされる成分、例えば大型T抗原でトランスフェクトまたは形質転換してもよい。

10

【 0 0 7 1 】

本発明によれば、好適な程度の増幅は、最初に該細胞内にトランスフェクトまたは形質転換されたものより、多くのコピーの核酸配列が存在する場合に、達成される。従って増幅が達成されるのは、核酸配列コピーの量が少なくとも2倍、例えば、1つの分子種の核酸配列のコピーが少なくとも5%多く、例えば少なくとも10%多く、例えば少なくとも20%多く、例えば少なくとも30%多く、例えば少なくとも50%多く、例えば少なくとも100%多く、例えば少なくとも200%多く、例えば少なくとも500%多く、例えば少なくとも1,000%多く、例えば少なくとも2,000%多く、例えば少なくとも3,000%多く、例えば少なくとも4,000%多く、例えば少なくとも5,000%多く、例えば少なくとも10,000%多く、例えば少なくとも15,000%多く、例えば少なくとも50,000%多く、例えば少なくとも100,000%多く、例えば少なくとも250,000%多く、例えば少なくとも500,000%多く、細胞に存在する場合である。

20

【 0 0 7 2 】

特定の細胞がペプチドライブラリーを増幅する能力を有するか否かを確認するために、該細胞の一部を用いて、トランスフェクション／形質転換の直後に、1つの分子タイプの核酸配列のコピー数について分析することができる。更に、同じ分析を、後の時点（単数または複数）に回収した細胞で反復し、測定されたコピー数を比較してもよい。所定の核酸配列のコピー数の定量または半定量の方法は当該分野で公知であり、それらには、限定される訳ではないが、本明細書に別途記載するPCR法がある。

30

【 0 0 7 3 】

より好ましい態様では、抗原提示細胞は以下から成る群から選択される：COS-7、HEK、HeLa、H9、Jurkat、NIH3T3、C127、COS-1、CV1、QC1-3、マウスL細胞、マウスC2C12細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、Wi-38、MRC-5、昆虫細胞（例えばSf9細胞、Hi-5細胞）。

【 0 0 7 4 】

別の好ましい態様では、リードアウト系はレポータータンパク質の活性化を含む。

40

【 0 0 7 5 】

本明細書で使用する「レポータータンパク質」という用語は、研究対象であるある種の刺激に应答して発現され、容易に検出されるタンパク質をいう。従って、本発明によれば、レポータータンパク質がT細胞活性化の際に発現されるのが好ましい。好ましくは、レポータータンパク質は、容易に検出されるタンパク質であり、より好ましくは、研究を行う細胞中に通常存在しないタンパク質である。レポータータンパク質の非制限的な例として、以下がある： - ガラクトシダーゼ（細菌遺伝子、lacZにコードされる）、ルシフェラーゼ（例えば細菌ルシフェラーゼ（luxAB）、ホタルルシフェラーゼ、およびウミシイタケルシフェラーゼ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C

50

A T ; 細菌由来)、G U S (- グルクロニダーゼ ; 通常、植物で使用される)、並びに、緑色蛍光タンパク質 (G F P ; クラゲ由来) およびその改変体、例えばC F P、Y F P、E G F P、G F P +。更なる非制限的例として、以下がある : アルカリホスファターゼまたは分泌型アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 - キシロシダーゼ、X y l E (カテコールジオキシゲナーゼ)、T r e A (トレハラーゼ)、並びに、サンゴ由来発光タンパク質、例えばD S R e d、H c R e d、A m C y a n、Z s G r e e n、Z s Y e l l o w、A s R e d。

【 0 0 7 6 】

更に、レポータータンパク質は、抗生物質耐性を与えるタンパク質であってもよい。この場合、好ましくは、細胞を抗生物質の存在下で培養し、レポータータンパク質を発現するクローンだけが増殖できるようにする。一般に、タンパク質は以下のような抗生物質に対する耐性に関与する : ハイグロマイシン、ジェネティシン (G 4 1 8)、ピューロマイシン、プラスチックジン、ゼオシン、ヒスチジノール、メトトレキサート、キサンチン / ヒポキサンチン - アミノプテリン - ミコフェノール酸含有培地 (G p t 選択)、H A T 選択、トリプトファン未含有インドール培地、またはフレオマイシン (R. Vile (1991) Meth Mol. Biol. 8:49-60)。

【 0 0 7 7 】

より好ましい態様では、レポータータンパク質は、蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物から成る群から選択される。

【 0 0 7 8 】

より好ましくは、レポータータンパク質は、以下から成る群から選択される : G F P およびG F P の改変体、例えばC F P、Y F P、E G F P、G F P +、s G F P、細菌ルシフェラーゼ (l u x A B)、ホタル・ルシフェラーゼ、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ、およびサンゴ由来発光タンパク質、例えばD S R e d、H c R e d、A m C y a n、Z s G r e e n、Z s Y e l l o w、A s R e d。

【 0 0 7 9 】

本発明は更に、T 細胞受容体 鎖の可変領域、超可変領域、および / または、結合領域をコードする核酸分子を同定する方法に関し、該方法は、T 細胞受容体を発現するT 細胞から得た該核酸分子を、SEQ ID NO:1-9に示すプライマーから選択されるプライマーまたはプライマー・セットを用いて増幅することを含む。

【 0 0 8 0 】

本発明の他の方法に関する上記の定義および好ましい態様は、このT 細胞受容体 鎖をコードする核酸分子の同定法、並びに、以下に記載するそれらの好ましい態様にも準用される。

【 0 0 8 1 】

好ましくは、T 細胞は単一のT 細胞、すなわち、個別のT 細胞または個別のT 細胞をクローン増殖したものである。すなわち、T 細胞は単一の分子タイプの細胞のみを示す。

【 0 0 8 2 】

本発明の方法によれば、当該分野で公知の方法 (例えば、本明細書に記載する方法) を用いて、T 細胞から核酸分子を得る。

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用する「セット」という用語は、プライマーを組み合わせたものをいう。本発明のプライマー・セットは、1つより多い分子種のプライマーが存在することを必要とする。従って、SEQ ID NO:1-9のプライマーから選択される、少なくとも2つの異なるプライマー、例えば少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、または少なくとも9つの異なるプライマーが、プライマー・セットに含まれる。

【 0 0 8 4 】

本発明によれば、T 細胞受容体のV -プライマーを、種々の機能性V 遺伝子ファミリーの配列相同性に基づいて同定した。プライマー位置は、直接シーケンシングによって

10

20

30

40

50

それぞれの T C R V 遺伝子を同定できるようなものである。更に、P C R 増幅の際に起こりうる相互作用を最小限にするように、V レパートリーのプライマー間での調整および 24 個の V プライマーとの調整を行った。9 個の V -プライマーのセット (V p 1-9。表 1) は、全ての機能性 V 遺伝子を網羅する。リーダーセグメントに位置する V p 1 以外は、全てのプライマーが V 遺伝子セグメントに位置する。C (o u t) -プライマー (SEQ ID NO:11) と組み合わせ、これらのプライマーのそれぞれから、対応する再構成 V 遺伝子が効率的に増幅されたことが、アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって明らかとなった (図 8 A)。

【 0 0 8 5 】

【表 1】

表 1 V p プライマーが網羅する V β プライマーおよび T R B V サブファミリー

Vp プライマー	配列	SEQ ID NO:	TRBV ファミリー	塩基対
Vp1	5'-TSY TTT GTC TCC TGG GAG CA -3'	1	5, 9, 13, 14, 19	29-48
Vp2	5'-CCT GAA GTC GCC CAG ACT CC -3'	2	2, 16	4-23
Vp3	5'-GTC ATS CAG AAC CCA AGA YAC C -3'	3	15, 18	10-31
Vp4	5'-GGW TAT CTG TMA GMG TGG AAC CTC -3'	4	20, 29	30-53
Vp5	5'-ATG TAC TGG TAT CGA CAA GAY C -3'	5	6, 10, 24, 25, 27, 28	94-115
Vp6	5'-CAC TGT GGA AGG AAC ATC AAA CC -3'	6	30	69-91
Vp7	5'-TCT CCA CTC TSA AGA TCC AGC -3'	7	7, 11, 12	221-241
Vp8	5'-CAG RAT GTA RAT YTC AGG TGT GAT CC -3'	8	7	50-75
Vp9	5'-CCA GAC WCC AAR AYA CCT GGT CA -3'	9	3, 4	15-37

縮重塩基対の表記は、混合塩基の I U P A C の表記に基づく。例：S=C または G ; Y =T または C ; W=T または A ; M=C または A ; R=A または G ; K=G または T ; V=A または C または G ; H=A または T または C ; D=A または T または G ; B=T または C または G ; N=A または T または C または G (Cornish-Bowden A: IUPAC-IUB symbols for nucleotide nomenclature. Nucleic Acids Res 1985, 13:3021-3030.)

【 0 0 8 6 】

T 細胞受容体 鎖をコードする核酸分子の同定法の好ましい態様では、増幅は、C (o u t) -プライマー (SEQ ID NO:11) の使用を更に含む。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 Cプライマーおよびユニバーサル・プライマー (UP)

C プライマー	配列	SEQ ID NO:
C α out	5' -GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG -3'	10
C β out	5' -TGG TCG GGG AAG AAG CCT GTG -3'	11
C α in	5' -AG TCT CTC AGC TGG TAC ACG -3'	12
UP	5' -ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A -3'	13
C β in	5' -TCT GAT GGC TCA AAC ACA GC -3'	14

10

【0088】

T細胞受容体鎖をコードする核酸分子の同定法の更なる好ましい態様では、この方法は、対合するT細胞受容体鎖の可変領域、超可変領域、および/または結合領域をコードする核酸分子を同定することを更に含み、同定は、SEQ ID NO:15-38のプライマーから選択されるプライマーまたはプライマー・セットを用いて該核酸分子を増幅することによって行う。

20

【0089】

SEQ ID NO:15-38に示す24個のT細胞受容体V β -プライマーは、最近、TCR β Vレパートリーの増幅に関して報告されたものであるが(Seitz, Schneiderら,2006)、それらを表3に示す。

【0090】

【表 3】

表 3 V α プライマー

Vp プライマー	配列	SEQ ID NO:
V α -1 ¹⁴ -for-out	5' -AGS AGC CTC ACT GGA GTT G -3'	15
V α -1 ²³⁵ -for-out	5' -CTG AGG TGC AAC TAC TCA TC -3'	16
V α -2-for-out	5' -CAR TGT TCC AGA GGG AGC C -3'	17
V α -3, 25-for-out	5' -GAA RAT GYC WCC ATG AAC TGC -3'	18
V α -4, 20-for-out	5' -WTG CTA AGA CCA CCC AGC C -3'	19
V α -5-for-out	5' -AGA TAG AAC AGA ATT CCG AGG -3'	20
V α -6, 14-for-out	5' -RYT GCA CAT ATG ACA CCA GTG -3'	21
V α -7-for-out	5' -CAC GTA CCA GAC ATC TGG G -3'	22
V α -8, 21-for-out	5' -CCT GAG YGT CCA GGA RGG -3'	23
V α -9-for-out	5' -GTG CAA CTA TTC CTA TTC TGG -3'	24
V α -10, 24-for-out	5' -AST GGA GCA GAG YCC TCA G -3'	25
V α -11-for-out	5' -TCT TCA GAG GGA GCT GTG G -3'	26
V α -12-for-out	5' -GGT GGA GAA GGA GGA TGT G -3'	27
V α -13, 19, 26-for-out	5' -SAA STG GAG CAG AGT CCT C -3'	28
V α -15-for-out	5' -CCT GAG TGT CCG AGA GGG -3'	29
V α -16-for-out	5' -ATG CAC CTA TTC AGT CTC TGG -3'	30
V α -17-for-out	5' -TGA TAG TCC AGA AAG GAG GG -3'	31
V α -18-for-out	5' -GTC ACT GCA TGT TCA GGA GG -3'	32
V α -22, 31-for-out	5' -CCC TWC CCT TTT CTG GTA TG -3'	33
V α -23, 30-for-out	5' -GGC ARG AYC CTG GGA AAG G -3'	34
V α -27-for-out	5' -CTG TTC CTG AGC ATG CAG G -3'	35
V α -28-for-out	5' -AGA CAA GGT GGT ACA AAG CC -3'	36
V α -29-for-out	5' -CAA CCA GTG CAG AGT CCT C -3'	37
V α -32-for-out	5' -GCA TGT ACA AGA AGG AGA GG -3'	38

変性塩基対の表記は、混合塩基の IUPAC 表記に基づく。例：S=C または G；Y=T または C；W=T または A；M=C または A；R=A または G；K=G または T；V=A または C または G；H=A または T または C；D=A または T または G；B=T または C または G；N=A または T または C または G (Cornish-Bowden A: IUPAC-IUB symbols for nucleotide nomenclature. Nucleic Acids Res 1985, 13:3021-3030.)

