

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 10 月 2 日(02.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/157595 A1

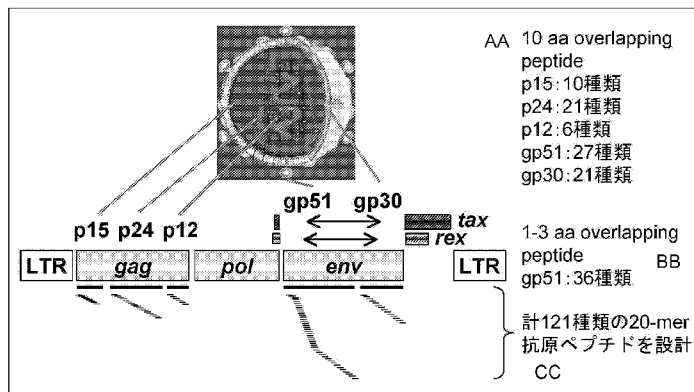
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01) *C07K 14/15* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/059052
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 27 日(27.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-067683 2013 年 3 月 27 日(27.03.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人理化学研究所(RIKEN)
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
Saitama (JP).
- (72) 発明者: 間 陽子(AIDA, Yoko); 〒3510198 埼玉県
和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究
所内 Saitama (JP). 竹嶋 伸之輔(TAKESHIMA,
Shin-nosuke); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1
号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人HARAKENZO W
ORLD PATENT & TRADEMA
RK (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-
MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁
目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 新規なポリペプチドおよびその利用

[図1]



AA 10 aa overlapping peptide
p15: 10 kinds
p24: 21 kinds
p12: 6 kinds
gp51: 27 kinds
gp30: 21 kinds
BB 1-3 aa overlapping peptide
gp51: 36 kinds
CC Designing 121 kinds in total of 20-mer antigen peptides

(57) Abstract: A polypeptide that is derived from bovine leukemia virus and serves as a CD4 positive T cell epitope, said polypeptide being selected from: (a) a polypeptide comprising 11 to 50, inclusive, consecutive amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and containing the amino acids from the 22- to 31-positions; or (b) a polypeptide comprising 20 to 50, inclusive, consecutive amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 and containing the amino acids from the 31- to 50-positions, etc.

(57) 要約: 本発明のポリペプチドは、CD4 陽性 T 細胞エпитープとなる牛白血病ウイルス由来であって、(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列における連続する 11 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、22 番目～31 番目のアミノ酸を含むポリペプチド、または (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目～50 番目のアミノ酸を含むポリペプチド等である。



NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：新規なポリペプチドおよびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、CD4陽性T細胞エпитープとなる、牛白血病ウイルス（BLV）由来の新規なポリペプチドおよびその利用に関するものである。

背景技術

[0002] 地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルス（BLV）というレトロウイルスによって誘発される悪性Bリンパ腫である。予防法および根治療法はなく、全世界的に蔓延し、感染率および発症率は増加の一途をたどっている。この病気は長期の潜伏期間（5～10年）を経た後に発症し、死に至るため、畜産界に甚大な被害をもたらしている。現在の対処法は、隔離または淘汰によって、拡大を防ぐことである。そのため、ワクチンによる予防法および治療法の確立が急がれる。

[0003] これまでに、牛白血病ウイルス（BLV）由来のペプチドにおけるT細胞エпитープが調べられており、報告がなされている。例えば、非特許文献1には、Env領域に由来するgp51のアミノ酸配列の61～78番目がT細胞エпитープであることが記載されている。また、非特許文献2には、Env領域に由来するgp51のアミノ酸配列の98～117番目がT細胞エпитープであることが記載されている。また、非特許文献3には、Gag領域に由来するp24のアミノ酸配列の31～55番目および141～165番目がT細胞エпитープであることが記載されている。

[0004] ところで、本発明者らの研究グループは、以前の研究で、ウシの主要組織適合抗原（MHC）のクラスII遺伝子のうち、DRB3遺伝子およびその遺伝子産物の構造を明らかにしている（非特許文献4）。さらに、この遺伝子の型によって、牛白血病ウイルス（BLV）が引き起こす地方病性牛白血病の発症に対する発症抵抗性および発症感受性が異なることを見出している。

[0005] また、ヒツジを用いた感染実験において、白血病に対する発症抵抗性のあるヒツジMHCクラスIIを有する個体では、Th1型細胞性免疫が優勢となっているが、一方、発症感受性のあるヒツジMHCクラスIIを有する個体では、Th2型液性免疫が優勢となっていることが報告されている（非特許文献5、非特許文献6）。また、ウシにおいても発症感受性MHCの型をホモに有する個体は他の個体に比べてプロウイルスロードが高くなっていることが確かめられている（非特許文献7）。そのため、発症感受性MHCを有する個体では、牛白血病ウイルス（BLV）に対して液性免疫が誘導され、病態進行が起こりやすくなっていると考えられる。また、発症感受性MHCの型をホモに有する個体は、感染源となる危険性も高い。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: M. H. Gatei et al., Journal of Virology, Apr. 1993, p. 1796-1802.
- 非特許文献2: I. Callebaut et al., Journal of Virology, Sept. 1993, p. 5321-5327.
- 非特許文献3: A. Mager et al., Journal of General Virology (1994), 75, 2223-2231.
- 非特許文献4: Y. Aida et al., Biochem Biophys Res Commun 1995, 209(3): 981-988.
- 非特許文献5: Y. Nagaoka et al., Cancer Res., 1999, 59(4):975-981.
- 非特許文献6: S. Konnai et al., Microbiol Immunol 2003, 47(3):223-232.
- 非特許文献7: T. Miyasaka et al., Tissue Antigens 2013, 81(2), 71-82.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 牛白血病ウイルス（BLV）に対するワクチンによる予防法および治療法を確立するためには、さらなるT細胞エピトープの探索が必要となる。

[0008] 本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、C D 4 陽性T細胞エプトープとなる、牛白血病ウイルス（B L V）由来の新規なポリペプチド等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明に係るポリペプチドは、以下の（a）～（h）の何れかに示すポリペプチドである：

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列における連続する11個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、22番目～31番目のアミノ酸（FSISIDQ IL E）を含むポリペプチド

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、31番目～50番目のアミノ酸（GHWARDC PTK ATGPPPGPCP）を含むポリペプチド

（c）配列番号6に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、41番目～60番目のアミノ酸（KNYIHW F HKT QKKPWTFTSG）を含むポリペプチド

（d）配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、52番目～71番目のアミノ酸（THYNLLN VA SVVAQNRRGL D）を含むポリペプチド

（e）配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、131番目～150番目のアミノ酸（VRE TIHSVLS LFL LALFLLF）を含むポリペプチド

（f）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、141番目～160番目のアミノ酸（V THPVLGKVL ILNQMANFSL）を含むポリペプチド

（g）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、151番目～170番目のアミノ酸（I LNQM ANFSL LPSFDTLLVD）を含むポリペプチド

（h）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で5

0個以下のアミノ酸からなり、かつ、181番目～200番目のアミノ酸（TRGAIRYLST LLTLCPATCI）を含むポリペプチド。

[0010] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-067683号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明に係るポリペプチドは、CD4陽性T細胞エピトープとなり、CD4陽性T細胞を活性化することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例においてCD4陽性T細胞エピトープマッピングを行ったBLVのゲノム領域を示す図である。

[図2]実施例1において作製した10アミノ酸オーバーラッピングp15ペプチドを示す図である。

[図3]実施例1において作製した10アミノ酸オーバーラッピングp24ペプチドを示す図である。

[図4]実施例1において作製した10アミノ酸オーバーラッピングp12ペプチドを示す図である。

[図5]実施例1における細胞増殖試験の結果を示す図である。

[図6]実施例1におけるペプチド刺激によるTh1細胞の活性化能の結果を示す図である。

[図7]実施例2において作製した10アミノ酸オーバーラッピングgp30ペプチドを示す図である。

[図8]実施例2において作製した10アミノ酸オーバーラッピングgp51ペプチドを示す図である。

[図9]実施例2における10アミノ酸オーバーラッピングペプチドの細胞増殖試験の結果を示す図である。

[図10]実施例2において作製した1～3アミノ酸オーバーラッピングペプチドを示す図である。

[図11]実施例2における1～3アミノ酸オーバーラッピングペプチドの細胞

増殖試験の結果を示す図である。

[図12]実施例3において作製した10アミノ酸オーバーラッピングペプチドを示す図である。

[図13]実施例3における細胞増殖試験（感受性牛・1回目）の結果を示す図である。

[図14]実施例3における細胞増殖試験（非感受性牛・1回目）の結果を示す図である。

[図15]実施例3における細胞増殖試験（感受性牛・2回目）の結果を示す図である。

[図16]実施例3における細胞増殖試験（非感受性牛・2回目）の結果を示す図である。

[図17]実施例3における細胞増殖誘導能の濃度依存性（感受性牛）の結果を示す図である。

[図18]実施例3における細胞増殖誘導能の濃度依存性（非感受性牛）の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] [1. 本発明に係るポリペプチド]