【0091】

好ましい態様では、増幅は C o u t -プライマー (SEQ ID NO:10) の使用を更に含む。

【0092】

T 細胞受容体 鎖をコードする核酸分子の同定法のより好ましい態様では、この方法は以下の段階：

(i)

(a) SEQ ID NO:1-9のプライマー；および/もしくは

(b) SEQ ID NO:15-38のプライマー

を含有するプライマー・セットを用いて核酸分子を増幅し；

(i i) SEQ ID NO:39-47のプライマーを含有するプライマー・セットを用いて、(i)

(a) の反応産物を増幅し；そして/または、

(i i i - a)

10

20

30

40

50

(a) SEQ ID NO:13のプライマー ; および
 (b) SEQ ID NO:14のプライマー
 を用いて (i i) の反応産物を増幅し ; そして / または、
 (i i i - b)
 (a) SEQ ID NO:48-83のプライマー・セット ; および
 (b) SEQ ID NO:12のプライマー
 を用いて (i) (b) の反応産物を増幅する
 ことを含む。

【 0 0 9 3 】

【 表 4 】

表 4 Vp + プライマー

Vp+ プラ	配列	SEQ ID NO:
Vp1+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA CYTTTGTCTCCTGGGAGCA -3'	39
Vp2+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA CCTGATGTCGCCCAGACTCC -3'	40
Vp3+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA GTCATSCAGAACCCAAGAYACC -3'	41
Vp4+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA GGWTATCTGTMAGMGTGGAACCTC -3'	42
Vp5+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA ATGTACTGGTATCGACAAGAYC -3'	43
Vp6+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA CACTGTGGAAGGAACATCAAACC -3'	44
Vp7+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA TCTCCACTCTSAAGATCCAGC -3'	45
Vp8+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA CAGRATGTARATYTCAGGTGTGATCC -3'	46
Vp9+	5' -ACAGCACGACTTCCAAGACTCA TCAGACWCCAARAYACCTGGTCA -3'	47

変性塩基対の表記は、混合塩基の I U P A C 表記に基づく。例 : S=C または G ; Y=T
 または C ; W=T または A ; M=C または A ; R=A または G ; K=G または T ; V=A または
 C または G ; H=A または T または C ; D=A または T または G ; B=T または C または
 G ; N=A または T または C または G (Cornish-Bowden A: IUPAC-IUB symbols for
 nucleotide nomenclature. Nucleic Acids Res 1985, 13:3021-3030.)

【 0 0 9 4 】

10

20

30

【表 5】

表 5 V α ネステッド・プライマーおよびそれらの好ましいセット

Vp+プライマー		配列	SEQ ID NO:
セット 1		5'-ACA GAA GAC AGA AAG TCC AGC	48
	V α -4/1-for-in	-3'	
	V α -4/2-for-in	5'-GTC CAG TAC CTT GAT CCT GC -3'	49
	V α -6-for-in	5'-GCA AAA TGC AAC AGA AGG TCG -3'	50
	V α -8/1-for-in	5'-CAG TGC CTC AAA CTA CTT CC -3'	51
	V α -8/2-for-in	5'-GCC TCA GAC TAC TTC ATT TGG -3'	52
	V α -14-for-in	5'-ACA GAA TGC AAC GGA GAA TCG -3'	53
	V α -24-for-in	5'-CCT TCA GCA ACT TAA GGT GG -3'	54
セット 2	V α -28-for-in	5'-TCT CTG GTT GTC CAC GAG G -3'	55
	V α -2/1-for-in	5'-TGG AAG GTT TAC AGC ACA GC -3'	56
	V α -2/2-for-in	5'-TGG AAG GTT TAC AGC ACA GG -3'	57
	V α -5-for-in	5'-CAG CAT ACT TAC AGT GGT ACC -3'	58
	V α -10-for-in	5'-TCA CTG TGT ACT GCA ACT CC -3'	59
	V α -12-for-in	5'-TAC AAG CAA CCA CCA AGT GG -3'	60
	V α -22-for-in	5'-AGG CTG ATG ACA AGG GAA GC -3'	61
	V α -31-for-in	5'-GTG GAA TAC CCC AGC AAA CC -3'	62
セット 3	V α -7-for-in	5'-CTC CAG ATG AAA GAC TCT GC -3'	63
	V α -13-for-in	5'-TTA AGC GCC ACG ACT GTC G -3'	64
	V α -17-for-in	5'-CTG TGC TTA TGA GAA CAC TGC -3'	65
	V α -18-for-in	5'-CC TTA CAC TGG TAC AGA TGG -3'	66
	V α -21-for-in	5'-TGC TGA AGG TCC TAC ATT CC -3'	67
	V α -23-for-in	5'-GTG GAA GAC TTA ATG CCT CG -3'	68
	V α -32-for-in	5'-TCA CCA CGT ACT GCA ATT CC -3'	69
セット 4	V α -3-for-in	5'-TTC AGG TAG AGG CCT TGT CC -3'	70
	V α -11-for-in	5'-AGG GAC GAT ACA ACA TGA CC -3'	71
	V α -15-for-in	5'-CCT CCA CCT ACT TAT ACT GG -3'	72
	V α -19-for-in	5'-CCT GCA CAT CAC AGC CTC C -3'	73
	V α -25-for-in	5'-AGA CTG ACT GCT CAG TTT GG -3'	74
	V α -26-for-in	5'-CCT GCA TAT CAC AGC CTC C -3'	75
	V α -29-for-in	5'-ACT GCA GTT CCT CCA AGG C -3'	76
セット 5	V α -1/235-for-in	5'-AAG GCA TCA ACG GTT TTG AGG -3'	77
	V α -1/14-for-in	5'-CTG AGG AAA CCC TCT GTG C -3'	78
	V α -9-for-in	5'-ATC TTT CCA CCT GAA GAA ACC -3'	79
	V α -16-for-in	5'-TCC TTC CAC CTG AAG AAA CC -3'	80
	V α -20-for-in	5'-ACG TGG TAC CAA CAG TTT CC -3'	81
	V α -27-for-in	5'-ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG -3'	82
	V α -30-for-in	5'-CTC TTC ACC CTG TAT TCA GC -3'	83

【0095】

上記の方法により、第1段階（段階（i））において、24個のV 特異的プライマーおよび9個のV 特異的プライマー（Vp1-Vp9）（これらは、機能的およびTCR可変領域遺伝子の全てを網羅する）を含有するプライマーのプールを用いて、目的の細胞から単離したcDNAから、全てのV 鎖および/または 鎖を同時に増幅することが可能となる。第2の段階、すなわち段階（ii）では、前増幅産物から、個別の再構成TCR V 鎖を増幅する。23個という多数の異なるV 遺伝子サブファミリーを使

10

20

30

40

50

用して1つのサンプル中でV 特異的ネステッドPCRを行うことはできないため、段階 (i i) では、ユニバーサル・プライマー配列をTCR 鎖 PCR産物の5'末端に導入する。これを行うために、ユニークな21ヌクレオチド長配列を、プライマー相互作用またはヒト遺伝子との相同性を有さないように設計し、9個の異なるVp (Vp1 - 9) プライマーの5'末端に付加した (本明細書ではVp + プライマーと称する) 。前増幅産物の一部を用い、それらの伸長型プライマーを使用してラン・オフ (run-off) PCRを行った後、第3のセミ・ネステッドPCRを行う。これは、ユニバーサル・プライマーをネステッドC (2) プライマー (SEQ ID NO:14) と共に使用し、TCR V 遺伝子ファミリーから独立した、個別の単一細胞再構成TCR V を増幅する (段階 (i i i - a)) 。このPCR法を、図9に示す。これと同時に、またはこれに続いて、対応する再構成TCR V を、異なるネステッドPCR (すなわち、段階 (i i i - b)) において多重PCRで前増幅 (すなわち、段階 (i)) から増幅する。好ましくは、Seitzらが報告する個別反応ではなく、表5に示す5つのV プライマー・プールを用いて、5つだけの異なるネステッドPCRを行う。その後、増幅された再構成TCR 鎖および鎖を直接シーケンシングによって特性決定する。

【0096】

好ましい態様では、上記の方法を行う前に、細胞 (好ましくは単一細胞またはクローン増幅した単一タイプの細胞) のmRNAからcDNAへの逆転写段階を行う。それらの逆転写法は公知であり、例えば、ワンステップRT - PCRキット (例えばQIAGEN社製) および遺伝子特異的C および プライマーを用いて行ってもよい。

【0097】

単一T細胞の再構成 - TCRペアの分子解析は、約70個のTCR V 領域遺伝子および約50個のTCR V 領域遺伝子の完全なスペクトラムを包含しなければならない。本発明では、最近TCR V レポートリーの同時増幅に関して報告された24個のTCR V プライマーのセット (Seitz, Schneiderら, 2006) と共に、TCR 鎖レポートリーの種々のV 遺伝子ファミリーの全てを増幅できるPCR法を構築した。この方法の複雑さは、特異的増幅に干渉しうる、多数のプライマー間で起こりうる相互作用に起因する。本発明では、1つの反応で全てのTCR V 遺伝子およびV 遺伝子を前増幅することが可能な多重RT - PCRから開始する、PCRプロトコルを確立した。その後、TCR V - およびV - PCR産物を別々に処理する。

【0098】

更に本発明は、患者特異的T細胞抗原の同定法に関し、この方法は、
 (A) 該患者から得たサンプルからT細胞を単離し；
 (B) (A) で単離したT細胞から対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を同定し；そして、
 (C) 本発明の方法に従って、T細胞抗原を同定し、ここで、機能性T細胞受容体およびT細胞活性化のリードアウト系を含有する細胞は、(B) で同定された、対合するT細胞受容体 鎖および 鎖を発現する、
 ことを含む。

【0099】

本発明の方法に関連する上記の定義および好ましい態様は、この患者特異的T細胞抗原同定法にも準用される。

【0100】

この患者特異的T細胞抗原同定法では、T細胞を患者から単離する。患者からT細胞を単離する方法は当該分野で公知であり、それらに限定される訳ではないが、以下によるT細胞の単離がある：凍結組織生検サンプルからのレーザー・マイクロダイセクション；手作業またはマイクロマニピュレーターによる、生細胞を有する新鮮な生検標本からの生細胞または死細胞の選択採取；FACSソーティング装置を用いる細胞の単離；限界希釈によるエクスピボ・クローニング (細胞は、あらかじめ好適な腫瘍細胞株と融合させて不死化ハイブリドーマ細胞とするか、または、融合を行わない) (Burgemeister R. (2005) J

10

20

30

40

50

Histochem Cytochem. 53:409-12 ; Erickson HSら (2008) Methods Mol Biol. 424:433-48 ; Dainiak MBら (2007) Adv Biochem Eng Biotechnol. 106:1-18 ; Tung JWら (2007) Clin Lab Med. 27:453-68)。

【 0 1 0 1 】

次の段階では、該細胞内で発現したヘテロ 2 量体 T 細胞受容体を同定する。T 細胞からの T 細胞受容体の同定法は当該分野で公知であり、それらに限定される訳ではないが、以下がある：クローン特異的プライマーを使用する P C R による T 細胞受容体 鎖および鎖の増幅（例えば鎖の一方の配列が知られている場合。例えば C D R 3 スペクトラタイピング（Pannetierら（1995））または T C R の可変領域上のエピトープを認識する抗体を使用する免疫組織化学による）、または、多数の異なる（例えば未知の）T C R 鎖を増幅させることができる 1 つもしくはそれ以上の P C R プライマー・セットを用いる P C R による T 細胞受容体 鎖および 鎖の増幅。それらの方法には、それに限定される訳ではないが、T 細胞受容体 鎖および 鎖の可変領域、超可変領域、および / または結合領域をコードする核酸分子を同定する上記の本発明の方法があり、例えば、鎖には Seitzら（2006）が開示するプライマー、鎖の可変領域、超可変領域、および / または結合領域には本明細書に開示する V プライマーを使用する。これ以外に、T 細胞からの T 細胞受容体の同定法に好適なプライマー・セットには、限定される訳ではないが Genevee（1992）；Monteiroら（1996）；Roersら（2000）；Gagneら（2000）、または Zhouら（2006）に開示されるものがある。その後、このようにして同定された T 細胞受容体を、本発明にかかる T 細胞標的抗原の同定法の細胞（a a）に使用し、本発明の方法を上記のように実施する。

10

20

【 0 1 0 2 】

好ましい態様では、患者から単離した T 細胞は、単一の分子タイプの T 細胞を示す。更に、好ましくは、それらの細胞から単離した T 細胞受容体は、単一の分子タイプの T 細胞受容体を示す。更に好ましくは、態様は、単一細胞中で発現される 2 つの異なる T 細胞受容体、すなわち、2 つの異なる V 鎖と 1 つの V 鎖、およびその逆を有する T 細胞受容体に関連してもよい。

【 0 1 0 3 】

本発明の患者特異的抗原探索法の主な利点は、非常に複雑なインビボの状態を、インビトロ条件に直接移行できることである。これは非常に興味深いことであり、なぜなら、多くの異なる細胞タイプおよび多くの異なる T 細胞が炎症性病変に存在するが、それらのごく一部しか、疾病の発症または進行に関係しないからである。炎症性自己免疫病変において特定の目的の個別 T 細胞を分析する方法が近年報告された（Seitzら、2006）。これによって、種々のインビボ条件において、関連 T 細胞と非関連 T 細胞を識別することが可能となる：例えば、関連 T 細胞は、自己免疫疾患における自己攻撃性 T 細胞、腫瘍性疾患における腫瘍浸潤性 T 細胞、または感染性疾患における抗ウイルス T 細胞であってもよい。非関連細胞は、非特異的に炎症環境に誘引されるバースタンダー細胞、血管中の細胞、または免疫サーベイランスの際のパトローリング T 細胞であってもよい。選択した個別の T 細胞を、例えば凍結組織生検サンプルからのレーザー・マイクロダイセクション、または他の上記の単一細胞単離法によって単離し、その対合する T C R 鎖および 鎖をクローニングし、5 8 T 細胞ハイブリドーマ株で発現させることができる。この検出法を本明細書に記載する抗原探索法と併用し、推定される病原性 T 細胞または有益 T 細胞の抗原を、直接的で、迅速かつ安価な高スループットアッセイで特性決定することができる。それらの T 細胞受容体をトランスフェクトしたハイブリドーマ細胞には、「本物の」T 細胞または T 細胞株を使用する他の方法とは異なり、実質的に細胞数の制限がないという利点があり、これは、ハイブリドーマ細胞が迅速かつ確実に増殖するためである。

30

40

【 0 1 0 4 】

患者特異的 T 細胞抗原同定法の好ましい態様では、対合する T 細胞受容体 鎖および鎖を段階（B）で同定し、これは、該 T 細胞受容体 鎖および 鎖の可変領域、超可変領域、および / または結合領域を上記の本発明の方法に従って同定することによって行う。

50

【 0 1 0 5 】

以下の実施例 4 に詳述するように、本明細書に開示するプライマーまたはプライマー・セットを使用する本発明の方法により、T 細胞受容体 鎖の可変領域、超可変領域、および/または結合領域を、対合する 鎖と併せて同定することが可能となる。

【 0 1 0 6 】

本発明はまた、本発明の方法によって同定される T 細胞抗原、そして/または、本発明の患者特異的 T 細胞抗原同定法によって同定される T 細胞抗原を含有する組成物にも関する。

【 0 1 0 7 】

本発明に関連して使用する「組成物」という用語は、本発明に従って同定された T 細胞抗原を少なくとも 1 つ含有する組成物を指す。必要により、本発明の T 細胞抗原の特性を改変する（例えば T 細胞抗原を安定化する）能力を有する分子を更に含有してもよい。組成物は固体、液体、または気体であってもよく、特に、粉末（単数または複数）、錠剤（単数または複数）、溶液（単数または複数）、またはエアロゾル（単数または複数）であってもよい。

【 0 1 0 8 】

上記のように、本発明の方法によって同定される T 細胞抗原は、感染および腫瘍の検出、および自己免疫疾患の診断向上のためのバイオマーカーとしての役割を果たし、疾病進行の予測に非常に有用である。更に、該 T 細胞抗原は治療的アプローチに有用である：それらを感染または腫瘍に対するワクチン投与に使用することができ、それによって、自己免疫疾患（例えば多発性硬化症、乾癬、炎症性筋疾患、および他の多くの疾患）において、自己攻撃性 T 細胞クローンを選択的に除去または調節することが可能となりうる。従って、本発明の組成物は、（例えばワクチンに使用するための）T 細胞活性化能を有してもよく、または、（例えば T 細胞クローンの除去に使用するための）T 細胞中和能を有してもよい。

【 0 1 0 9 】

好ましい態様では、組成物は医薬組成物である。

【 0 1 1 0 】

本発明によれば、「医薬組成物」という用語は、患者（好ましくはヒト患者）に投与するための組成物をいう。本発明の医薬組成物は、上記の化合物、すなわち T 細胞抗原を含有する。本発明の医薬組成物は、必要により、また、付加的に、医薬的に許容されるキャリアおよび/または賦形剤を含有してもよい。「医薬的に許容されるキャリアおよび/または賦形剤」とは、非毒性の固体、半固体、または液体である充填剤、希釈剤、カプセル化のための物質、または任意のタイプの製剤補助剤を意味する。好適な医薬キャリアおよび/または賦形剤の例は当該分野で公知であり、それらには塩化ナトリウム溶液、リン酸緩衝食塩水、水、エマルジョン、例えば油/水エマルジョン、種々のタイプの湿潤剤、無菌溶液、有機溶媒、例えば DMSO などがある。好ましくは、キャリア/賦形剤は非経口キャリア/賦形剤であり、より好ましくはレシipientの血液と等張の溶液である。キャリア/賦形剤は、少量の添加剤（例えば等張性および化学安定性を向上する物質）を必要に応じて含有する。それらの物質は、使用する用量および濃度でレシipientに毒性を示さないものであり、以下がある：バッファー（例えばリン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、および他の有機酸またはその塩）；抗酸化剤（例えばアスコルビン酸）；低分子量（約 10 残基未満）の（ポリ）ペプチド（例えばポリアルギニンまたはトリペプチド）；タンパク質（例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えばポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えばグリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン）；単糖類、二糖類、および他の糖質（例えばセルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリン）；キレート剤（例えば EDTA）；糖アルコール（例えばマンニトールまたはソルビトール）；対イオン（例えばナトリウム）；および/または非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート、ポロキサマー、または PEG）。慣例的な賦形剤には、結合剤、充填剤、潤滑剤、および湿潤剤が

ある。また、保存剤および他の添加剤を含有してもよく、それらには、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどがある。更に、医薬組成物は、企図される医薬組成物の使用法によって、更なる物質を含有してもよい。特に好ましくは、該医薬組成物は、当該分野で公知の、（ワクチンに使用する場合はT細胞活性の活性化によって、または、T細胞の中和／除去に使用する場合はT細胞活性の中和によって）T細胞活性に作用する物質を更に含有する。本発明の医薬組成物は上記のT細胞抗原に基づくものであるため、上記の更なる物質は、単に補助的に、例えば単剤として使用される場合に推奨される用量より低い用量で使用するか、または必要とされるT細胞の量を低減させるために使用され、それによって、更なる物質またはT細胞抗原にいずれかによってもたらされる副作用を低減するのが好ましい。

10

【0111】

本明細書で使用する「非経口」という用語は、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下、および関節内の注射および輸液を含む投与方式を指す。

【0112】

それらのキャリアおよび／または賦形剤を含む組成物は、公知の慣例的な方法によって調製できる。一般に、製剤は、医薬組成物の成分を液体キャリア／賦形剤もしくは微粉化した固体キャリア／賦形剤、またはその両方と、均質かつ十分に接触させることによって調製する。その後、必要により、生成物を所望の製剤に成形する。

【0113】

それらの医薬組成物は、好適な用量で被験体に投与できる。投与計画は、担当医および臨床学的因子によって決定される。医学分野で公知のように、各患者への投与量は多くの因子、例えば患者のサイズ、体表面積、年齢、投与すべき特定の化合物、性別、投与の時間および経路、全身の健康状態、および、同時に投与する他の薬剤などに依存する。所定の状況での治療の有効量は、慣例的な試験によって容易に決定され、通常の臨床従事者または医師の技術および判断の範囲内である。一般に、医薬組成物の定期的投与としての治療計画は、 $1\text{ }\mu\text{g}$ から 20 g ユニット／日の範囲である。しかしながら、より好ましい投与量は、 0.01mg - 100mg / 日、より好ましくは 0.01mg - 50mg / 日、そして最も好ましくは 0.01mg - 10mg / 日の範囲である。本発明の医薬組成物の投与は種々の方法によって行うことができ、それらには例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、皮内、鼻腔内、または気管支内投与がある。

20

30

【0114】

治療のための投与に使用する医薬組成物の成分は無菌でなければならない。滅菌は、滅菌ろ過メンブレン（例えば $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のメンブレン）を通してろ過することによって、容易に行うことができる。

【0115】

医薬組成物の成分は、通常、単回または多回投与容器（例えば密封アンプルまたは密封バイアル）中に、水溶液として、または再溶解して使用するための凍結乾燥製剤として保存する。凍結乾燥製剤の例として、 10 mL バイアルに 5 mL の滅菌ろ過済み 1% （w/v）水溶液を充填し、得られた混合液を凍結乾燥する。凍結乾燥された化合物（単数または複数）を、注射用静菌水を用いて再溶解し、注射液を調製する。

40

【0116】

より好ましい態様では、本発明の医薬組成物を使用して、ガン、感染、および自己免疫疾患から成る群から選択される疾病を治療する。

【0117】

本発明にかかる「ガン」とは、細胞の無制御な分裂、および、浸潤を介する隣接組織への直接増殖、または、転移による遠位への移植（ガン細胞が血流またはリンパ系を通して輸送される）による拡散能を特徴とする、一群の疾病または疾患をいう。ガンの非制限的な例として、リンパ腫、黒色腫、肺ガン、および他の腫瘍浸潤リンパ球を伴う腫瘍がある。

【0118】

50

本明細書で使用する「感染」という用語は、外来種によるホスト生物への有害な定着をいう。感染において、感染生物はホストの供給源を利用し、通常はホストを犠牲にして、増殖しようとする。感染に対するホストの応答が炎症である。

【0119】

本発明によれば、細菌感染には、それらに限定される訳ではないが、以下がある：細菌性髄膜炎、コレラ、ジフテリア、リステリア症、百日咳、肺炎球菌性肺炎、サルモネラ症、破傷風、発疹チフス、結核、化膿連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、または、種々の微生物病原体による尿路感染。

【0120】

本発明によれば、ウイルス感染には、それらに限定される訳ではないが、以下がある：単核症、ヒト免疫不全ウイルス感染症（HIV）、水痘、風邪、サイトメガロウイルス感染症、デング熱、エボラ出血熱、手足口病、肝炎、インフルエンザ、流行性耳下腺炎、ポリオウイルス感染症、狂犬病、天然痘、ウイルス性脳炎、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性肺炎、または黄熱病。

【0121】

本発明によれば、真菌感染には、それらに限定される訳ではないが、以下がある：アスペルギルス症、プラストミセス症、カンジダ症、コクシジオイデス症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、または足白癬。

【0122】

本発明によれば、「自己免疫疾患」という用語は、通常身体内に存在する物質および組織に対する、身体の過剰なT細胞介在性免疫応答によって起こる疾病を指す。自己免疫疾患は当業者に公知であり、それらに限定される訳ではないが、以下がある：リウマチ性関節炎、多発性硬化症、炎症性大腸炎、1型糖尿病、乾癬、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性（ハシモト）甲状腺炎、およびベーチェット症候群。

【0123】

別の好ましい態様では、本発明の組成物は診断用組成物である。

【0124】

本発明によれば、「診断用組成物」という用語は、各患者の本発明の医薬組成物への応答可能性、または本発明の医薬組成物による治療可能性を診断するための組成物をいう。本発明の診断用組成物は、上記のT細胞抗原を含有する。診断用組成物は、上記のように好適なキャリアおよび/または賦形剤を更に含有してもよい。診断用組成物は、1つまたは複数の容器に入れられてもよい。

【0125】

上記のように、T細胞抗原は、感染および腫瘍の検出、および自己免疫疾患の診断向上のためのバイオマーカーとして、診断用組成物に有用である。更に、それらの疾病の進行をモニタリングするための予後診断としても有用である。

【0126】

このように、更なる好ましい態様では、本発明の診断組成物は、ガン、感染、および自己免疫疾患から成る群から選択される疾病の診断に使用するためのものである。

【0127】

更に本発明はペプチドライブラリーに関し、該ペプチドライブラリーはペプチドをコードする核酸配列を含有する複数のベクターを含み、該ペプチドはT細胞の標的抗原の可能性のあるものであり、該核酸配列はランダム核酸配列である。

【0128】

本発明の方法に関する上記の定義および好ましい態様は、このペプチドライブラリーにも準用される。

【0129】

「複数のベクター」という用語は、1より多い任意数のベクターをいう。従って、複数のベクターは、例えば少なくとも2個のベクター、例えば5個のベクター、少なくとも10個のベクター、少なくとも15個のベクター、少なくとも20個のベクター、少なくと

10

20

30

40

50

も30個のベクター、少なくとも40個のベクター、少なくとも50個のベクター、少なくとも100個のベクター、少なくとも200個のベクター、少なくとも300個のベクター、少なくとも500個のベクター、少なくとも1,000個のベクター、少なくとも5,000個のベクター、少なくとも10⁴個のベクター、少なくとも10⁵個のベクター、少なくとも10⁶個のベクター、少なくとも10⁷個のベクター、少なくとも10⁸個のベクター、少なくとも10⁹個のベクター、少なくとも10¹⁰個のベクター、または少なくとも10¹¹個のベクターであってもよい。

【0130】

本発明はまた、抗原提示細胞の作製法にも関し、この方法は、細胞を本発明のペプチドライブラリーでトランスフェクトまたは形質転換することを含む。

10

【0131】

この場合も、本発明の方法およびペプチドライブラリーに関する上記の定義および好ましい態様は全て、この抗原提示細胞調製法にも準用される。

【0132】

細胞をトランスフェクトまたは形質転換する方法は当該分野で公知であり、限定される訳ではないが以下がある：エレクトロポレーション（例えばMultiporator（Eppendorf社）、Genepulser（BioRad社）を使用）、ウイルス転移（例えばアデノウイルス、レトロウイルス、またはレンチウイルスベクターを使用）、カルシウムによるトランスフェクション（例えばリン酸カルシウム沈殿）、陽イオン性脂質、PEI（Polysciences社、米国ウォリントン、ドイツ エッペルハイム）、リボソーム（例えば「Fugene」（Roche社）または「Lipofectamine」（Invitrogen社））、またはファージベクター。それらの方法は当業界で報告されており、また、以下の実施例にも記載する。

20

【0133】

従って、この抗原提示細胞の作製法により、それらの抗原提示細胞のライブラリーが得られる。そのようなライブラリーを、例えば本発明の方法に使用してもよい。

【0134】

本発明は更に、本発明の方法によって得られる抗原提示細胞に関する。

【0135】

更に、本発明は、SEQ ID NO:1-9、および/またはSEQ ID NO:39-47、および/またはSEQ ID NO:11および14から成る群から選択されるプライマーまたはプライマー・セットにも関する。

30

【0136】

本発明によれば、個別の細胞または細胞クローンからT細胞受容体鎖をコードする核酸分子を増幅および同定するのに好適な多くのプライマーが同定されている。上に詳述したように、これらのプライマーは、PCR反応の際に、互いの、または鎖のプライマーとの相互作用の可能性が最小限になるように最適化されている。

【0137】

上記の「セット」という用語は、プライマーの組み合わせをいう。本発明のプライマー・セットは、1個より多い分子種のプライマーが存在することを必要とする。従って、少なくとも2個の異なるプライマー、例えば少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の、SEQ ID NO:1-9および/またはSEQ ID NO:39-47および/またはSEQ ID NO:11および14のプライマーから選択される種々のプライマーが、プライマー・セットに含有される。

40

【0138】

本発明は更に、本発明のペプチドライブラリーおよび/または本発明のプライマーもしくはプライマー・セットおよび/または本発明の抗原提示細胞（単数または複数）を含む

50

キットにも関する。

【0139】

キットの種々の内容物は、1つまたはそれ以上の容器（例えば1つまたはそれ以上のバイアル）に充填することができる。容器またはバイアルは、内容物の他に、保存のための保存剤またはバッファーを含んでもよい。

【0140】

好ましくは、本発明のキットは本発明のペプチドライブラリーおよび本発明のプライマーもしくはプライマー・セットを含有する。

【0141】

特に記載しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する分野の通常の技術者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。相反する場合は、定義を含め、本明細書が優先する。