本発明に係るポリペプチドは、牛白血病ウイルス（BLV）を構成する主要なタンパク質であるGag領域由来のp12およびp15、Env領域由来のgp51およびgp30、ならびにpX領域由来のtaxのペプチドの配列に基づき設計された、CD4陽性T細胞エпитープとなるポリペプチドである。特にウシ（*Bos taurus*）、コブウシ（*Bos indicus*）、および／またはスイギュウ（*Bubalus bubalis*）のCD4陽性T細胞エпитープとなる。好ましくは、ウシおよび／またはスイギュウのCD4陽性T細胞エпитープとなる。より好ましくは、ウシのCD4陽性T細胞エпитープとなる。ウシとしては、乳用種、肉用種、乳肉兼用種、役用種、および役肉兼用種等が挙げられる。具体的には、例えば、黒毛和種、日本短角種等の和牛、ホルスタイン、ジャージー、および各国の在来種等の品種が挙げられるが、これらに限

定されない。なお、ウシ、コブウシ、および／またはスイギュウ以外の動物のCD4陽性T細胞エピトープにもなり得る。そのような動物としては、例えば、マウス、ヒツジ、ヤギ、ブタ、霊長類、およびヒト等が挙げられる。

[0014] 本発明に係るポリペプチドのうち、後述する(a)～(f)は、牛白血病発症に対して感受性を有するMHCクラスII(DRB3*1601型)をホモにもつ個体の免疫細胞を用いて同定されたエピトープである。したがって、本発明のポリペプチドのうち(a)～(f)は、発症率が高く、感染源となりやすい個体に対する効果が特に期待できる。なお、牛白血病発症に対して感受性を有さない(抵抗性を有する、あるいは何れも有さない)MHCクラスIIをもつ個体に対する効果も期待できる。また、本発明のポリペプチドのうち(e)は、牛白血病発症に対して感受性を有さないMHCクラスIIをもつ個体の免疫細胞においてもエピトープとして同定されている。したがって、本発明のポリペプチドのうち(e)は、特に、より幅広いMHCクラスIIに対して効果が期待できる。また、本発明のポリペプチドのうち、後述する(g)および(h)は、牛白血病発症に対して感受性を有さないMHCクラスIIをもつ個体の免疫細胞を用いて同定されたエピトープである。

[0015] 「CD4陽性T細胞エピトープとなる」とは、抗原提示細胞のMHCクラスIIに結合することができ、かつ、CD4陽性T細胞を活性化させることを指す。「CD4陽性T細胞を活性化させる」とは、CD4陽性T細胞をTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／または制御性T細胞(Treg細胞)へ分化させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞を増殖させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞に種々のサイトカインを産生させること、ならびに分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞が免疫応答を制御すること等を指し、より好ましくは、CD4陽性T細胞をTh1細胞へ分化させること、分化したTh1細胞を増殖させること、分化したTh1細胞に種々のサイトカインを産生

させること、およびその結果として細胞性免疫を活性化すること等を指す。

[0016] 抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ／単球、およびB細胞等が挙げられる。また、Th1細胞が産生するサイトカイン（Th1サイトカイン）としては、例えば、IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF- α 、およびGM-CSF等が挙げられる。Th2細胞が産生するサイトカイン（Th2サイトカイン）としては、例えば、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、GM-CSF、TGF- β 、およびIL-13等が挙げられる。Th1細胞は、インビボにおいて、上述のサイトカインを産生することによって、細胞性免疫を活性化する。Th2細胞は、インビボにおいて、上述のサイトカインを産生することによって、液性免疫を活性化する。

[0017] 本発明に係るポリペプチドが結合するMHCクラスIIの型（ハプロタイプ）は特に限定されない。本発明に係るポリペプチドが結合するMHCクラスIIの型は、例えば、牛白血病発症に対して感受性を有する個体のMHCクラスIIの型であることが好ましく、DRB3*1601型であることがより好ましい場合がある。あるいは、多くの型のMHCクラスIIに結合するものであってもよい。例えば、牛白血病発症に対して感受性を有する型だけでなく、牛白血病発症に対して抵抗性を有する型（例えば、DRB3*0701型、DRB3*14011型、およびDRB3*1101型等）、および／または抵抗性・感受性の何れも有さない型（例えば、DRB3*1501型、DRB3*2703型、およびDRB3*0503型等）のMHCクラスIIに結合するものであってもよい。なお、上述のMHCクラスIIの型の具体的なアミノ酸配列は、<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/align.html>から入手することができる。

[0018] 本発明に係るポリペプチドの一例は、以下の（a）または（b）に示すものである。

（a）（a）配列番号1（WRCSLSLGNQ QWMTAYNQEA KFSISIDQIL EAHNQSPFCA K SPRYTLDSV NGYPKIYWPP PQGRRRFGAR A）に示すアミノ酸配列における連続する

1 1 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、2 2 番目～3 1 番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含むポリペプチド；

(b) 配列番号 2 (VHTPGPKMPG PRQPAPKRPP PGPCYRCLKE GHWARDCPTK ATGPPPG PCP ICKDPSHWKR DCPTLKSKN) に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、3 1 番目～5 0 番目のアミノ酸 (GHWARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド；

(c) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、4 1 番目～6 0 番目のアミノ酸 (KNYIHW F HKT QKKPWTFTSG) を含むポリペプチド；

(d) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、5 2 番目～7 1 番目のアミノ酸 (THYNLL N VA SVVAQNRRL D) を含むポリペプチド；

(e) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、1 3 1 番目～1 5 0 番目のアミノ酸 (VRE TIHSVLS LFLALFLLF) を含むポリペプチド；

(f) 配列番号 1 0 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、1 4 1 番目～1 6 0 番目のアミノ酸 (V THPVLGKVL ILNQMANFSL) を含むポリペプチド；

(g) 配列番号 1 0 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、1 5 1 番目～1 7 0 番目のアミノ酸 (I LNQMANSFL LPSFDTLLVD) を含むポリペプチド；

(h) 配列番号 1 0 に示すアミノ酸配列における連続する 2 0 個以上で 5 0 個以下のアミノ酸からなり、かつ、1 8 1 番目～2 0 0 番目のアミノ酸 (T RGAIRYLST LLTLCPATCI) を含むポリペプチド。

[0019] C D 4 陽性 T 細胞をより活性化させるという観点では、上記 (a) に示すポリペプチドは、1 5 個以上のアミノ酸からなることが好ましく、1 8 個以上のアミノ酸からなることがより好ましく、2 0 個以上のアミノ酸からなることがさらに好ましい。また、上記 (a) ～ (h) に示すポリペプチドは、

それぞれ、40個以下のアミノ酸からなることが好ましく、30個以下のアミノ酸からなることがより好ましい。

[0020] また、上記（a）に示すポリペプチドは、配列番号3（WMTAYNQEA KFSISIDQIL EAHNQSPFCA K）に示すアミノ酸配列における連続する11個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、11番目～20番目のアミノ酸（FSISIDQIL E）を含むものが好ましい。なお、配列番号3に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列の12番目～41番目のアミノ酸と同一である。また、配列番号3に示すアミノ酸配列の11番目～20番目のアミノ酸は、配列番号1に示すアミノ酸配列の22番目～31番目のアミノ酸と同一である。

[0021] 上記（a）に示すポリペプチドは、配列番号3に示すアミノ酸配列における7番目～26番目のアミノ酸（QEA KFSISIDQIL EAHNQSP）を含むことがより好ましい。上記（a）に示すポリペプチドは、配列番号3に示すアミノ酸配列における7番目～26番目のアミノ酸からなることがさらに好ましい。なお、配列番号3に示すアミノ酸配列における7番目～26番目番目のアミノ酸は、配列番号1に示すアミノ酸配列の18番目～37番目のアミノ酸と同一である。

[0022] 上記（b）に示すポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列における31番目～50番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0023] 上記（c）に示すポリペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列における41番目～60番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0024] 上記（d）に示すポリペプチドは、配列番号8に示すアミノ酸配列における52番目～71番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0025] 上記（e）に示すポリペプチドは、配列番号8に示すアミノ酸配列における131番目～150番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0026] 上記（f）に示すポリペプチドは、配列番号10に示すアミノ酸配列における141番目～160番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0027] 上記（g）に示すポリペプチドは、配列番号10に示すアミノ酸配列にお