10

【実施例】

【0142】

実施例1：試料および方法

1.1 プラスミドおよびトランスフェクション

表6に、プラスミド構築に使用したプライマー配列を示す。全ての構築物は、挿入断片全長のシーケンシングを行って確認した。

【0143】

【表 6 - 1】

表 6 リンカーおよびPCRプライマー

	名称	配列	SEQ ID NO:
プラスミド回収			
Outer PCR	pcDNA-for-1	5'-CAC TGC TTA CTG GCT TAT CG	84
	pcDNA-rev-1	5'-ACT AGA AGG CAC AGT CGA GG	85
inner PCR dTOPO	pcDNA-for-2-TOPO (Mimo 1)	5'-CACCCGA CTC ACT ATA GGG AGA CC	86
	pcDNA-2nd-for-TOPO (Mimo 2, 3)	5'-CACCTCCGGCGCGCCACCATG	87
	pcDNA-rev-2 (Mimo 1)	5'-CTG ATC AGC GGG TTT AAA CTC	88
	pcDNA-rev-3 (Mimo 2, 3)	5'-TGG TGA TGG TGA TGA TGA CC	89
inner PCR RE digest	pcDNA-2nd-for	5'-TCC GGC GCG CCA CCA TG	90
	pcDNA-2nd-rev-10	5'-CTA GAC TCG AGC GGC CGC	91
JM22	JM22-Valpha-for	5'-TGT GTC GAC ATG GTC CTG AAA TTC TCC GTG	92
	JM22-VJalpha-rev	5'-TTG GGA TCC CGC TCC TGC ACA GAG GTA GTG GC	93
	JM22-Jalpha-for	5'-GAG GGA TCC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA	94
	Calpha PvuII-rev	5'-AGC ACT GTT GCT CTT GAA GTC	95
	JM22-Vbeta-Kpn-for	5'-CAT GTA CTG GTA CCG ACA GG	96
	JM22-VJbeta-Sca-rev	5'-CCG AAG TAC TGC TCG TAG GAG CTC CTC GAA CTA CTG GCA CA GAGA TAG AAA G	97
CD8	hCD8a-Not-for	5'-ATA AGA ATG CGG CCG CAT GGC CTT ACC AGT GAC CGC	98
	hCD8a-EcoRI-rev	5'-GGA ATT CTT AGA CGT ATC ACG CCG AAA G	99
	hCD8b-Mlu-Mut	5'-TCG ACG CGT ATG CGA CCG CGG CTG TGG	100
	hCD8b-Xho-rev	5'-CCG CTC GAG TTA TTT GTA AAA TTG TTT CAT GAA AC	101

【 0 1 4 4 】

【表 6 - 2】

NFAT-sGFP	sGFP-Eco-for	5'-TC GAA TTC GCC ACC ATG GTG AGC	102
	sGFP-Xho-rev	5'-GA CTC GAG AGC TTA GTG ATG GTG ATG	103
HLA-A*0201	HLA-A0101-lead	5'-CTC GTC GAC ATG GCC GTC ATG GCG CCC	104
	HLA-A0101-end	5'-TAC GGA TCC TCA CAC TTT ACA AGC TGT GAG	105
pcDNArc	pcDNArc-MCS-for	5'-GAT CCG GCG CGC CCC TGC AGG GC	106
	pcDNArc-MCS-rev	5'-GGCCGCCCTGCAGGGGCGGCCCG	107
flu(58-66)	N27-flu-Asc-for	5'- <u>CGCGCC</u> ACC ATG GGC ATT CTT GGG TTT GTG TTC ACT CTG TGA <u>GC</u>	108
	N27-flu-Not-rev	5'- <u>GGCCGC</u> TCA CAG AGT GAA CAC AAA CCC AAG AAT GCC CAT GGT <u>GG</u>	109
ランダムペプ チドライブラ リー	N27-all-lib-Asc-for	5'-CAGG GAA <u>GGCGCGCC</u> ACC ATG NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK TGA <u>GCGG CCGC</u> TAA ACT AT	110
	N27-A2-269-lib-Asc- for	5'-CAGG GAA <u>GGCGCGCC</u> ACC ATG NNK ATC NNK NNK NNK GTG NNK NNK CTA TGA <u>GCGG CCGC</u> TAA ACT AT	111
	N27-Not-rev	5'-TAG TTT AGC GGC CGC TCA	112

第1のカラムに、プラスミドまたはリンカーの使用目的を示す。第2のカラムに、プライマーまたはリンカーの名称を示す。第3のカラムに、配列を示す。ペプチド f l u (5 8 - 6 6) またはランダムペプチドライブラリーをコードする領域を太字で示す。制限部位またはリンカー・オーバーハングを囲み文字で示す。N および K は以下を示す：N=A または T または G または C。K=G または T。対応する SEQ ID 番号を第4のカラムに示す。

【 0 1 4 5 】

1 . 1 . 1 発現プラスミドpRSVhygro-JM22 およびpRSVneo-JM22 の構築および T C R トランスフェクト・ハイブリドーマ細胞 (58-JM22細胞) の作製

TRIzol-RS試薬 (Gibco/Invitrogen社) を用いて、ボランティアの末梢血から R N A を調製し、Superscript III逆転写酵素 (Gibco/Invitrogen社) およびオリゴ (d T) プライマーを用いて D N A を調製した。TCR JM22 (Lehnerら, 1995) の 鎖および 鎖の V 領域を P C R で増幅した。変異誘発によって N (D) N 領域を挿入した。クローニングカセットとして C 領域を含有する pRSVneo および pRSVhygro プラスミドを使用した (Seitz, 2006) 。具体的には、以下の2つの 鎖 P C R フラグメントを作製した：第1のフラグメントは V 1 0 のリーダー領域から J 領域までであり (プライマー：JM22-Valpha-for および JM22-VJalpha-rev) 、第2のフラグメントは J 領域から C 領域中の PvuII 部位までである (プライマー：JM22-Jalpha-for および Calpha-PvuII-rev) 。JM22-VJalpha-rev および JM22-Jalpha-for 中の G l y および S e r をコードするヌクレオチドをサイレント変異で置換し、B a m H I 部位を導入した。P C R 産物を B a m H I で消化し、ライゲーションを行い、JM22-Valpha-for および Calpha PvuII-rev を用いる第2の P C R のテンプレートとして使用した。S a l I および P v u I I 消化した産物を、クローニングカセットとして T C R の C 領域を既に含有させてある pRSVhygro に挿入した。

【 0 1 4 6 】

JM22 鎖のクローニングでは、V 17-J 2.7陽性クローンをテンプレートとして使用した。これは、既に pRSVneo にクローニングしてあったものである。プライマー JM22-Vbet

a-Kpn-forおよびJM22-VJbeta-Sca-revを用いて、V 17のKpnI部位およびJ 2.7中のScaI部位間の領域を増幅させ、PCR産物を上記のプラスミドに導入した。

【0147】

両プラスミドをT細胞ハイブリドーマ株58 (Blankら, 1993) にトランスフェクトし、G418およびハイグロマイシンB (Sigma社) による選択を行い、Seitzら (2006) が他のTCR鎖に関して報告しているように、個々のクローンを単離した。得られたTCRトランスフェクト細胞株を58-JM22と称する。

【0148】

1.1.2 pLPC-hCD8 -IRES2-hCD8 プラスミドの構築および58-JM22-CD8細胞の作製
プライマー: hCD8a-Not-for、hCD8a-EcoRI-rev、hCD8b-MluI for、およびhCD8b-Xho-revを用いて、ヒトCD8分子の鎖および鎖をcDNAから増幅した。鎖をpQCXIX (Clontech社) のNotI/EcoRI部位に挿入し、鎖をMluI/XhoI部位に挿入した。pQCXIX (Clontech社) 中のpIRES配列を、pIRES2-DsRed2 (BD Biosciences社) から切り出したpIRES2で置換した。hCD8 -IRES2-hCD8 を含有するフラグメントをNotIおよびEcoRVで切り出し、pLPCX (Clontech社) のNotI/平滑ClaI部位に挿入した。得られたプラスミドpLPC-hCD8 -IRES2-hCD8 をGP+E86パッケージング細胞 (ATCC) にトランスフェクトした。ヒスチジノール選択下においてCD3 鎖でトランスフェクトした58-JM22ハイブリドーマ細胞を (Blankら, 1993)、レトロウイルス発現GP+E86-CD8 細胞と、2日間、共培養した。形質導入した細胞を、1.0 µg/mlのピューロマイシン (Sigma社) で選択した。CD8 発現を、FACSにより、抗CD8 抗体および抗CD8 抗体、すなわちB9.1.1および2ST8-5H7 (Beckman Coulter社) を用いて解析した。得られた、TCRおよびCD8でトランスフェクトされた細胞株を58-JM22-CD8と称する。

【0149】

1.1.3 プラスミドpcDNA6-NFAT-sGFPの構築および58-JM22-CD8-sGFP細胞の作製
NFAT応答要素hrGFP-SV40splice/pA配列を、pNFAT-hrGFP (Stratagene社) から単離した。まず、AccI消化によって平滑末端を生成し、その後、AatIIで消化した。フラグメントを、PmeIおよびAatIIで消化したpcDNATM6/V5-His Cにライゲートし、プラスミドpcDNA-NFAT-hrGFPを得た。プライマーsGFP-Eco-forおよびsGFP-Xho-revを用いてsGFP(S65T) (Heimら, 1995) を増幅し、pcDNA-NFAT-hrGFPのEcoRI/XhoI部位にライゲートして、プラスミドpcDNA-NFAT-sGFPを得た。58-JM22-CD8細胞をトランスフェクトし、3 µg/mlのプラスチサイジン (Invitrogen社) で選択し、個々のクローンを選別採取し、抗CD3抗体 (145-2C11 (BD社)) およびHLA-A2-flu(58-66)で刺激した後、GFP発現を分析した。得られた、TCR、CD8、およびNFAT-sGFPでトランスフェクトした細胞株を58-JM22-CD8-sGFPと称する。

【0150】

1.1.4 プラスミドpRSV-A2およびpHSE3'-A2の構築
HLA-A2重鎖のcDNAを、PCRにより、プライマー5'EX1-A-6および3'A-ex8-1 (M.P. Bettinottiら (2003) J.Immunol.Meth. 279:143-148)、および患者PM16488由来のcDNA (Seitz 2006) を用いて増幅した。SalIおよびBamHI制限部位を伸長するためのプライマー (HLA-A0101-leadおよびHLA-A0101-end) を用いて再増幅した後、PCR産物をpRSVneoおよびpHSE3'のSalI/BamHI部位に挿入した (Pircherら, 1989)。これらのプラスミドを用いて、後述のようにCOS-7細胞をトランスフェクトした。

【0151】

1.1.5 プラスミドpcDNA6-flu(1-252)の構築
基質タンパク質の完全長配列flu(1-252)を、開始コドン直前のコザック配列CCACC、停止シグナル、およびNheIおよびXbaIオーバーハングを有するように合成した (GeneArt)。フラグメントをpcDNATM6/V5-His A (Invitrogen社) のNheI/XbaI部位に挿入した。

【0152】

1.1.6 プラスミドpcDNA6-flu(58-66)の構築

粘着オーバーハング、開始コドン直前のコザック配列 C C A C C、および停止シグナルを含有する 2 本鎖合成リンカーによって、f l u (5 8 - 6 6) をコードするヌクレオチド配列をpcDNATM3.1zeo(+)(Invitrogen社)のH i n d I I I / X h o I 部位に挿入した。フォワード鎖flu(58-66)-COS-forおよびリバース鎖flu(58-66)-COS-revを、95 で5分間インキュベートしてハイブリダイズさせ、徐々に冷却して、pcDNATM3.1zeo(+)のH i n d I I I / X h o I 部位にライゲートさせた。このプラスミドから、N h e I - X b a I フラグメントをpcDNATM6/V5-His AのN h e I / X b a I 部位にライゲートさせた。

【0153】

1.1.7 プラスミドpcDNA6rc-spacerの構築

プラスミドpcDNArc-spacerを、複雑なライブラリーのためのレシピエント・プラスミドとして設計した。まず、レア切断酵素、A s c I およびN o t I の制限部位をpcDNATM 6/V5-His A (I n v i t r o g e n 社) のマルチクローニング部位に導入した。これを行うために、pcDNATM/V5-His AをB a m H I およびN o t I で消化し、リンカーオリゴヌクレオチドpcDNArc-MCS-forおよびpcDNArc-MCS-revをpcDNATM6/V5-His AのB a m H I およびN o t I 部位にライゲートしてプラスミドpcDNArcを得た(「rc」は「レアカッター(rare cutter)」を意味する)。

【0154】

2つの制限部位、A s c I およびN o t I は非常に接近しているため、その後のA s c I / N o t I 消化を容易にするために、無関係なD N A フラグメントを挿入した。そのため、A s c I およびN o t I での消化によって、プラスミドpLNCX2(Clontech社)から2514bpのフラグメントを切り出し、A s c I / N o t I 消化したプラスミドpcDNArcにこれを挿入した。その後、得られたプラスミド「pcDNArc-spacer」を、ライブラリーおよびf l u (5 8 - 6 6) のレシピエント・プラスミドとして使用した。

【0155】

1.1.8 プラスミドpcDNA6rc-flu(58-66)の構築

f l u (5 8 - 6 6) をコードするヌクレオチド配列を、pcDNA6rcのA s c I / N o t I 部位に挿入した。A s c I およびN o t I の粘着オーバーハング、開始コドン直前のコザック配列 C C A C C、および停止シグナルを有する 2 本鎖合成リンカーを生成した。フォワード鎖N27-flu-Asc-forおよびリバース鎖N27-flu-Not-revを95 で5分間インキュベートしてハイブリダイズさせ、徐々に冷却し、消化したpcDNA6rc-spacerにライゲートさせた。pcDNA6rc-flu(58-66)は、全ての試験において、pcDNA6-flu(58-66)と全く同じ挙動を示した。