ける 151 番目～170 番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0028] 上記 (h) に示すポリペプチドは、配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 181 番目～200 番目のアミノ酸からなることが好ましい。

[0029] 本発明に係るポリペプチドの特に好ましい一例は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 31 番目～50 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 6 に示すアミノ酸配列における 41 番目～60 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 52 番目～71 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 131 番目～150 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 141 番目～160 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 151 番目～170 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、および、配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 181 番目～200 番目のアミノ酸からなるポリペプチドである。

[0030] また、別の一例では、配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 30 番目～50 番目のアミノ酸からなるポリペプチドが好ましい。

[0031] なお、本発明に係るポリペプチドの製造方法は特に限定されず、固相合成法等のペプチド化学合成法によって製造してもよいし、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入し当該細胞に大量に産生させてもよいし、または細胞抽出液を用いた無細胞ペプチド合成系によって産生させてもよい。本発明に係るポリペプチドは、比較的短鎖であり、かつ特別な修飾等を行わずとも CD4 陽性 T 細胞エピトープとなるため、ペプチド化学合成法による製造も容易である。

[0032] また、本発明に係るポリペプチドは、ウシ、コブウシ、および／またはスイギュウの CD4 陽性 T 細胞エピトープとなる限りにおいて、アミノ酸の置換、付加、および／または欠失が生じていてもよい。ここで許容されるアミノ酸の置換、付加、または欠失とは、具体的には以下に示すものである。

[0033] アミノ酸の置換とは、1または2個のアミノ酸の置換であり、好ましくは1個のアミノ酸の置換である。具体的には、例えば、上記（a）～（h）の何れかに示すポリペプチドを構成する塩基性アミノ酸を他の塩基性アミノ酸に置換すること、酸性アミノ酸を他の酸性アミノ酸に置換すること、中性アミノ酸を性質の類似する他の中性アミノ酸に置換すること、等が挙げられる。さらに具体的には、例えば、上記（a）～（h）の何れかに示すポリペプチドにおいて、以下の（1）～（6）の何れかの置換が生じていること等が挙げられる。

（1）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、およびトリプトファン（W）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

（2）リジン（K）、アルギニン（R）、およびヒスチジン（H）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

（3）アスパラギン（N）、およびグルタミン（Q）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

（4）アスパラギン酸（D）、およびグルタミン酸（E）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

（5）アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、およびプロリン（P）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

（6）セリン（S）、およびスレオニン（T）からなる群から選択される1アミノ酸から、当該群中の他のアミノ酸への置換。

[0034] アミノ酸の欠失とは、1または2個のアミノ酸の欠失であり、好ましくは1個のアミノ酸の欠失である。より具体的には、例えば、上記（a）～（h）の何れかに示すポリペプチドを構成する末端側に位置するアミノ酸を欠失させることを意図する。すなわち、アミノ末端側に位置する1または2個のアミノ酸を欠失させる、カルボキシ末端側に位置する1または2個のアミノ酸を欠失させる、あるいは、アミノ末端側に位置する1個のアミノ酸とカル

ボキシ末端側に位置する１個のアミノ酸とを欠失させる、ことを意図する。

[0035] アミノ酸の付加とは、１または２個のアミノ酸の付加であり、好ましくは１個のアミノ酸の付加である。より具体的には、例えば、上記（a）～（h）の何れかに示すポリペプチドを構成する末端側に１または２個のアミノ酸を付加することを意図する。すなわち、アミノ末端側に１または２個のアミノ酸を付加する、カルボキシ末端側に１または２個のアミノ酸を付加する、あるいは、アミノ末端側とカルボキシ末端側とにそれぞれ１個のアミノ酸を付加する、ことを意図する。

[0036] 上記したアミノ酸の置換、欠失、および／または付加は、公知の方法で行うことができる。公知の方法とは、例えば、Kunkel法等の部位特異的な変異導入法を利用して上記ポリペプチドに所望の変異を導入する方法が挙げられる。あるいは、上記したアミノ酸の置換、欠失、および／または付加をした配列を、ペプチド合成法によって合成することが挙げられる。

[0037] 〔２．本発明に係るポリヌクレオチド、ベクター〕
（ポリヌクレオチド）

本発明に係るポリヌクレオチドは、上述の本発明に係るポリペプチドをコードしている。当該ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり、一本鎖または二本鎖である。当該ポリヌクレオチドを構成する塩基の配列は、コードすべきポリペプチドのアミノ酸配列に応じて適宜決定すればよい。

[0038] 配列番号４は、配列番号１に示すアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を示す。配列番号５は、配列番号２に示すアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を示す。配列番号１１は、配列番号６に示すアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を示す。配列番号１２は、配列番号８に示すアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を示す。配列番号１３は、配列番号１０に示すアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を示す。本発明に係るポリヌクレオチドの塩基配列は、例えば、配列番号４に示す塩基配列、配列番号５に示す塩基配列、配列番号１１に示す塩基配列、配列番号１２に示す塩基配列、または配列番号１３に示す塩基配列を参照して適宜決定すればよい。

- [0039] 例えば、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 18 番目～37 番目のアミノ酸（配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸と同一）からなるポリペプチドは、配列番号 4 に示す塩基配列における 52 番目～111 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 31 番目～50 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 5 に示す塩基配列における 91 番目～150 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 6 に示すアミノ酸配列における 41 番目～60 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 11 に示す塩基配列における 121 番目～180 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 52 番目～71 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 12 に示す塩基配列における 154 番目～213 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 131 番目～150 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 12 に示す塩基配列における 391 番目～450 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 141 番目～160 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 13 に示す塩基配列における 421 番目～480 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 151 番目～170 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 13 に示す塩基配列における 451 番目～510 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 181 番目～200 番目のアミノ酸からなるポリペプチドは、配列番号 13 に示す塩基配列における 541 番目～600 番目の塩基を有するポリヌクレオチドによってコードされる。
- [0040] 配列番号 4、配列番号 5、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 13 に示される塩基配列に限らず、当業者であれば、コドン表を参照することによって、ポリペプチドのアミノ酸配列を容易に決定できる。

[0041] 上記ポリヌクレオチドは、細胞中または無細胞合成系での転写および／または翻訳を容易とするため、プロモータ、エンハンサ等の調節領域；開始コドンおよび終止コドン；その他の転写および／または翻訳関連配列；が機能可能に付加されていることが好ましい。さらに、必要に応じて、上記ポリヌクレオチドには、例えば、Hisタグ、HAタグ、Mycタグ、Flagタグ等の精製用ペプチド配列をコードする配列等が付加されていてもよい。これらの配列が付加された本発明に係るポリヌクレオチドの一例は、後述するベクターに組み込まれた形態のものである。

[0042] (ベクター)

本発明に係るベクターは、上述の本発明に係るポリヌクレオチドを含んでいる。本発明に係るベクターは、本発明に係るポリペプチドを産生するために使用される。本発明に係るベクターは、組換え発現に用いる発現ベクターであってもよいし、細胞抽出液等を用いた無細胞ペプチド合成系に用いるベクターであってもよい。

[0043] 組換え発現に用いる発現ベクターの作製方法としては、プラスミド、ファージ、コスミド、またはウイルス等を用いる方法が挙げられるが、特に限定されない。本発明に係るポリヌクレオチドは比較的短いものであるため、プラスミドを用いる方法が好ましい。

[0044] 組換え発現に用いる発現ベクターの具体的な種類は特に限定されず、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、本発明に係るポリヌクレオチドを発現させるために適当なプロモータ配列等を選択し、これと本発明に係るポリヌクレオチドとを各種プラスミド等に組み込んで発現ベクターを構築すればよい。

[0045] 発現ベクターは、使用される宿主細胞の種類に応じて、少なくとも1つの選択マーカーを含んでいてもよい。このようなマーカーとしては、宿主細胞が原核細胞の場合は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、および蛍光／発光タンパク質をコードする遺伝子等、が挙げられる。

[0046] 〔３．本発明に係る細胞〕

本発明に係る細胞には、上述の本発明に係るポリヌクレオチドまたは本発明に係るベクターが発現可能に導入されている。

[0047] 上記の細胞の調製に用いる宿主細胞は、特に限定されないが、例えば、原核細胞（例えば、大腸菌）、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞から選択される何れかが挙げられる。これら宿主細胞のための適切な培養培地および培養条件は当分野で周知である。

[0048] 本発明に係る上記ポリヌクレオチド、または上記発現ベクターを宿主細胞等に導入する方法、すなわち形質転換法も特に限定されるものではなく、PEG法、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、パーティクルガン法、およびアグロバクテリウム法（植物細胞に限る）等の従来公知の方法を好適に用いることができる。また、例えば、本発明に係るポリペプチドを昆虫で転移発現させる場合には、バキュロウイルスを用いた発現系を用いればよい。

[0049] 〔４．本発明に係るポリペプチドの用途の例示〕

（ＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化剤、およびその具体的用途）

本発明に係るＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化剤の一態様では、本発明に係る少なくとも一種のポリペプチドを有効成分（ＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化成分）として含んでいる。本発明に係るＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化剤は、必要に応じて、当該ポリペプチドを安定化させる安定化剤、酸化防止剤、および／またはアジュバンド等を含んだ組成物であってもよい。本発明に係るＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化剤は、ＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化を増強する目的で、本発明に係るポリペプチド以外の他のＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化成分をさらに含んだ組成物であってもよい。

[0050] 本発明に係るＣＤ４陽性Ｔ細胞活性化剤は、特にウシ、コブウシ、および／またはスイギュウのＣＤ４陽性Ｔ細胞を活性化させる。好ましくは、ウシおよび／またはスイギュウのＣＤ４陽性Ｔ細胞を活性化させる。より好ましくは、ウシのＣＤ４陽性Ｔ細胞を活性化させる。なお、ウシ、コブウシ、お

よび／またはスイギュウ以外の動物のCD4陽性T細胞を活性化させ得る。そのような動物としては、例えば、マウス、ヒツジ、ヤギ、ブタ、霊長類、およびヒト等が挙げられる。

[0051] 本発明に係るCD4陽性T細胞活性化剤は、抗原提示細胞のMHCクラスIIに結合し、CD4陽性T細胞を活性化することが好ましい。抗原提示細胞のMHCクラスIIの型（ハプロタイプ）については、上述のとおりである。

[0052] CD4陽性T細胞活性化剤の効果としてより具体的には、インビボまたはインビトロにおいて、CD4陽性T細胞をTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞へ分化させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞を増殖させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞に種々のサイトカインを産生させること、ならびに分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞が免疫応答を制御すること等が挙げられ、より好ましくは、インビボまたはインビトロにおいて、CD4陽性T細胞をTh1細胞へ分化させること、分化したTh1細胞を増殖させること、分化したTh1細胞に種々のサイトカインを産生させること、およびその結果として細胞性免疫を活性化すること等が挙げられる。

[0053] 本発明に係るCD4陽性T細胞活性化剤は、例えば、牛白血病発症に対して感受性を有する個体において特異的に効果を示すものであることが好ましく、DRB3*1601型のMHCクラスIIを有する個体において特異的に効果を示すものであることがより好ましい場合がある。あるいは、牛白血病発症に対して感受性を有する個体だけでなく、牛白血病発症に対して抵抗性を有する個体（例えば、DRB3*0701型、DRB3*14011型、およびDRB3*1101型等のMHCクラスIIを有する個体）、および／または抵抗性・感受性の何れも有さない個体（例えば、DRB3*1501型、DRB3*2703型、およびDRB3*0503型等のMHCクラスIIを有する個体）においても幅広く効果を示すものであることが好ましい場合がある。

ある。

[0054] 本発明に係るCD4陽性T細胞活性化剤のより具体的な用途は特に限定されないが、例えば、牛白血病ウイルス（BLV）への感染を予防するため、牛白血病の発症を抑制するため、牛白血病の進行を遅らせるため、または牛白血病の症状を低減するために用いられ、その形態は例えばワクチンまたは治療薬等の材料であり得る。適用しうる動物個体としては、ウシ、コブウシ、スイギュウ、ヒツジ、およびヤギ等が挙げられる。また、本発明に係るCD4陽性T細胞活性化剤は、研究用試薬として利用することもできる。

[0055] 本発明に係るポリペプチド（例えば、CD4陽性T細胞活性化剤）をインビボで用いる場合、動物個体に対して、経口投与、静脈内もしくは動脈内への血管内投与、または腸内投与等の手法によって全身投与してもよいし、経皮投与、または舌下投与等の手法によって局所投与してもよい。経口投与の場合、CD4陽性T細胞活性化剤を含んでいる飼料として投与することができる。動物個体は牛白血病ウイルス（BLV）に感染しているものであってもよいし、感染していないものであってもよい。

[0056] CD4陽性T細胞活性化剤の別の態様では、DNAワクチンまたはベクターワクチンの形態とすることもできる。DNAワクチンの形態であるCD4陽性T細胞活性化剤は、本発明に係るポリヌクレオチドを含んでいる。また、ベクターワクチンの形態であるCD4陽性T細胞活性化剤は、本発明に係るベクターを含んでいる。これらのCD4陽性T細胞活性化剤では、当該CD4陽性T細胞活性化剤が適用された細胞または動物個体において本発明に係るポリペプチドが産生され、上述の効果を発揮する。

[0057] （CD4陽性T細胞の活性化方法）

本発明はまたCD4陽性T細胞の活性化方法を提供する。当該活性化方法は、活性化の対象となるCD4陽性T細胞に、本発明に係るポリペプチドを接触させることによって、当該CD4陽性T細胞を活性化させる。すなわち、当該活性化方法の一態様は、活性化の対象となるCD4陽性T細胞に、本発明に係るポリペプチドを接触させる工程を含んでいる。「接触」は、イン

ビボで行ってもよいし、インビトロで行ってもよい。対象となる動物としては、ウシ、コブウシ、および／またはスイギュウの他、マウス、ヒツジ、ヤギ、ブタ、霊長類、およびヒト等が挙げられる。

[0058] なお、「ポリペプチドを接触させる」とは、ポリペプチドを直接CD4陽性T細胞に接触させること、および、ポリペプチドを抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ／単球、またはB細胞等）のMHCクラスIIと結合させた状態でCD4陽性T細胞に接触させることを包含する。なお、「接触」は、ポリペプチドの少なくとも一部におけるものであってもよい。また、「活性化」とは、インビボまたはインビトロにおいて、CD4陽性T細胞をTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞へ分化させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞を増殖させること、分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞に種々のサイトカインを産生させること、ならびに分化したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞および／またはTreg細胞が免疫応答を制御すること等を指し、より好ましくは、インビボまたはインビトロにおいて、CD4陽性T細胞をTh1細胞へ分化させること、分化したTh1細胞を増殖させること、分化したTh1細胞に種々のサイトカインを産生させること、およびその結果として細胞性免疫を活性化すること等を指す。なお、CD4陽性T細胞が活性化したか否かは、例えば、増殖速度、サイトカインの産生量、または細胞表面に発現している分子の種類等を指標にして判断することができる。

[0059] また、CD4陽性T細胞の活性化方法の別の態様は、本発明に係るポリペプチドまたはベクターを動物個体に投与する工程を含む、動物個体におけるCD4陽性T細胞を活性化する方法である。適用しうる動物個体および投与方法は、上述のとおりである。

[0060] （牛白血病の予防または治療のための薬剤）

本発明はまた牛白血病の予防または治療のための薬剤を提供する。本発明に係る薬剤は、本発明に係る少なくとも一種のポリペプチドまたはベクター

を含んでいる。当該ポリペプチドまたは当該ベクターから発現されるポリペプチドが有効成分として働く。

[0061] 本発明に係る薬剤は、一実施形態において、治療を目的として、牛白血病に罹患した個体に対して投与される。「治療」の一側面には、牛白血病に関連する少なくとも1つの症状について軽減もしくは緩和すること、進行を遅延すること、および治癒すること等が包含される。また、本発明に係る薬剤は、別の実施形態において、予防を目的として牛白血病に罹患していない個体に対して投与される。「予防」の一側面には、牛白血病ウイルス（BLV）への感染を防止すること、および牛白血病ウイルス（BLV）に感染した際の発症を防止すること等が包含される。

[0062] 本発明に係る薬剤では、CD4陽性T細胞の活性化によって、牛白血病の予防または治療が達成される。

[0063] （その他の応用）

本発明に係るポリペプチドによるワクチンの開発は、牛白血病ウイルス（BLV）と類似性の高い成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）に対するワクチンの開発に、有用な情報を与える。

[0064] [5. まとめ]

本願発明者らは、後述の実施例に示すように、発症感受性のMHCクラスII（DRB3*1601型）をホモに有するウシの免疫細胞を用いて、BLVのCD4陽性T細胞エピトープマッピングを行った。さらに、発症感受性および発症抵抗性ではないMHCクラスIIを有するウシの免疫細胞を用いて、BLVのCD4陽性T細胞エピトープマッピングを行った。その結果、CD4陽性T細胞エピトープとなるペプチドを同定した。