【0156】

1.1.9 プラスミドpcDNArc -N27-allおよびpcDNArc -N27-A2-269の構築

ランダムペプチドライブラリーを作製するために、以下の1本鎖オリゴヌクレオチドを使用した:N27-all-lib-Asc-for(完全にランダムな9アミノ酸のライブラリー用);およびN27-A2-269-lib-Asc-for(f l u (5 8 - 6 6) の3つの固定アンカー位置、すなわち2位のイソロイシン、6位のバリン、および9位のロイシンを有する9アミノ酸ライブラリー用)。オリゴヌクレオチドは全て、制限部位A s c I およびN o t I、開始コドン直前のコザック配列 C C A C C、および停止配列を含有する。

【0157】

短鎖プラスミドN27-Not-revのアニールリングおよびその後のフィルイン反応によって、これらのプラスミドから2本鎖を作製した。ライブラリーをコードしているプラスミドおよびN27-Not-revをアニールさせるため、それぞれを5 μ Mの濃度で含有する溶液(10mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl (pH=8.2)中)を100 で5分間インキュベートし、1時間以内に室温まで徐々に冷却した。その後、等量の上記バッファー(d N T P およびT a q - ポリメラーゼ(共にR o c h e 社)を、それぞれ最終濃度200 μ Mおよび5 U / 100 μ lとなるように調整して含有させたもの)を添加し、混合液を徐々に加熱

10

20

30

40

50

し、60 で5分間、次いで63 で4分間、その後65 で4分間、最後に68 で1時間加熱した。その後、2本鎖をA s c IおよびN o t Iで消化し、pcDNArc-spacerのA s c I / N o t I 部位に挿入した。

【0158】

1.1.10 プラスミドpcDNA-sGFPの構築

トランスフェクション法の効率を測定するために、NFAT応答要素を含有しないsGFPのクローニングを行った。pcDNA-NFAT-sGFPをE c o R IおよびX h o Iで消化し、sGFP配列を単離し、pcDNATM6/V5-HisA (Invitrogen社)にライゲートした。

【0159】

1.1.11 合成ペプチド

インフルエンザ基質タンパク質アミノ酸58-66 (flu(58-66)): GILGFVFTL) およびヒト・サイトメガロウイルス・フラグメントpp65アミノ酸184-192 (hCMV-pp65(184-192): NLVPMVATV) に相当するペプチドを、Fmoc化学によって合成し、C8逆相HPLCで精製した。それらの配列が正確であることを、質量分析で確認した。

【0160】

1.2 抗原検出アッセイ

1.2.1 細胞のトランスフェクション

58-66ペプチドを、JM-22細胞鎖および細胞鎖、そして、CD8(-IRES2-)細胞鎖で、トランスフェクトおよび選択した。これは他のTCR鎖に関する報告に従って行った(Seitzら, 2006)。その後、これらの細胞をプラスミドpcDNA-NFAT-sGFPでトランスフェクトし、3 μg/mlのプラスチサイジンで安定的トランスフェクタントを選択した。

【0161】

2つの異なる方法、すなわち「Fugene」によるトランスフェクションおよびエレクトロポレーションを用いて、ライブラリーを含有するプラスミドでCOS-7細胞を一過性にトランスフェクトした。「Fugene」法は非常に効率的であり、平均200個のプラスミドが1つのCOS-7細胞に送達される。この方法は、プラスミド・プールのトランスフェクト、または、個別の細菌クローン由来の単一プラスミドの(すなわち抗原探索後期の)トランスフェクトに適している。他方、エレクトロポレーションは、1つのCOS-7細胞に約3-5個のプラスミドを送達する。従って、エレクトロポレーションを用いる場合、1つの細胞におけるライブラリー・プラスミドの多様性は低い。このため、この方法は、高度に複雑なライブラリーを使用する、抗原探索の初期に適している。留意すべきことに、各COS-7細胞はトランスフェクトされたプラスミドを、2-3日以内に合計約5,000コピーまで増幅する。結果として、エレクトロポレーション後、それぞれのプラスミド種はかなりの程度まで増幅され、例えば、エレクトロポレーションによって4つの異なるプラスミドがトランスフェクトされると、4つの異なるプラスミド種が1,250コピーずつ得られる。これに対してFugene法では、例えば200個の異なるプラスミドをトランスフェクトした場合、200個の異なるプラスミド種が、わずか25コピーずつ生成する。

【0162】

エレクトロポレーション法のプロトコル: エレクトロポレーションによってCOS-7細胞の一過性トランスフェクションを行うため、4 × 10⁶細胞をRPMIで2回洗浄し、0.8 mlのハイポオスモラーバッファー(Eppendorf社)に再懸濁した。次いで、16 μgのDNA(10 mM Tris-HCl(pH 8.5)中)を添加した。共トランスフェクションには、プラスミドpRSV-A2およびpcDNA-flu(58-66)またはpcDNA-flu(1-152)またはpcDNA-A2-269またはpcDNArcを等モル量で使用した。室温において、0.4 cmのエレクトロポレーション・キュベット(Eppendorf社)中、「マルチポレーター」トランスフェクション装置(Eppendorf社)を使用して、1200 V、40 msで電気パルスを適用した。電気パルスの直後に、加温済みの完全培地に細胞を再懸濁し

10

20

30

40

50

た。いくつかの実験では、細胞を20 mM Na-リン酸バッファー (pH 7.4)、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂で2回洗浄した。その後、それらを培養プレートに播種し(0.5 - 1 × 10⁶細胞 / 3.5 cm培養プレート)、通常の細胞培養条件下でインキュベートした。

【0163】

Fugene法のプロトコル：Fugene HDトランスフェクション試薬(Roche社)によるCOS-7細胞の一過性トランスフェクションを、2 µg DNA : 7 µl Fugeneの比率で行った。プラスミドpRSV-A2およびpcDNA-flu(58-66)またはpcDNA-A2-269を等モル量で使用した。残留するトランスフェクション複合体を除去するために、トランスフェクションの24時間後、COS-7細胞をPBSで4回洗浄し、50 µg / mlのニシン精子DNAと共に1時間インキュベートしてトランスフェクション複合体中のプラスミドを置換した後、0.2 mg / mlのDNaseおよび10 mMのMgCl₂と共に2時間インキュベートして残存DNAを消化した。

【0164】

COS-7細胞の一過性トランスフェクション効率の測定を、for-sGFPまたはpRSV-A2をコードするpcDNA6を用いるFACS解析によって行った。陽性細胞を内因性sGFP蛍光、または抗HLA-A2抗体BB7.2(Proimmune社)での染色によって分析した。最大の発現はトランスフェクション後48時間から72時間の間で観察された。

【0165】

1.2.2 T細胞によって認識される抗原を提示する細胞の検出

TCRをトランスフェクトしたハイブリドーマ細胞によって認識されるペプチドをコードするライブラリープラスミドを含有するCOS-7細胞を検出するために、ライブラリーをトランスフェクトしたCOS-7細胞を組織培養プレートに約40,000細胞 / cm²の密度で播種した。37 °Cで2-3日間インキュベートした後、ほぼ集密となった細胞層をRPMI培地で2回洗浄して58-JM22-CD8-sGFP T細胞ハイブリドーマを積層し、更に12-18時間インキュベートした。その後、培養プレートを倒立蛍光顕微鏡(Axio Vert200M、Zeiss社。CCD-カメラ(CoolSNAP-HQ、Roper Scientific社)、蛍光ランプ(HXP 120、Visitron社)、および対物レンズ：5x, NA 0.15; 10x, NA 0.45 Plan Apochromat; 20x, NA 0.4; 40x, NA 1.5 Achroplan, Korr Ph2を搭載)下で観察した。Cy3フィルター(励起/発光：545(25)/605(70) nm、Zeiss社)を用いて自発蛍光を確認し、GFPフィルター(励起/発光：472(30)/520(35) nm、Semrock社 BrightLine)を用いてsGFP発現を検出した。手動で検査する代わりに、電動式xy-ステージ(BioPresision2、Visitron社、ドイツ ブッフハイム)による自動スキャンシステム、および自動画像取得および解析(MetaMorph-Software, V7.7)を用いる。その後、活性化緑色58-JM22-CD8-sGFPハイブリドーマ細胞と接触したCOS-7細胞を、毛細管(Eppendorf社、customTips Type 1。内径15 µm)およびマイクロマニピュレーター(Mini 25、Luigs & Neumann社)を用いて選別採取した。採取した細胞を7 µlの25%アンモニア溶液に添加し、プラスミドを保持しDNaseを阻害するために、氷上で最大4時間まで保存した。PCR反応の前に、チューブを開けて室温で30分間放置し、アンモニアを揮発させた。

【0166】

1.2.3 抗原をコードするプラスミドの増幅

pcDNA挿入断片をPCR増幅するために、2ラウンドのネステッドPCRを行った。第1のPCR反応は、50 - 100 µlで、1 UのTaqポリメラーゼ(Roche社)(0.2 mM dNTP、0.5 µMプライマー)を用いて行った。いくつかの実験では、インナープライマーまたはアウタープライマーを用いる単回PCRで十分であった。次いで、第1の反応産物の0.01 µl相当をテンプレートとし、iProofポリメラーゼ(Biorad社)およびインナープライマーを用いてネステッドPCR反応を行った。MinElute PCR精製キット(QuiaGen社)を用いてPCR産物を精製し、プラスミドpcDNA3.1D/V5-His-TOPO(登録商標)(Invitrogen社)にクローニン

グした。ライゲーション産物を、エレクトロポレーションによってDH10B ElectroMax (Invitrogen社) にトランスフェクトした。

【0167】

1.2.4 更なるスクリーニングおよびミモトープの同定

濃縮したミモトープを、更なるラウンドの抗原スクリーニングに供した。ここでは、個別の細菌クローンのプールを使用した(図6)。トランスフェクトした細菌の小画分を寒天培地上で培養し、含まれる細菌数を確認した。画分の大部分をバルク培養した。これから、>30のプール(それぞれ約500個の個別細菌クローンを含む)を懸濁培養液中で培養し、プラスミドを調製した後、フレッシュのCOS-7細胞にトランスフェクトした。これらを再び58-JM22-CD8-sGFP細胞の活性について試験した。陽性プールから、>30のサブプール(それぞれ100個の細菌クローンを含む)を作製し、上記のように試験した。その後、>30のサブプール(20個の個別細菌クローンを含む)でこの操作を反復し、更に、寒天培地上で培養した。これらから、個々の細菌コロニーを選別採取し、試験した。この最終ラウンドの分析で陽性であったプラスミドについて、シーケンシングを行った。

10

【0168】

1.3 ワンステップRT-PCRによる単一細胞からのTCR鎖および鎖cDNAの増幅

プロトコル 段階1.1、1.2 (RT-PCR)

単一細胞のmRNAをRT反応によってcDNAに転写した。反応は50℃で35分間、ワンステップRT-PCRキット(QIAGEN社)および遺伝子特異的C_βプライマーおよびC_αプライマー(各0.6 μM)を使用して行った(C_βプライマー=C_βoutプライマー+C_αoutプライマー。表2)。

20

【0169】

プロトコル段階1.3 (第1の多重PCR)

V_β鎖およびV_α鎖の同時増幅のためのプライマー・プール(Vプライマー)を反応溶液に添加した。プールは24個のV_β特異的プライマーおよび9個のV_α特異的プライマー(Vp1-Vp9)(各0.075 μM)を含む(表1および3)、これらは機能性およびTCR可変領域遺伝子の全てを網羅している。95℃で15分間、ホットスタートポリメラーゼを活性化させた後、PCRサイクル: 94℃で30秒間/60℃で90秒間/68℃で60秒間を、10サイクル行った。次いで、PCRサイクル: 94℃で30秒間/53℃で90秒間/68℃で60秒間を30サイクル行い、その後、68℃で15分間の最終伸長段階を行った。

30

【0170】

プロトコル段階2.1 (ラン・オフPCR)

V_β鎖を増幅するために、前増幅産物の1 μL画分のラン・オフPCR(94℃で5分間/53℃で150秒間/68℃で15分間)を1サイクル行った。このPCRには、Vpプライマーをベースとし、5'末端にユニバーサルプライマーを含むプライマー(Vp+プライマー)を使用した。10 μLの反応溶液には、1×PCRバッファー、0.25 UのDNAポリメラーゼ(Roche社)、0.2 mMのdNTP、およびプライマー・プール(各プライマーが0.1 μM)が含まれる。

40

【0171】

プロトコル段階2.2 (第2のセミ・ネステッドPCR)

C_β特異的ネステッドプライマー(C_β-in)およびユニバーサルプライマー(UP)を用いて「セミ・ネステッド」PCRを行った。PCRは以下から成る: 94℃で2分間の変性段階、94℃(30秒間)/58℃(60秒間)/68℃(60秒間)を50サイクル、および、68℃で15分間の最終伸長段階。

【0172】

プロトコル段階3 (V_α増幅)

第2のV_β鎖のネステッド増幅を、既に報告されている方法をわずかに改変して行った(

50

Seitzら(2006))。簡潔に記載すると、 $1\ \mu\text{l}$ の前増幅プローブを、C₁ ネステッドプライマー(C₁ - i n)およびV₁ ネステッドプライマー・プール(各プライマーが $0.1\ \mu\text{M}$)を含有するPCR溶液に添加した。変性(94℃で2分間)後、タッチダウンPCRを、61℃、58℃、および56℃でのアニーリングを各4サイクル、次いで53℃でのアニーリングを40サイクルで行った。アニーリングおよび伸長(68℃)の時間はそれぞれ1分間、変性時間は30秒間とし、その後、68℃で15分間の最終伸長を行った。C₁ / C₂ ネステッドプライマー、および $0.5\ \mu\text{l}$ のネステッドPCR産物を用いて、TCR_β鎖および鎖を直接シーケンシングした。