[0065] 本発明はすなわち、以下の（1）～（15）を包含する。

[0066] （1）以下の（a）～（h）の何れかに示すポリペプチド：

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列における連続する11個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、22番目～31番目のアミノ酸（FSISIDQILE）を含むポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目～50 番目のアミノ酸 (GHWARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド

(c) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、41 番目～60 番目のアミノ酸 (KNYIHWFHKT QKKPWTFTSG) を含むポリペプチド

(d) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、52 番目～71 番目のアミノ酸 (THYNLLNVA SVVAQNRRL D) を含むポリペプチド

(e) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、131 番目～150 番目のアミノ酸 (VRETIHSVLS LFLALFLLF) を含むポリペプチド

(f) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、141 番目～160 番目のアミノ酸 (VTHPVLGKVL ILNQMANFSL) を含むポリペプチド

(g) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、151 番目～170 番目のアミノ酸 (ILNQMANFSL LPSFDTLLVD) を含むポリペプチド

(h) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、181 番目～200 番目のアミノ酸 (TRGAIRYLST LLTLCPATCI) を含むポリペプチド。

[0067] (2) 以下の (a) または (b) に示す上記 (1) に記載のポリペプチド:

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列における連続する 11 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、22 番目～31 番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含むポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 50 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目～50 番目のアミノ酸 (GHWARDC

PTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド。

[0068] (3) 以下の (a 1) ~ (h 1) の何れかに示す上記 (1) に記載のポリペプチド:

(a 1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列における連続する 18 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、22 番目~31 番目のアミノ酸 (FSI SIDQIL E) を含むポリペプチド

(b 1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目~50 番目のアミノ酸 (GHW ARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド

(c 1) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、41 番目~60 番目のアミノ酸 (KNY IHWFHKT QKKPWTFTSG) を含むポリペプチド

(d 1) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、52 番目~71 番目のアミノ酸 (THY NLLNVA SVVAQNRRL D) を含むポリペプチド

(e 1) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、131 番目~150 番目のアミノ酸 (VRETIHSVLS LFLALFLLF) を含むポリペプチド

(f 1) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、141 番目~160 番目のアミノ酸 (VTHPVLGKVL ILNQMANFSL) を含むポリペプチド

(g 1) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、151 番目~170 番目のアミノ酸 (ILNQMANFSL LPSFDTLVD) を含むポリペプチド

(h 1) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、181 番目~200 番目のアミノ酸 (TRGAIRYLST LLTLCPATCI) を含むポリペプチド。

[0069] (4) 以下の (a 1) または (b 1) に示す上記 (3) に記載のポリペ

プチド：

(a 1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列における連続する 18 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、22 番目～31 番目のアミノ酸 (FSI SIDQIL E) を含むポリペプチド

(b 1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目～50 番目のアミノ酸 (GHW ARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド。

[0070] (5) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における連続する 11 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、11 番目～20 番目のアミノ酸 (FSISI DQIL E) を含む上記 (1) ～ (4) の何れかに記載のポリペプチド。

[0071] (6) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸 (QEA KFSISIDQIL EAHNQSP) を含む上記 (5) に記載のポリペプチド。

[0072] (7) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸からなる上記 (5) または (6) に記載のポリペプチド。

[0073] (8) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 31 番目～50 番目のアミノ酸からなる上記 (1) ～ (4) の何れかに記載のポリペプチド。

[0074] (9) 以下の (c 2) ～ (h 2) の何れかに示す上記 (1) または (3) に記載のポリペプチド：

(c 2) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列における 41 番目～60 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(d 2) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 52 番目～71 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(e 2) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 131 番目～150 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(f 2) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 141 番目～160 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(g 2) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における 151 番目～170 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(h2) 配列番号10に示すアミノ酸配列における181番目～200番目のアミノ酸からなるポリペプチド。

[0075] (10) 上記(1)から(9)の何れかに記載のポリペプチドにおいて、1もしくは2個のアミノ酸が置換もしくは付加されてなる、および／または、末端側に位置する1もしくは2個のアミノ酸が欠失されてなり、ウシ、コブウシ、および／またはスイギュウのCD4陽性T細胞エピトープとなるポリペプチド。

[0076] (11) 上記(1)から(10)の何れかに記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

[0077] (12) 上記(11)に記載のポリヌクレオチドを含んでいるベクター。

[0078] (13) 上記(11)に記載のポリヌクレオチド、または上記(12)に記載のベクターが発現可能に導入されている細胞。

[0079] (14) 上記(1)から(10)の何れかに記載のポリペプチドを有効成分として含んでいるCD4陽性T細胞活性化剤。

[0080] (15) 上記(1)から(10)の何れかに記載のポリペプチドまたは上記(12)に記載のベクターを含んでいる牛白血病の予防または治療のための薬剤。

[0081] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0082] BLVを構成する主要なタンパク質のうち、Gag領域由来のp15、p24、p12およびEnv由来のgp51、gp30について、計121種

類のオーバーラッピングペプチドを作製し、BLVに感染した発症感受性牛由来の細胞をもちいて、CD4陽性T細胞エピトープマッピングを行った（図1）。

[0083] 〔実施例1：BLVのGag領域におけるCD4陽性T細胞エピトープの探索〕

（10アミノ酸オーバーラッピングペプチドの作製）

BLVのGag領域にあるp15、p24、およびp12のペプチドについて、10アミノ酸オーバーラッピングペプチド（抗原候補ペプチド）を化学合成し、CD4陽性T細胞エピトープとなるペプチドを探索した。抗原候補ペプチドはシグマジェノシス社の受託ペプチド合成によって合成した。

[0084] p15のアミノ酸配列は配列番号6に示すとおりである。p24のアミノ酸配列は配列番号7に示すとおりである。p12のアミノ酸配列は配列番号2に示すとおりである。また、各抗原候補ペプチドのアミノ酸配列は、図2～4に示すとおりである。すなわち、p15-1～p15-10は、それぞれ、配列番号6に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～119番目からなる。p24-1～p24-21は、それぞれ、配列番号7に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～110番目、101～120番目、111～130番目、121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目、201～215番目からなる。p12-1～p12-6は、それぞれ、配列番号2に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～69番目からなる。

[0085] （BLV感染感受性牛の選択および細胞の調製）

BLV感染牛を、BLV-C o C o M o - q P C R（文献：Jimba M et al., BMC veterinary research 2012, 8(1):167.等参照）、BLV-ELISA（チッソ株式会社）およびBLVプロウイルスのNested PCR法（文献：Tajima S et al., J Virol 2003, 77(3):1894-1903.参照）を用いて検索した。

[0086] 複数のBLV感受性牛（供給元：畜産草地研究所）について、ウシMHC（B o L A）クラスII DRB3遺伝子の遺伝子型を、B o L A-DRB3 PCR-SBT法（文献：Takeshima SN et al., Tissue Antigens 2011.参照）を用いてタイピングした。そのなかから、B o L A-DRB3のアリルがDRB3*1601のホモ型であるものを、BLV感染感受性牛として実験用を選択した（当該牛を以下「PL10」という）。

[0087] PL10から血液1Lを採血した。50mLチューブに10mLの60%パーコールを入れ、血液を40mLずつ重層した。これを、2000×g、25分間、室温、ブレーキなしで遠心し、中間層であるリンパ球層を回収した。2mM EDTA/RPMIで2回洗浄後、1mL MACSバッファに再懸濁し、20μLの1mg/mL ILA11A（anti-bovine CD4 monoclonal antibody, VMRD Inc,）で抗体を反応させた。MACSバッファで3回洗浄後、MACS mouse-IgG-beads（Miltenyi Biotec）300μL+MACSバッファ 1.2mLで4℃、15分間インキュベートした。MACSバッファで1回洗浄後、3mL MACSバッファで平衡化したLSカラム（Miltenyi Biotec）に上記細胞を添加し、MACS用磁石でCD4陽性細胞とCD4陰性細胞とを分離した。10% DMSO/FCSに懸濁し、-150℃で保存した。CD4陰性細胞にX線照射装置で60Gy照射し、細胞増殖を停止させてAPCとした。

[0088] （細胞増殖試験）

CD4陽性細胞（ 0.5×10^6 個）、CD4陰性細胞（ 0.5×10^6 個）、および各種抗原候補ペプチド（ $100 \mu\text{g/mL}$ ）を混合し、 $200 \mu\text{L}$ を96ウェルプレートで3日間培養した。また、抗原ペプチドなしのもの

(Cont.)、G S T融合ペプチドとして大腸菌で発現・精製した p 1 2 を混合したもの、およびG S T融合ペプチドとして大腸菌で発現・精製した p 1 5 を混合したものを比較として用いた。培養終了 1 6 時間前に $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-TdR / $50 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加した。培養終了後、培養液ごとに細胞をフィルターに回収した。次いで、蒸留水で8回フィルターを洗浄し、バイアルに回収した。5 mL 液シン溶液を添加し、液シンカウンターで細胞数をカウントした。

[0089] その結果を図5に示す。調べた抗原候補ペプチドのうち、p 1 2 - 4 および p 1 5 - 1 が特に細胞増殖が大きかった。

[0090] (ペプチド刺激による T h 1 細胞の活性化能)

細胞増殖が大きかった p 1 2 - 4 および p 1 5 - 1 について、T h 1 細胞への誘導能を調べた。

[0091] <培養上清中の I F N γ 濃度の測定>

P L 1 O より採取した血液から、P B M C を分離し、次いで抗ウシ C D 4 モノクローナル抗体 (I L A 1 1 A) を用いて磁気ビーズ法によって C D 4 陽性細胞と C D 4 陰性細胞とに分画した。6 0 G y の X 線照射によって増殖を停止させた C D 4 陰性細胞を 2×10^5 個、C D 4 陽性細胞を同じく 2×10^5 個、そして、p 1 2 - 4 ペプチド抗原 (終濃度 $50 \mu\text{M}$) または p 1 5 - 1 ペプチド抗原 (終濃度 $50 \mu\text{M}$) を 4 8 ウェル培養プレートで混合し、0 . 5 mL として 1 週間培養した。また、抗原を添加していないものを比較として用意した。培養上清のウシ I F N γ 濃度は、ELISA for Bovine Interferon- γ キット (MABTECH 社, Product Code: 3115-1H-20) を用いて測定した。

[0092] < I F N γ 産生 C D 4 陽性細胞数の測定>

P L 1 O より採取した血液から、P B M C を分離し、次いで抗ウシ C D 4 モノクローナル抗体 (I L A 1 1 A) を用いて磁気ビーズ法によって C D 4 陽性細胞と C D 4 陰性細胞とに分画した。6 0 G y の X 線照射によって増殖を停止させた C D 4 陰性細胞を 2×10^5 個、C D 4 陽性細胞を同じく 2×10^5 個、そして、p 1 2 - 4 ペプチド抗原 (終濃度 $50 \mu\text{M}$) または p 1 5 -

1 ペプチド抗原（終濃度 50 μ M）を抗 IFN γ 固相化 PVDF フィルタープレート上で混合し、0.2 mL として 36 時間培養した。また、抗原を添加していないものを比較として用意した。その後細胞を洗い流し、ビオチン化されたウシ IFN γ モノクローナル抗体でキャプチャーされた IFN γ 抗原と反応させ、続いてアビジン-HRP によってビオチン化抗体に HRP を結合させ、TMB によって標識して、そのスポット数をカウントすることによって、IFN γ 産生細胞数を測定した。各試薬の反応時間、反応条件、および使用するモノクローナル抗体は ELISPOT for Bovine Interferon- γ キット（MABTECH 社, Product Code: 3119-2H）に準じて行った。

[0093] 結果を図 6 に示す。図 6 の（a）は、培養上清中の IFN γ の濃度の結果を示している。また、図 6 の（b）は、IFN γ 産生 CD4 陽性細胞数の結果を示している。この結果から、p12-4 は、CD4 陽性細胞を Th1 細胞へ分化させる能力、および Th1 細胞の IFN γ 産生を刺激する能力が共に高いことがわかった。

[0094] 〔実施例 2：BLV の Env 領域における CD4 陽性 T 細胞エпитオプの探索〕

（10 アミノ酸オーバーラッピングペプチドの作製）

BLV の Env 領域にある gp30、および gp51 のペプチドについて、10 アミノ酸オーバーラッピングペプチド（抗原候補ペプチド）を化学合成し、CD4 陽性 T 細胞エпитオプとなるペプチドを探索した。抗原候補ペプチドはシグマジェノシス社の受託ペプチド合成によって合成した。

[0095] gp30 のアミノ酸配列は配列番号 8 に示すとおりである。gp51 のアミノ酸配列は配列番号 9 に示すとおりである。また、各抗原候補ペプチドのアミノ酸配列は、図 7 および図 8 に示すとおりである。すなわち、gp30-1 ~ gp30-20 は、それぞれ、配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 1 ~ 20 番目、11 ~ 30 番目、21 ~ 40 番目、31 ~ 50 番目、41 ~ 60 番目、51 ~ 70 番目、61 ~ 80 番目、71 ~ 90 番目、81 ~ 100 番目、91 ~ 110 番目、101 ~ 120 番目、111 ~ 130 番目、

121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目からなる。また、gp30-21は、配列番号8に示すアミノ酸配列における195～210番目のアミノ酸の後ろに配列「RPCP」を付加したものである。gp51-1～gp51-25は、それぞれ、配列番号9に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～110番目、101～120番目、111～130番目、121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目、201～220番目、211～230番目、221～240番目、231～250番目、241～260番目からなる。また、gp51-26は、配列番号9に示すアミノ酸配列における251～268番目のアミノ酸の後ろに配列「SD」を付加したものである。また、gp51-27(n)は、配列番号9に示すアミノ酸配列における262～268番目のアミノ酸の後ろに配列「SDAPPTRVR RSDS」を付加したものである。

[0096] (BLV感染感受性牛の選択および細胞の調製)

BLV感染牛を、BLV-CoCoMo-qPCR、BLV-ELISAおよびBLVプロウイルスのNested PCR法を用いて検索した。

[0097] 複数のBLV感受性牛について、ウシMHC(BOLA)クラスII DRB3遺伝子の遺伝子型を、BOLA-DRB3 PCR-SBT法を用いてタイピングした。そのなかから、BOLA-DRB3のアリルがDRB3*1601のホモ型であるものを、BLV感染感受性牛として実験用を選択した(当該牛を以下「Ns920」という)。

[0098] Ns920からヘパリン血液100mLおよびと血清用プレーン管10mLを採血した。15mLチューブに4mLの60%パーコールを入れ、2mMEDTA/RPMIで2倍に希釈したヘパリン血液を10mLずつ重層し

た。これを、 $1600 \times g$ 、25分間、室温、ブレーキなしで遠心し、中間層であるリンパ球層を回収した。2 mM EDTA/RPMIで2回洗浄後、1 mL MACSバッファに再懸濁し、 $20 \mu\text{L}$ の 1 mg/mL ILA11A (anti-bovine CD4 monoclonal antibody, VMRD Inc,) で抗体を反応させた。MACSバッファで3回洗浄後、MACS mouse-IgG-beads (Miltenyi Biotec) $200 \mu\text{L}$ + MACSバッファ $800 \mu\text{L}$ で 4°C 、15分間インキュベートした。MACSバッファで1回洗浄後、3 mL MACSバッファで平衡化したLSカラム (Miltenyi Biotec) に上記細胞を添加し、MACS用磁石でCD4陽性細胞とCD4陰性細胞とを分離した。10% DMSO/FCSに懸濁し、 -150°C で保存した。CD4陰性細胞にX線照射装置で 60 Gy 照射し、細胞増殖を停止させてAPCとした。

[0099] (長期培養によるCD4陽性細胞の作製)

まず、CD4陽性細胞 (2×10^6 個)、CD4陰性細胞 (2×10^6 個)、 1 ng/mL ウシIL-2およびBLV抗原を混合し、1週間培養した (初期培養)。次いで、細胞を回収してHBSSで洗浄した後、6 mL 培養液/ 25 cm フラスコに懸濁し、凍結CD4陰性細胞 (3×10^7 個) および 1 ng/mL ウシIL-2を添加して、12日間培養した (BLV抗原なしの休止培養)。次いで、細胞を回収した後、6 mL 培養液/ 25 cm フラスコに懸濁し、凍結CD4陰性細胞 (1.2×10^7 個) および 1 ng/mL ウシIL-2を添加して、2週間培養した (刺激培養)。そして、CD4陽性細胞を回収した。なお、上述のBLV抗原は、BLVを発現するコウモリ由来細胞Bat/BLVを 15 cm dish で培養した上清を回収し、凍結融解を5回行ってBLVを失活させたもの (Bat/BLVsup) を培地に $1/20$ 量で添加した。

[0100] (細胞増殖試験)

回収した長期培養によるCD4陽性細胞 (5×10^4 個)、CD4陰性細胞 (2×10^5 個)、および各種抗原候補ペプチド ($100 \mu\text{g/mL}$) を混合し、 $200 \mu\text{L}$ を96ウェルプレートで3日間培養した。また、既知のCD