【0173】

実施例2：リードアウト系の特性

TCR_β JM22の鎖および鎖、ヒトCD8_α鎖および鎖、およびsGFPがNFATによって制御されるレポーターコンストラクトで、T細胞ハイブリドーマ株58-JM22-CD8-sGFP細胞と称する(図1)。これらのトランスフェクタントにおいて、抗原刺激後に緑色蛍光が検出されるか否かを試験するために、COS-7細胞をAPCとして使用した。この細胞は、プラスミドpHSE3'中のHLA-A*0201(pHSE3'-A2)で安定的トランスフェクションを行い、合成ペプチドflu(58-66)を添加したものである。COS-7接着細胞は、ほぼ集密な単層を形成した。58-JM22-CD8-sGFP細胞を添加し、16時間後に蛍光顕微鏡(図2a)およびFACS(図3a)でsGFP蛍光を観察した。sGFPの明るい蛍光により、58-JM22-CD8-sGFP細胞の50%以上が活性化されたことが確認された。HLA-A2でトランスフェクトしていない空のCOS-7細胞を使用した場合(図2bおよび図3b)、またはflu(58-66)の代わりに無関係なペプチドhCMV(184-192)を使用した場合(図2hおよび図3h)、250,000細胞のうち、陽性58-JM22-CD8-sGFP細胞は1つも観察されなかった。これらの試験は、58-JM22-CD8-sGFP細胞がHLA-ペプチド複合体の特異的検出のための好適なリードアウト細胞となりうることを示している。

【0174】

HLAで安定的にトランスフェクトされたCOS細胞を、検討対象となるHLA対立遺伝子のそれぞれについて作製する必要を回避するために、COS細胞への全てのトランスフェクションを一過性とするようにプロトコルを改変した。第1段階で、flu(58-66)が合成ペプチドとして添加される必要があるか否か、または、これがHLA-A*0201を安定的に発現するCOS細胞にトランスフェクトするプラスミドにコードされていてもよいかを試験した。このため、エレクトロポレーションにより、pHSE3'-A2で安定的にトランスフェクトしたCOS-7細胞を、flu(58-66)の発現をコードするプラスミドpcDNA(fluc(58-66))で一過性スーパーtransフェクションした(図2cおよび図3c; プラスミド挿入断片の配列は表6参照)。pcDNAはSV40複製起点を保有し、これによってCOS-7細胞において、プラスミドの細胞内増幅が起こる(Gluzman, 1981)。蛍光58-JM22-CD8-sGFPの収量は31%であり、合成ペプチドを直接添加した試験と比較して、わずかに低かった(図2aおよび図3a)。注目すべきことに、この試験は、pcDNAにコードされるペプチドをCOS-7細胞の細胞質中で発現することができ、それらは小胞体内腔に効率的に輸送され、そこでMHCクラスI分子に負荷されることを直接的に示している。

【0175】

次に、pRSV-A2およびpcDNA-fluc(58-66)を1:1の比率でCOS細胞に一過性共トランスフェクトした。56時間後に58-JM22-CD8-sGFP細胞を添加し、更に16時間後にその蛍光を観察した(図2eおよび図3e)。活性化58-JM22-CD8-sGFPの収量は13%であり、安定的トランスフェクタントの場合よりわずかに低かった(図2aおよび2d)。これは、pcDNA中のpRSV-A2およびGFPを共トランスフェクトしたモデル系でのトランスフェクション効率(14%)と同程度であり、いずれもFACSによって容易に定量を行うことができた(図4)。58-JM22-CD8-sGFP細胞におけるsGFPの発現を、ライブラリーを

10

20

30

40

50

トランスフェクトしたC O S細胞との共培養を開始してから8時間後に観察したが、発現は16時間以上の間、安定であった。この間、58-JM22-CD8-sGFP細胞は、その抗原を提示するC O S - 7細胞と密着したままであった。陰性コントロール試験、すなわち、pRSV-A2および挿入断片を有さないpcDNA (pcDNA-empty) を共トランスフェクトした場合 (図2 f および図3 f)、または、pRSV-A2無しでpcDNA-flu(58-66)だけをトランスフェクトした場合 (図2 d および3 d) では、58-JM22-CD8-sGFP細胞の活性化は観察されなかった。pcDNA-flu(58-66)の代わりにpcDNA-flu(1-252)、すなわちインフルエンザ基質タンパク質配列の全長をコードするコンストラクトを使用した場合は、陽性細胞は全く同定されなかった (図2 g および図3 g)。このことは、C O S - 7細胞が完全長f l u (1 - 2 5 2) タンパク質を正確にプロセッシングできないことを示している。注目すべきことに、本発明の方法は短鎖ペプチドを用いて試験を行うため、抗原に必要とされる全ての細胞内プロテアーゼ開裂を回避できる。

【 0 1 7 6 】

実施例3：ランダムペプチドライブラリーのスクリーニングおよびf l u (5 8 - 6 6) ミモトープの同定

f l u (5 8 - 6 6) のミモトープを同定するために、ランダムライブラリーを作製した。これらのライブラリーは、5'末端にK o z a k配列および開始コドン、そして3'末端に停止コドンが隣接した一連のN - スクレオチドから成る (表6)。ライブラリーをプラスミドp c D N A r cに挿入し、pRSV-A2と共にC O S - 7細胞に共トランスフェクトした。H L A - A * 0 2 0 1によって提示される抗原は既に研究が行われているため、3つの固定アミノ酸を導入し、2位、6位、および9位にある3個のH L A - A 2結合アンカーとした (pcDNA-A2-269) (Rammenseeら, 1999)。f l u (5 8 - 6 6) のH L A - A 2 * 0 2 0 1アンカー位、すなわち2位のイソロイシン、6位のバリン、および9位のロイシン (これが主要アンカーである) を固定した。他の全ての位置をランダムとした。ライブラリーをpRSV-A2と共にC O S - 7細胞に共トランスフェクトし、少数の58-JM22-CD8-sGFP細胞の活性化を観察した (図5 b)。蛍光活性化58-JM22-CD8-sGFP細胞と下部にあるC O S - 7細胞が直接接触していることが確認できる (図5 a)。活性化58-JM22-CD8-sGFP細胞の頻度は、C O S - 7細胞100万個当たり、約3個の蛍光細胞であった。

【 0 1 7 7 】

活性化ペプチドミモトープをコードするp c D N A プラスミドを回収するために、蛍光顕微鏡下で毛細管を用い、活性化58-JM22-CD8-sGFP細胞を下部のC O S - 7細胞と共に選別採取した。C O S - 7細胞は接着細胞であるが、組織培養プレートの底面から回収することができる。58-JM22-CD8-sGFPと、HLA-A2およびpcDNA-A2-2,6,9で共トランスフェクトしたC O S - 7細胞との共培養条件下で、蛍光58-JM22-CD8-sGFP細胞および下部のC O S細胞の両方を共に選別採取できる。これを蛍光下、またはより好ましくは透過光下で観察することができる。

【 0 1 7 8 】

選別採取した細胞から、ミモトープをコードする配列をP C Rで増幅し、クローニングを行い、pRSV-A2と共にフレッシュのC O S - 7細胞に共トランスフェクトするか、または、予めHLA-A2での安定的トランスフェクションを行ったC O S - 7細胞にトランスフェクトした。その後、58-JM22-CD8-sGFP活性化について試験した。ほとんどの場合、単一のC O S - 7細胞を選別採取することができたが、最初は、多くの異なる挿入断片が回収された。おそらくこれは、トランスフェクション複合体中のプラスミドが培地中で細胞外部に残存し、細胞と共に吸引されるために、一般的に単一のC O S細胞が1つより多いライブラリープラスミドを含有するためであると考えられる。そのため、細菌クローンの個別のプールを、集団が均一になり、プラスミドの挿入断片のシーケンシングができるようになるまで分析した (図6)。4つのペプチドによって提示される4つの異なるミモトープが同定された (「 m i m o - 1 」 から 「 m i m o - 4 」 ; 図7)。m i m o - 2は独立して2回同定された。このようにして推定されたアミノ酸配列は、1位、3位、および5位のいくつかのアミノ酸がf l u (5 8 - 6 6) と異なっていることが明らかになった。1

10

20

30

40

50

位および3位のアミノ酸は、HLA-A*0201およびJM22のいずれとも強い相互作用を示さないことが知られている(Stewart-Jonesら, 2003)。5位のアミノ酸置換(mimo-2: フェニルアラニンからトリプトファンへの置換)は保存的である。しかしながら、興味深いことに、このアミノ酸はTCR相補性決定領域中のいくつかのループと相互作用する。ミモトープ配列を用い、標準的な条件でBlast検索を行い、親flu(58-66)配列を明確に同定することができた。

【0179】

実施例4: 単一T細胞における再構成 - T細胞受容体の解析

4.1 プライマーの設計およびPCR法

単一T細胞の再構成 - TCRペアの分子解析は、約70個のTCR V 領域遺伝子および約50個のTCR V 領域遺伝子の完全なスペクトラムを包含しなければならない。出願人は、近年、TCR V レポートリーの同時増幅に関して報告された24個のTCR V プライマー・セットと共に、TCR 鎖レポートリーの全ての異なるV 遺伝子ファミリーを同時に増幅できるPCR法の開発に取り組んだ(Seitz, Schneiderら, 2006)。この方法の複雑さは、特異的増幅に干渉しうる、多数のプライマー間の相互作用の可能性に起因する。出願人は、1つの反応で全てのTCR V 遺伝子およびV 遺伝子を前増幅することが可能な多重RT-PCRから開始する、PCRプロトコルを確立した。その後、TCR V - およびV - PCR産物を別々に処理する。

【0180】

4.2 再構成 TCRの前増幅

数量を増やさないために、配列アラインメントによって同定された種々のV 遺伝子ファミリーの配列相同性を利用してTCR V プライマーを設計した。主要なヌクレオチド配列との1個のミスマッチは許容した。プライマー位置は、それぞれのTCR V 遺伝子がおも直接シーケンシングによって同定できるように考慮されなければならない。オリゴ解析ソフトウェアプログラムによって、起こりうる相互作用が最小限となるよう、V レポートリーの全てのプライマー間で、また、24個のV プライマーとの間で調整を行った。

【0181】

30個の異なるV 遺伝子プライマーを、24個のV プライマーと種々に組み合わせて試験した。これによって、最終的に9個のV プライマーから成るセット(Vp1-9、表1)が得られ、これは全ての機能性V 遺伝子を網羅する。リーダーセグメント上に位置するVp1以外は、全てのプライマーがV 遺伝子セグメント上に位置する。C (1) プライマーと組み合わせ、これらのプライマーのそれぞれから、対応する再構成V 遺伝子が効率的に増幅されたことが、アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって明らかとなった(図8A)。

【0182】

V プライマー・セットおよびV プライマー・セットを合一した場合の、単一反応で完全長TCR V およびV 遺伝子レポートリーを増幅する能力を、多重RT-PCRにより、末梢血T細胞由来のmRNAを用いて試験した。前増幅の後、種々の再構成TCR V 遺伝子ファミリーを、23の異なるネステッドPCR反応で多重PCR産物から増幅した。PCRには、種々のTCR V 遺伝子ファミリーに特異的な23個の異なるプライマーおよびFAM標識したC (2) プライマーを使用し、本質的に報告されている通りに行った。PCR産物のフラグメント長を、遺伝子シーケンサーによるスペクトラタイピングによって解析した。各TCR V 遺伝子ファミリーの増幅により、期待されたサイズ範囲のPCR産物を得た。それらは、ポリクローナルなT細胞集団に典型的な再構成TCRで、ガウス様のフラグメント長分布を示すものであった(図8C)。

【0183】

これと同時に、別々の反応で24個の異なるV プライマーを使用して、多重PCR産物からTCR V レポートリーを増幅した。アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色から明らかのように、そのそれぞれから、増幅された再構成TCR V を示す

10

20

30

40

50

独自のPCR産物を得た(図8B)。このように、出願人がTCRレパートリーの増幅のために構築した多重RT-PCRの条件により、実際に単一反応で完全長TCRVレパートリーおよびVレパートリーの両方を増幅することが可能であった。

【0184】

4.3 単一細胞の解析

次の段階では、単一T細胞の前増幅産物からそれぞれの再構成TCRV鎖を増幅することが必要となる。23個という多数の異なるV遺伝子サブファミリーを使用して1つのサンプル中でV特異的ネステッドPCRを行うことはできないため、ユニバーサル・プライマー配列をTCRV鎖PCR産物の5'末端に導入した。これを行うために、ユニークな21ヌクレオチド長配列を、プライマー相互作用またはヒト遺伝子との相同性を有さないように設計し、9個の異なるVp(Vp1-9)プライマーの5'末端に付加した。1μlの前増幅産物を用い、これらの伸長型プライマーを使用してラン・オフPCRを行った(PCR容量は10μl)。次いで、第3のセミ・ネステッドPCRを行った。これは、ユニバーサル・プライマーをネステッドC(2)プライマーと共に使用し、TCRV遺伝子ファミリーから独立した、個別の単一細胞再構成TCRVを増幅する。PCR法を図9に示す。これと同時に、対応する再構成TCRVを、Seitzらの報告による5つのVプライマー・プールを用いる5つの異なるネステッドPCRで、多重PCR前増幅産物から増幅した。その後、増幅された再構成TCRV鎖および鎖を直接シーケンシングによって特性決定した。

【0185】

単一T細胞レベルでのこの方法の効率を試験するために、末梢血T細胞を、CD4モノクローナル抗体またはCD8モノクローナル抗体でコーティングした磁気ビーズで標識し、単一のT細胞を倒立顕微鏡下で2μlピペットを用いて吸引採取し、前増幅バイアルに移した。好適な細胞密度に調整すれば、この方法によって、種々の起源の細胞懸濁液から単一のロゼット形成T細胞を同定および単離することができる(図10)。

【0186】

この方法で、合計96個のCD4+末梢血T細胞および96個の末梢血T細胞を回収し、解析した。82個のCD4+T細胞(85.4%)および76個(79.2%)のCD8+T細胞で再構成TCRVが増幅され、PCR産物の直接DNAシーケンシングによって特性決定された。TCRV鎖増幅の効率は80%以上であった。解析した再構成のうち、V16(これは、一般的に、まれにしか再構成されない)以外の全ての機能性TCRV遺伝子ファミリーが提示された。他のTCRV遺伝子ファミリーの発生率はTCRV遺伝子の平均的な使用量を反映しており、それらのTCRVB遺伝子ファミリーは、一般に単一細胞の解析でもしばしば観察される優位性を示した。再構成鎖を保有するT細胞のそれぞれから、対応するTCRV鎖を得、直接シーケンシングによって確認することができた。手作業による単一細胞の吸引採取のあらゆる試みが成功していないことから、出願人は、出願人の方法によって実質的に全ての単一T細胞から再構成TCRVペアの分子の特性決定を行うことが可能であると結論づける。

【0187】

4.4 乾癬における単一T細胞の再構成TCRVの解析

現在の概念によれば、T細胞が介在する自己免疫疾患は、自己抗原特異的活性化および自己反応性T細胞のクローン性増殖に起因する。出願人は、開示する試験法によって、炎症組織病変からそれらの病原性クローンT細胞を同定し、推定される自己抗原に対する特異性をコードする再構成TCRVペアを特性決定することができるかどうかを試験した。出願人は、T細胞が介在する皮膚の自己免疫疾患である尋常性乾癬に着目した。従前の、病変生検由来TCRVcDNAのランダム増幅、クローニング、およびシーケンシングによる乾癬病変部T細胞浸潤のTCRV鎖レパートリーの解析によって、優占なオリゴクローナルなT細胞の増殖は示唆されていたが、個々のT細胞の推定されるクローン性およびサブタイプは未だ不明確である。

【0188】

病原性自己免疫T細胞クローンは、*ex vivo*で、病原性T細胞浸潤中で同一の再構成 - TCRを有する複数のT細胞として認識できるものでなければならない。この前提に基づき、単一細胞レベルで、乾癬病変T細胞クローンを同定し、組織病変内でのその存在を確認するための、段階的なプロトコルを構築した。

【0189】

慢性乾癬斑から生検を採取し、2つの切片に分割した。一方はTCR β鎖cDNAの作製に使用し、他方は培養して、炎症性浸潤からT細胞を遊出させた。遊出は24から48時間以内に観察された。T細胞を回収し、CD4特異的磁気ビーズまたはCD8特異的磁気ビーズで標識し、個別のCD4+またはCD8+T細胞を単離し、TCR β鎖解析を行った。単一T細胞の再構成TCR β鎖は、T細胞クローン中でのみ、すなわち、特定の再構成TCR V β鎖が、複数のT細胞の両方で同定されるか、および、他方の生検標本内で同定されるかについて解析した。

【0190】

4名の患者からの病変生検をこのようにして試験した。患者#1ではCD4+T細胞を、患者#2ではCD8+T細胞を解析した。40個のCD4+のうちの2個(#1)、または37個のCD8+T細胞のうちの2個(#2)は、それぞれ、同一の再構成TCR V βおよび再構成TCR V βを有した(表7)。再構成特異的プライマーを、対応するV βリーダープライマーと共に使用し、PCR産物を直接シーケンシングして、再構成TCR V βのそれぞれを、対応する生検サンプルから増幅することができ、これによって、組織病変内で対応するT細胞のクローナルな増殖が起きていることが裏付けられた。

【0191】

【表7】

表7 外植片培養物由来の単一T細胞の反復再配列TCR β鎖、および、対応するバイオプシー、血液、または扁桃腺標本中の同一再配列TCRの存在

患者番号	表現型	同一T細胞数／T細胞総数	同一再構成αβ-TCR	再構成 TCR Vβ鎖*					TCR β鎖 CDR3 の同定		
				TCR Vβ		N(D)N	Jβ		対応する皮膚組織	PBL	扁桃腺
1	CD4	2/40	yes	7.2	CASS	PTSL	TDTG	2.7	+	ND	NA
2	CD8	2/37	yes	12.4	CAS	TPSRGIS	YGYT	1.2	+	ND	NA
3	CD4	2/82	yes	18.1	CASS	TTPGN	SGNT	1.3	+	+	+
	CD8	3/41	yes	7.2	CASSL	SPVAY	SNQP	1.5	+	+	+
		2/41	yes	7.6	CASSL	RPGTGGF	ETQY	2.5	+	+	-
		2/41	yes	7.7	CASSL	NPS	SGNT	1.3	+	-	+

* 推定されるアミノ酸配列(1文字コード) ; NA 入手不可 ; ND 未測定 ; + 再構成TCR CDR3が同定された ; - 再構成TCR CDR3同定されず

【0192】

患者#3では、CD4+およびCD8+T細胞を解析した。この患者は、反復性連鎖球菌性アンギーナ(感染性乾癬を引き起こす主な要因である)に伴う乾癬炎症が持続していたため、扁桃摘出を受けていた。血中リンパ球および扁桃腺断片も、同様に解析を行うことができた。1つの特定の再構成 - TCRが、82個のCD4+T細胞のうち2個で確認され(表7)、3個の再構成TCRが、41個のCD8+T細胞のうちそれぞれ2個または3個で反復して確認された。これらの再構成TCRは全て、対応する生検

サンプル（他方の切片）中でも同定された。最も興味深いことは、CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞で繰り返し観察された再構成TCRV はいずれも、患者のPBLおよび/または扁桃腺組織からも増幅され、このことは、対応するT細胞クローンが全身に分布することを示している。

【0193】

4.5 表皮および真皮におけるCD8+ T細胞クローンの示差的分布

T細胞浸潤物の多くは乾癬皮膚病変の真皮コンパートメントに局在するが、乾癬の発症は表皮内のT細胞の蓄積に強く依存し、それらの多くはCD8+である。従って、実際に病原性を示すT細胞はCD8+ T細胞であると言うことができ、これが表皮に侵入して乾癬皮膚病変を促進する必要がある。次の2人の患者では、表皮および真皮内のCD8+ T細胞クローンの示差的クローン分布を解析した。このため、真皮と表皮を剥離し、個別に培地中に播種した。

10

【0194】

単一CD8+ T細胞のコンパートメントに関する解析で、どちらの患者でも、CD8+ T細胞クローンは真皮コンパートメントより表皮コンパートメントで強く示されることが実証された（表8）。患者#4では、8個の異なる再構成TCRVが52個の表皮CD8+ T細胞のうち2個または3個で確認され、4個の再構成TCRVが、表皮および真皮T細胞の両方で反復して観察された。患者#5では、3個の異なる再構成TCRVが33個の表皮CD8+ T細胞のうち3、4、または7個で選択的に提示され、2つの表皮再構成TCRVが真皮T細胞でも同様に観察された。真皮では、同一の再構成TCRVを示すT細胞クローンは1個（患者#4）または2個（患者#5）のみであった。従って、表皮T細胞は、真皮T細胞に対してクローン優位性を示した。

20

【0195】

【表 8】

表 8 表皮および真皮におけるCD8+T細胞クローンの示差的存在

患者	クローン番号	再構成 TCR Vβ鎖*					表皮中の頻度	真皮中の頻度
		Vβ		N(D)N	J		同一数／総数	同一数／総数
患者#4	1	4.1	CASSQ	ENRG	GYAV	2.7	2/52	1/36
	2 ⁺	6.5	CASSY	SEGED	EAFF	1.1	3/52	1/36
	3 ⁺	9.2	CASS	PRGGE	NTIY	1.3	2/52	NO
	4	11.2	CASS	STLAGGP	DTQY	2.3	2/52	NO
	5	11.2	CASS	LGRL	QETQ	2.5	2/52	NO
	6	11.3	CASS	PAQ	—	—	2/52	1/36
	7	18.1	CAS	AGTGYF	QPQH	1.5	2/52	NO
	8	19.1	CAS	TLRSSG	NEKL	1.4	2/52	NO
	9	6.1	CAS	TELAGD	YNEQ	2.1	1/52	1/36
	10	7.9	CA	SWTGELG	GYTF	1.2	NO	2/36
患者#5	1	11.3	CASS	PRTSGG	YNEQ	2.1	3/33	NO
	2	20.1	CSAR	DQQQHR	TDTQ	2.3	7/33	NO
	3	20.1	CSAR	GGLGLMP	GELF	2.2	4/33	NO
	4	4.1	CASSQ	LTSESY	SYNE	2.1	1/33	1/25
	5	6.1	CAS	GWDRGT	FFGQ	1.1	1/33	1/25
	1	3.1	CASSQ	DLWTGGWG	TDTQ	2.3	NO	2/25
	2	12.3 (4)	CASSL	ILGGD	EQYF	2.7	NO	2/25

* 推定されるアミノ酸配列（1文字コード）；+ T細胞がAPCと密着したT細胞；
NO 観察されず；Jβ遺伝子無しでCβに直接再配列

【0196】

4.6 TCRハイブリドーマの作製

クローン増殖したCD8+T細胞の再構成 TCRペアは、乾癬病変部T細胞応答の抗原特異性を有すると考えられる。それらを、可能性のある乾癬抗原の同定に使用するために、いくつかの病変CD8+T細胞クローンの再構成TCRで、組換えTCRハイブリドーマを作製した。これを行うために、3個の異なるCD8+クローンの再構成鎖および鎖をクローニングし、組換え - TCRクローンとして、マウス58-/-T細胞ハイブリドーマ株において、ヒトCD8分子および緑色蛍光タンパク質と共に、NFATの制御下で安定発現させた。CD3モノクローナル抗体によって活性化すると、これらのハイブリドーマは十分な量のインターロイキン2(IL-2)を生成し(IL-2 Elisaで測定)、UV顕微鏡下で緑色蛍光を示した。更に、それらのハイブリド-

マは、ケラチノサイト細胞株の細胞、H a C a TをH L A - C w 6（乾癬への罹病性を与える主なリスク対立遺伝子）でトランスフェクトすると、これらの細胞株の細胞によって活性化された。

【 0 1 9 7 】

参考文献

- Bendle, G.M., et al. (2010). *Nature Med* 16:565-570
- Bettinotti, M.P. et al. (2003) *J. Immunol. Meth.* 279:143-148.
- Bielekova and Martin, *J Mol Med.* 2001 Oct;79(10):552-65: Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands
- Blank, U., Boitel, B., Mege, D., Ermonval, M., and Acuto, O. (1993). Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *Eur. J. Immunol.* 23, 3057-3065. 10
- Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and Van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 175-208.
- Chen, E.H. et al. (2007) *FEBS Letters* 581:2181-2193.
- Cohen, C.J. et al. (2007) *Cancer Res.* 67:3898-3903.
- Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Singluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264, 716-719. 20
- Crawford, F., Huseby, E., White, J., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2004). Mimotopes for alloreactive and conventional T cells in a peptide-MHC display library. *PLoS Biology* 2, 523-533.
- Crawford, F., Jordan, K.R., Stadinski, B., Wang, Y.B., Huseby, E., Marrack, P., Slansky, J.E., and Kappler, J.W. (2006). Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunol. Rev.* 210, 156-170.
- Dalakas, M.C. (2006). Sporadic inclusion body myositis - diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nature Clinical Practice Neurology* 2, 437-447.
- Durocher, Y. et al. (2002) *Nucl. Acid Res.* 30:e9.
- Fiering, S., Northrop, J.P., Nolan, G.P., Mattila, P.S., Crabtree, G.R., and Herzenberg, L.A. (1990). Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev.* 4, 1823-1834. 30
- Fissolo, N., Haag, S., De Graaf, K.L., Drews, O., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Weissert, R. (2009). Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 2090-2101.
- Fontoura et al. *Int Rev Immunol.* 2005 Sep-Dec;24(5-6):415-46: Antigen-specific therapies in multiple sclerosis: going beyond proteins and peptides.
- Friese, M.A. and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 132-141. 40
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A., and McMichael, A. (1987). Cytotoxic lymphocytes-T recognize a fragment of influenza-virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature* 326, 881.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.
- Ishizuka, J., Stewart-Jones, G.B.E., Van der Merwe, A., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Jones, E.Y. (2008). The structural dynamics and energetics of an immunodominant 50

nt T cell receptor are programmed by its Vb domain. *Immunity* 28, 171-182.

Karttunen, J. and Shastri, N. (1991). Measurements of ligand induced activation in single viable T cells using lacZ reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3972-3976.

Katakura, Y. et al. (1998) *Meth. Cell Biol.* 57:69-91.

Kuball, J. et al. (2007) *Blood* 109:2331-2338.

Lehner, P.J., Wang, E.C.Y., Moss, P.A.H., Williams, S., Platt, K., Friedman, S.M., Bell, J.I., and Borysiewicz, L.K. (1995). Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the Vb17 gene segment. *J. Exp. Med.* 181, 79-91. 10

Marsh, S.G. et al. (2010) *Tissue Antigens* 75:291-455

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229-265.

Murphy, K. et al. "Janeway's Immunobiology" 2008, 7th Edition, Garland Science, New York, ISBN 978-0-8153-4123-9

Murray, G.I. (2007) *Acta Histochemica* 109:171-176.

Nino-Vasquez, J.J., Allicotti, G., Borrás, E., Wilson, D.B., Valmori, D., Simon, R., Martin, R., and Pinilla, C. (2005). A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes. *Mol. Immunol.* 40, 1063-1074. 20

Ozaki, S. et al. (1988) *J. Immunol.* 141:71-78.

Pannetier, C. et al. 1995 *Immunol. Today* 16:176-181.

Pircher, H., Mak, T.W., Ballhausen, W., Ruedi, E., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Burki, K. (1989). T cell tolerance to Mls encoded antigens in T cell receptor Vb8.1 chain transgenic mice. *EMBO J.* 8, 719-727.

Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N.P.N., Bachor, O.A., and Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: Database for MHC ligands and peptide motifs. *IG* 50, 213-219.

Robinson J, et al. (2003) *Nucleic Acids Research*, 31:311-314.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHC, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 419-466. 30

Seitz, S., Schneider, C.K., Malotka, J., Nong, X., Engel, A.G., Wekerle, H., Hohlfield, R., and Dornmair, K. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor α - and β -chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12057-12062.

Shaner, N.C. et al. *Nat Methods*. (2005) 2:905-909.