4 エピトープ p e p 6 1、既知の C D 4 エピトープ p e p 9 8、p 1 2-4 を含むペプチド（「F I T C-p 1 2-4」）または B a t / B L V s u p を添加したもの、抗原ペプチドなし（「R P M I」）、C D 4 陽性細胞なし（「A P Cのみ」）を比較として用いた。培養終了 1 6 時間前に $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-TdR / $50 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加した。培養終了後、培養液ごとに細胞をフィルターに回収した。次いで、蒸留水で 8 回フィルターを洗浄し、バイアルに回収した。5 mL 液シン溶液を添加し、液シンカウンターで細胞数をカウントした。

[0101] その結果を図 9 に示す。調べた抗原候補ペプチドのうち、g p 5 1-2 および g p 5 1-3 が特に細胞増殖が大きかった。また、既知のエピトープ領域を含む g p 5 1-6 および g p 5 1-1 1 も細胞増殖が大きかった。

[0102] （g p 5 1-2 ~ g p 5 1-6 領域の 1 ~ 3 アミノ酸オーバーラッピングペプチド）

細胞増殖が大きかった g p 5 1-2 ~ g p 5 1-6 領域のポリペプチドについて、1 ~ 3 アミノ酸オーバーラッピングペプチド（抗原候補ペプチド）を化学合成し、C D 4 陽性 T 細胞エピトープとなるペプチドを探索した。抗原候補ペプチドはシグマジェノシス社の受託ペプチド合成によって合成した。各抗原候補ペプチドのアミノ酸配列は、図 1 0 に示すとおりである。

[0103] 回収した長期培養による C D 4 陽性細胞（ 5×10^4 個）、C D 4 陰性細胞（ 2×10^5 個）、および各種抗原候補ペプチド（ $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ または $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）を混合し、 $200 \mu\text{L}$ を 9 6 ウェルプレートで 3 日間培養した。また、B a t / B L V s u p、C D 4 陰性細胞なし（「C D 4」）、および抗原ペプチドなし（「m e d i u m」、「N O a g」）を比較として用いた。培養終了 1 6 時間前に $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-TdR / $50 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加した。培養終了後、培養液ごとに細胞をフィルターに回収した。次いで、蒸留水で 8 回フィルターを洗浄し、バイアルに回収した。5 mL 液シン溶液を添加し、液シンカウンターで細胞数をカウントした。

[0104] その結果を図 1 1 に示す。調べた抗原候補ペプチドのうち、g p 5 1 p 1

2～g p 5 1 p 2 2 が特に細胞増殖が大きかった（図 1 1 の（b））。なかでも、g p 5 1 p 1 8 の細胞増殖が一番大きかった。図 1 1 の（a）に、特に細胞増殖が大きかった g p 5 1 p 1 2～g p 5 1 p 2 2 およびその前後の領域のペプチドのアミノ酸配列を示す。

[0105] 〔実施例 3：B L V の G a g／E n v／p X 領域における C D 4 陽性 T 細胞エピトープの探索〕

B L V を構成する主要なタンパク質のうち、G a g 領域由来の p 1 5、p 2 4、p 1 2、E n v 領域由来の g p 5 1、g p 3 0、p X 領域由来の t a x およびについて、計 1 1 5 種類のオーバーラッピングペプチドを作製し、B L V に感染した 3 頭の発症感受性牛および B L V に感染した 2 頭の中立牛（発症感受性および発症抵抗性の何れも有さない）由来の細胞を用いて、C D 4 陽性 T 細胞エピトープマッピングを行った。

[0106] （1 0 アミノ酸オーバーラッピングペプチドの作製）

B L V の G a g 領域にある p 1 5 から 1 0 種類、p 2 4 から 2 1 種類、および p 1 2 から 6 種類、B L V の E n v 領域にある g p 3 0 から 2 1 種類、g p 5 1 から 2 7 種類、B L V の p X 領域にある t a x から 3 0 種類の 1 0 アミノ酸オーバーラッピングペプチド（抗原候補ペプチド）を化学合成し、C D 4 陽性 T 細胞エピトープとなるペプチドを探索した。抗原候補ペプチドはシグマジェノシス社の受託ペプチド合成によって合成した。

[0107] t a x のアミノ酸配列は配列番号 1 0 に示すとおりである。また、p 1 5、p 2 4、p 1 2、g p 5 1、および g p 3 0 の抗原候補ペプチドのアミノ酸配列は、図 1 2 に示すとおりである。

[0108] すなわち、p 1 5－N 1～p 1 5－N 1 0 は、それぞれ、配列番号 6 に示すアミノ酸配列における 1～2 0 番目、1 1～3 0 番目、2 1～4 0 番目、3 1～5 0 番目、4 1～6 0 番目、5 2～7 1 番目、6 1～8 0 番目、7 1～9 0 番目、8 1～1 0 0 番目、9 1～1 1 9 番目からなる。p 2 4－N 1～p 2 4－N 2 1 は、それぞれ、配列番号 7 に示すアミノ酸配列における 1～2 0 番目、1 1～3 0 番目、2 1～4 0 番目、3 1～5 0 番目、4 1～6

0番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～110番目、101～120番目、111～130番目、121～140番目、132～151番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目、201～215番目からなる。p12-N1～p12-N6は、それぞれ、配列番号2に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～69番目からなる。

[0109] gp30-N1～gp30-N21は、それぞれ、配列番号8に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、52～71番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～110番目、101～120番目、110～129番目、121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目からなる。また、gp30-N21は、配列番号8に示すアミノ酸配列における195～210番目のアミノ酸の後ろに配列「RPCP」を付加したものである。gp51-N1～gp51-N26は、それぞれ、配列番号9に示すアミノ酸配列における1～20番目、12～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、81～100番目、91～110番目、101～120番目、111～130番目、121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、170～189番目、181～200番目、191～210番目、201～220番目、211～230番目、221～240番目、231～250番目、242～261番目、249～268番目からなる。また、gp51-N27は、配列番号9に示すアミノ酸配列における262～268番目のアミノ酸の後ろに配列「SDAPPTRVRRSDS」を付加したものである。

[0110] tax-1～tax-30は、それぞれ、配列番号10に示すアミノ酸配列における1～20番目、11～30番目、21～40番目、31～50番目、41～60番目、51～70番目、61～80番目、71～90番目、82～101番目、91～110番目、101～120番目、111～130番目、121～140番目、131～150番目、141～160番目、151～170番目、161～180番目、171～190番目、181～200番目、191～210番目、201～220番目、211～230番目、221～240番目、231～250番目、241～260番目、251～270番目、261～280番目、271～290番目、281～300番目、291～310番目からなる。

[0111] (BLV感染感受性牛の選択および細胞の調製)

5頭のBLV未感染黒毛和種牛を用意した。S2、S4およびS6の3頭はBOLA-DRB3のアリルがDRB3*1601/*1601の感受性牛、N1およびN2はBOLA-DRB3のアリルがそれぞれDRB3*1501/*2703、およびDRB3*1501/*0503の中立牛（非感受性牛）として試験に用いた。

[0112] まず、BLV感染ホルスタイン種Hol416から血液を採取し、BLV-Cocomo-qPCRによってBLVプロウイルス量を測定した後、 4×10^7 コピー（感受性牛S2、S4、S6）および 3.6×10^7 コピー（非感受性牛N1、N2）のコピー数のBLVプロウイルスを静脈注射にて接種し、感染させた。感染の成立は、BLV-ELISA（チッソ株式会社）およびBLV-Cocomo-qPCRを用いて確認した。

[0113] S2、S4、S6、N1およびN2から血液100mLを採血し、2mM EDTA/RPMIで2倍希釈した。50mLチューブに15mLの血球分離溶液Lymphoprep™（PROGEN Biotechnik GmbH）を入れ、2倍希釈血液を30～35mLずつ重層した。これを、 $2000 \times g$ 、30分間、室温、ブレーキなしで遠心し、中間層であるリンパ球層を回収した。2mM EDTA/RPMIで2回～3回洗浄後、1mL MACSバッ

ファーに再懸濁し、 $20\mu\text{L}$ の $1\text{mg}/\text{mL}$ ILA11A (anti-bovine CD4 monoclonal antibody, VMRD Inc,) で抗体を反応させた。MACSバッファで3回洗浄後、MACS mouse-IgG-beads (Miltenyi Biotec) $200\mu\text{L}$ + MACSバッファ 0.8mL で 4°C 、15分間インキュベートした。MACSバッファで1回洗浄後、 3mL MACSバッファで平衡化したLSカラム (Miltenyi Biotec) に上記細胞を添加し、MACS用磁石でCD4陽性細胞とCD4陰性細胞とを分離した。CD4陰性細胞を $10\%\text{FCS}/\text{RPMI}1640$ 1mL に再懸濁し、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のマイトマイシンCを添加後、 37°C で1時間培養して増殖を停止させた。続いてPBSで5回洗浄しマイトマイシンCを完全に除去したのち $10\%\text{FCS}/\text{RPMI}1640$ に再懸濁し、抗原提示細胞 (APC) とした。