Shirahata, S. et al. (1998) *Meth Cell Biol.* 52:111-145.

Smith, E.S., Mandokhot, A., Evans, E.E., Mueller, L., Borrello, M.A., Sahasrabudhe, D.M., and Zauderer, M. (2001). Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: Application to identifying tumor antigens. *Nature Med.* 7, 967-972. 40

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 591-619.

Stewart-Jones, G.B.E., McMichael, A.J., Bell, J.I., Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (2003). A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nature Immunol.* 4, 657-663.

Stone, J.D. et al. (2009) *Immunology* 126:165-176

Suter-Crazzolara, C. et al. *Meth. Cell Biol.* (1995) 50:425-438.

Tung, J.W. et al (2007) *Clin Lab Med.* 27:453-468

Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by 50

cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254, 1643-1647.

van Loenen, M.M., et al. (2010). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 107, 10972-10977.

Voss, R.H. et al. (2008) J. Immunol. 180:391-401.

Walter, U. and Santamaria, P. (2005). CD8+ T cells in autoimmunity. Curr. Opin. Immunol. 17, 624-631.

Wang, Y.B., Rubtsov, A., Heiser, R., White, J., Crawford, F., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2005). Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2476-2481.

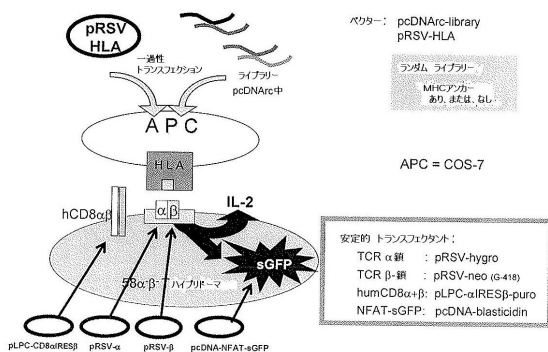
Weinhold, M. et al. (2007) J. Immunol. 179:5534-5542.

Wong, F.S., Karttunen, J., Dumont, C., Wen, L., Visintin, I., Pilip, I.M., Shastri, N., Pamer, E.G., and Janeway, C.A. (1999). Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type I diabetes by screening an organ-specific cDNA library. Nature Med. 5, 1026-1031.

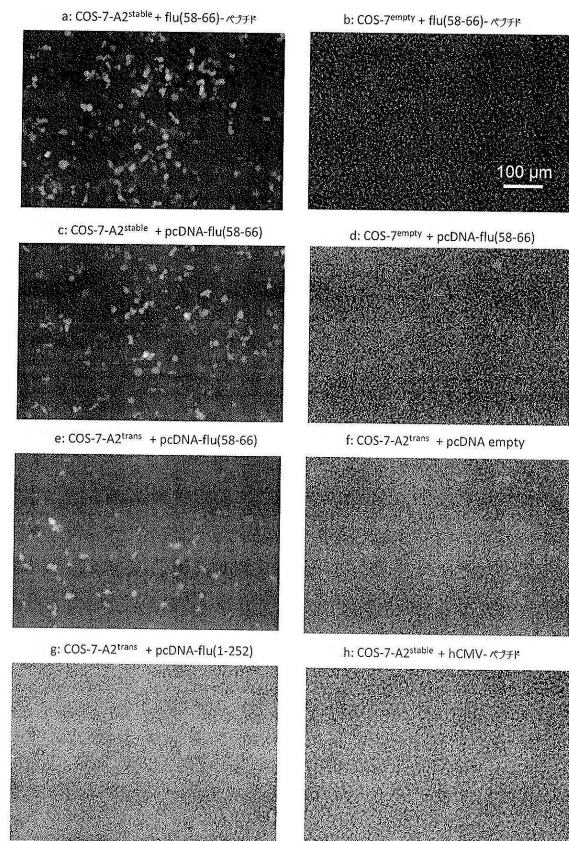
Wucherpfennig, K.W., Allen, P.M., Celada, F., Cohen, I.R., De Boer, R., Garcia, K.C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., Huseby, E.S., Krakauer, D.C., Nemeze, D., Perelson, A.S., Pinilla, C., Strong, R.K., and Sercarz, E.E. (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. Semin. Immunol. 19, 216-224.

10

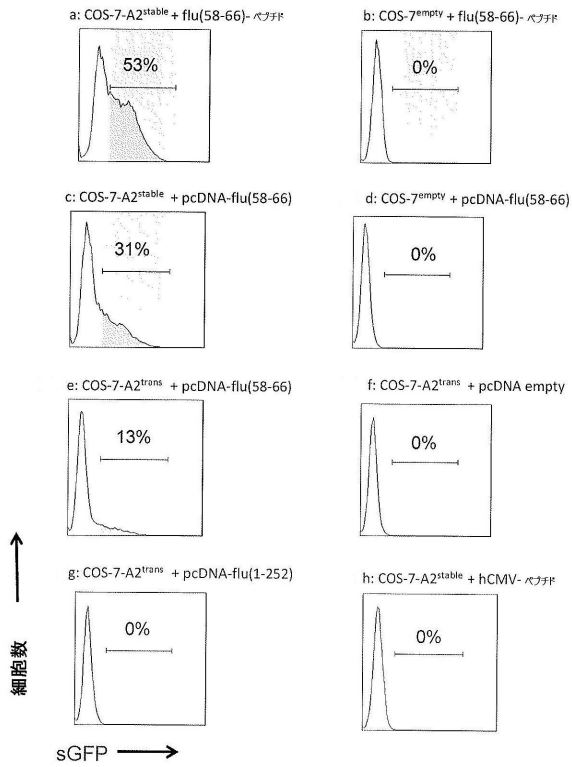
【図 1】



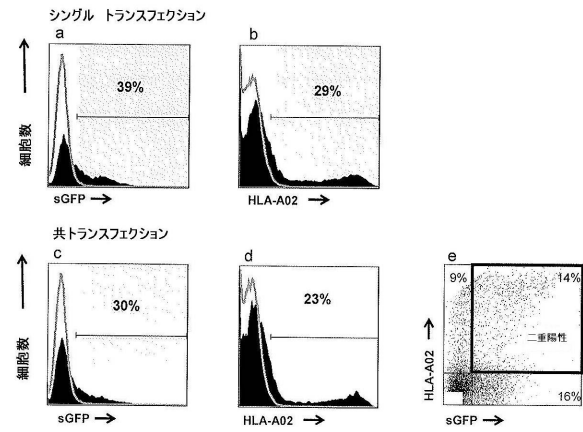
【図 2】



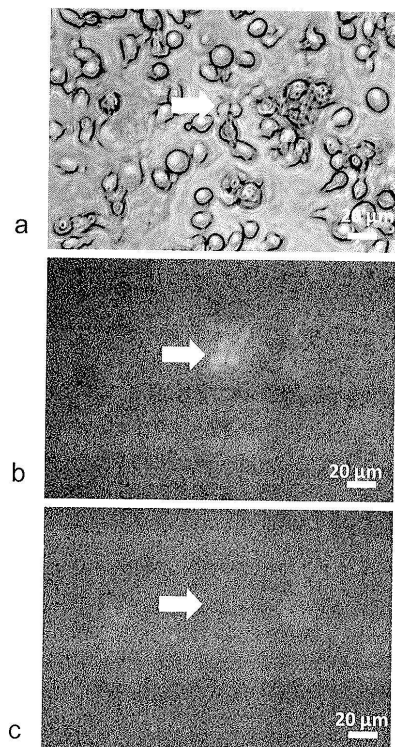
【図3】



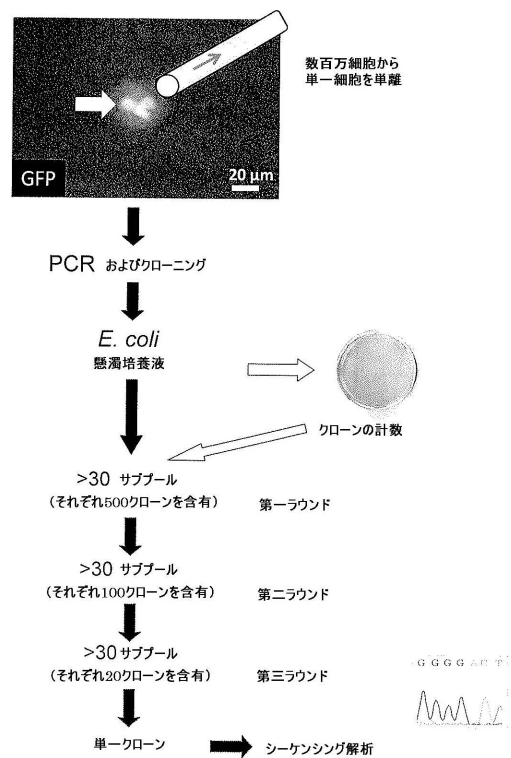
【図4】



【図5】

COS-7-A2^{trans} + pcDNA-A2-269 lib

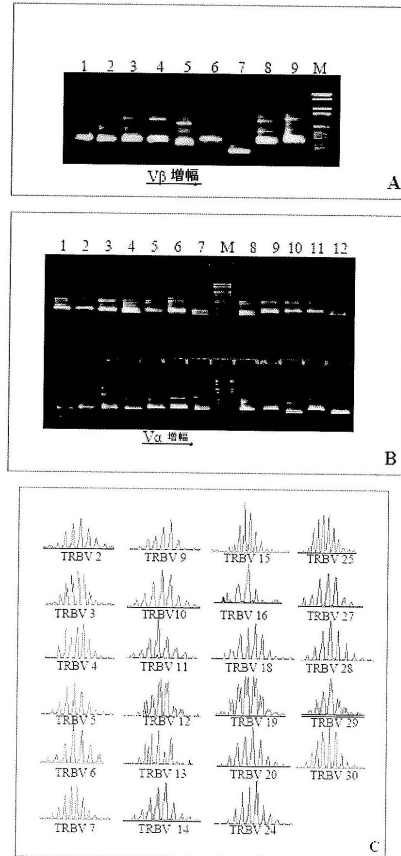
【図6】



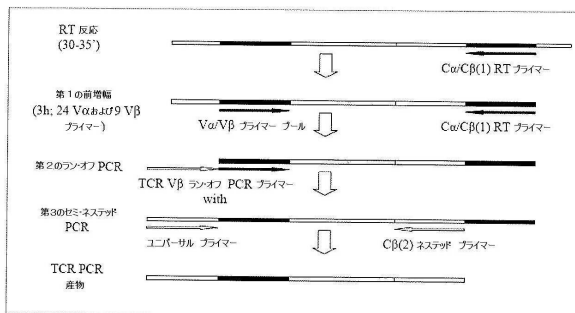
【図 7】

flu(58-66)	G	I	L	G	F	V	F	T	L
mimo-1	(T)	I	L	G	F	V	F	T	L
mimo-2 (x2)	(A)	I	L	G	(W)	V	F	T	L
mimo-3	(Q)	I	(M)	G	F	V	F	T	L
mimo-4	(A)	I	(A)	G	F	V	F	T	L

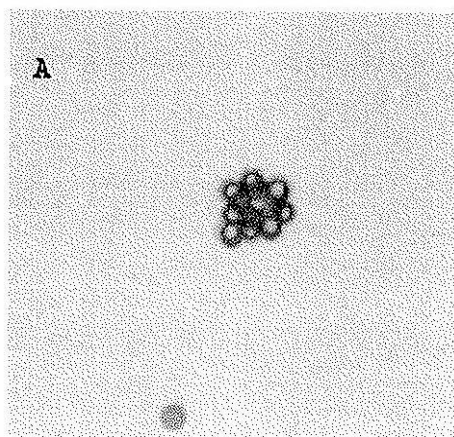
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0006192537000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ドルンマイル, クラウス
ドイツ連邦共和国 8 2 1 4 0 オルヒング, ヨゼフ タウシェッカーシュトラッセ 1 1 アー
- (72)発明者 ホルフェルト, ラインハルト
ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 マルティンスリート, レーナ-クリスト シュトラッセ 4
- (72)発明者 ブランツ, ヨルグ
ドイツ連邦共和国 8 2 3 1 9 シュタルンベルク, ヴァルトシュトラッセ 2 アー
- (72)発明者 ジヴェルト, カテリーナ
ドイツ連邦共和国 8 1 3 7 5 ミュンヘン, ハーダーウンシュトラッセ 2 4
- (72)発明者 キム, ソン-ミン
ドイツ連邦共和国 8 0 3 3 7 ミュンヘン, フラウエンローブシュトラッセ 9 - 1 1, クリニ
ク ウント ポリクリニク フル デルマトロギー内

合議体

審判長 田村 明照

審判官 中島 庸子

審判官 長井 啓子

- (56)参考文献 特開2008-263950(JP, A)
特表2009-515534(JP, A)
J. IMMUNOL., 2003年 1月15日, Vol. 170, No. 2, pp. 947 - 960
植村靖史、外1名, 「ヒトTh細胞クローン認識抗原ペプチドの多様性解析システムの構築 I 型糖尿病におけるGAD65模倣ペプチド同定への応用」, 医学のあゆみ, 2003年 9月13日, Vol. 206, No. 11, pp. 836 - 840
J. IMMUNOL., 2000年 8月15日, Vol. 165, No. 4, pp. 2040 - 2047
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2005年 2月15日, Vol. 102, No. 7, pp. 2476 - 2481
AM. J. PATHOL., 2003年10月, Vol. 163, No. 4, pp. 1215 - 1226
J. IMMUNOL., 2003年 9月15日, Vol. 171, No. 6, pp. 3287 - 3295
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1991年 5月1日, Vol. 88, No. 9, pp. 3972 - 3976
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1992年 7月1日, Vol. 89, No. 13, pp. 6020 - 6024
INT. J. CANCER, 2002年 5月1日, Vol. 99, No. 1, p. 7 - 13
J. IMMUNOL. METHODS, 2000年 8月28日, Vol. 242, No. 1 - 2, p. 33 - 42

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00- 3/00

C07K 1/00-19/00

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(Jdream3)

PubMed