[0114] (細胞増殖試験)

CD4陽性細胞 (1×10^5 個)、CD4陰性細胞 (4×10^5 個)、および各種抗原候補ペプチド (最終濃度 $20\mu\text{M}$) を混合し、 $100\mu\text{L}$ を96ウェルプレートで109時間培養した。また、陰性コントロールとして抗原ペプチドなし (Cont.)、陽性コントロールとしてコンカナバリンA (最終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いた。109時間培養後、細胞増殖/細胞毒性測定用試薬Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) のCCK試薬を $10\mu\text{L}/\text{ウェル}$ で添加し、さらに4時間培養して113時間で培養を終了した。終了後、 450nm の吸光度を測定し、細胞増殖能とした。

[0115] はじめに、5種類ずつの抗原候補ペプチドを混合したペプチドプールを製し (図12)、抗原ペプチドのスクリーニングを行った。その結果を図13および図14に示す。調べた抗原候補ペプチドのうち、感受性牛S2ではペプチドプール9および11が特に細胞増殖が大きかった。感受性牛S4ではペプチドプール1および14が特に細胞増殖が大きかった。感受性牛S6ではペプチドプール9および11が特に細胞増殖が大きかった。非感受性牛N1では特に反応の強いペプチドプールは見られなかった。非感受性牛N2ではペプチドプール3、9、14および21で特に細胞増殖が大きかった。

[0116] 続いて、細胞増殖の大きかったペプチドプールを中心に、ペプチド毎に再度スクリーニングを行った。その結果を図15および図16に示す。感受性牛S2ではペプチドプール9からg p 3 0 - N 6、ペプチドプール11からg p 3 0 - N 1 4、それに追加してg p 5 1 - N 1 1およびt a x - 1 5で細胞増殖が大きかった。感受性牛S4ではペプチドプール1からp 1 5 - N 5、ペプチドプール14からg p 5 1 - N 9、それに追加してg p 3 0 - N 8およびg p 5 1 - N 8で細胞増殖が大きかった。感受性牛S6ではペプチドプール9のペプチドの中ではg p 3 0 - N 4で最も細胞増殖が大きく、ペプチドプール11からはg p 3 0 - N 1 4で細胞増殖が大きかった。非感受性牛N1ではg p 3 0 - N 6およびt a x - 1 9で細胞増殖が大きかった。非感受性牛N2ではペプチドプール3からp 2 4 - N 5、ペプチドプール9からg p 3 0 - N 6、ペプチドプール14からg p 5 1 - N 1 0、そしてペプチドプール21からt a x - 1 6で細胞増殖が大きかった。

[0117] 最後に、細胞増殖誘導能がみられた抗原候補ペプチドについて、ペプチド濃度を0.2 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、および20 μ Mの5点を取って、濃度依存性を確認した。その結果を図17および図18に示す。感受性牛S2のg p 3 0 - N 6、g p 3 0 - N 1 4、g p 5 1 - N 1 1、t a x - 1 5、感受性牛S4のp 1 5 - N 5、g p 5 1 - N 8、g p 5 1 - N 9、感受性牛S6のg p 3 0 - N 1 4、非感受性牛N1のg p 3 0 - N 6、t a x - 1 9、非感受性牛N2のg p 3 0 - N 6およびt a x - 1 6で濃度依存的に細胞増殖能が増加したことから、これらがCD4エピトープとして同定された。一方、S4のg p 3 0 - N 8、S6のg p 3 0 - N 4、N2のp 2 4 - N 5およびg p 5 1 - N 1 0で濃度依存性が認められなかった。

産業上の利用可能性

[0118] 本発明に係るポリペプチド等は、牛白血病ウイルス（BLV）に対するワクチン製造の材料として利用し得る。

[0119] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1]

以下の（a）～（h）の何れかに示すポリペプチド：

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列における連続する11個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、22番目～31番目のアミノ酸（FSISIDQIL E）を含むポリペプチド

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、31番目～50番目のアミノ酸（GHWARDCPTK ATGPPPGPCP）を含むポリペプチド

（c）配列番号6に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、41番目～60番目のアミノ酸（KNYIHWFKT QKKPWFTTSG）を含むポリペプチド

（d）配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、52番目～71番目のアミノ酸（THYNLLNVA SVVAQNRRGL D）を含むポリペプチド

（e）配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、131番目～150番目のアミノ酸（VRETIHSVLS LFLALFLLF）を含むポリペプチド

（f）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、141番目～160番目のアミノ酸（VTHPVLGKVL ILNQMANFSL）を含むポリペプチド

（g）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、151番目～170番目のアミノ酸（ILNQMANFSL LPSFDTLLVD）を含むポリペプチド

（h）配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、181番目～200番目のアミノ酸（TRGAIRYLST LLTLCPATCI）を含むポリペプチド。

[請求項2]

以下の（a）または（b）に示す請求項1に記載のポリペプチド：

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列における連続する11個以上

で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、22番目～31番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含むポリペプチド

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で50個以下のアミノ酸からなり、かつ、31番目～50番目のアミノ酸 (GHWARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド。

[請求項3]

以下の(a1)～(h1)の何れかに示す請求項1に記載のポリペプチド:

(a1) 配列番号1に示すアミノ酸配列における連続する18個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、22番目～31番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含むポリペプチド

(b1) 配列番号2に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、31番目～50番目のアミノ酸 (GHWARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド

(c1) 配列番号6に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、41番目～60番目のアミノ酸 (KNYIHWFKT QKKPWTFTSG) を含むポリペプチド

(d1) 配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、52番目～71番目のアミノ酸 (THYNLLNVA SVVAQNRRGL D) を含むポリペプチド

(e1) 配列番号8に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、131番目～150番目のアミノ酸 (VRETIHSVLS LFLALFLLF) を含むポリペプチド

(f1) 配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、141番目～160番目のアミノ酸 (VTHPVLGKVL ILNQMANFSL) を含むポリペプチド

(g1) 配列番号10に示すアミノ酸配列における連続する20個以上で30個以下のアミノ酸からなり、かつ、151番目～170番目のアミノ酸 (ILNQMANFSL LPSFDTLLVD) を含むポリペプチド

(h 1) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、181 番目～200 番目のアミノ酸 (TRGAIRYLST LLTLCPATCI) を含むポリペプチド。

[請求項4] 以下の (a 1) または (b 1) に示す請求項 3 に記載のポリペプチド：

(a 1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列における連続する 18 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、22 番目～31 番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含むポリペプチド

(b 1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における連続する 20 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、31 番目～50 番目のアミノ酸 (GHWARDCPTK ATGPPPGPCP) を含むポリペプチド。

[請求項5] 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における連続する 11 個以上で 30 個以下のアミノ酸からなり、かつ、11 番目～20 番目のアミノ酸 (FSISIDQIL E) を含む請求項 1～4 の何れか 1 項に記載のポリペプチド。

[請求項6] 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸を含む請求項 5 に記載のポリペプチド。

[請求項7] 配列番号 3 に示すアミノ酸配列における 7 番目～26 番目のアミノ酸からなる請求項 5 または 6 に記載のポリペプチド。

[請求項8] 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 31 番目～50 番目のアミノ酸からなる請求項 1～4 の何れか 1 項に記載のポリペプチド。

[請求項9] 以下の (c 2) ～ (h 2) の何れかに示す請求項 1 または 3 に記載のポリペプチド：

(c 2) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列における 41 番目～60 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(d 2) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 52 番目～71 番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(e 2) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列における 131 番目～15

0番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(f 2) 配列番号10に示すアミノ酸配列における141番目～160番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(g 2) 配列番号10に示すアミノ酸配列における151番目～170番目のアミノ酸からなるポリペプチド

(h 2) 配列番号10に示すアミノ酸配列における181番目～200番目のアミノ酸からなるポリペプチド。

[請求項10] 請求項1～9の何れか1項に記載のポリペプチドにおいて、1もしくは2個のアミノ酸が置換もしくは付加されてなる、および／または、末端側に位置する1もしくは2個のアミノ酸が欠失されてなり、ウシ、コブウシ、および／またはスイギュウのCD4陽性T細胞エピトープとなるポリペプチド。

[請求項11] 請求項1～10の何れか1項に記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

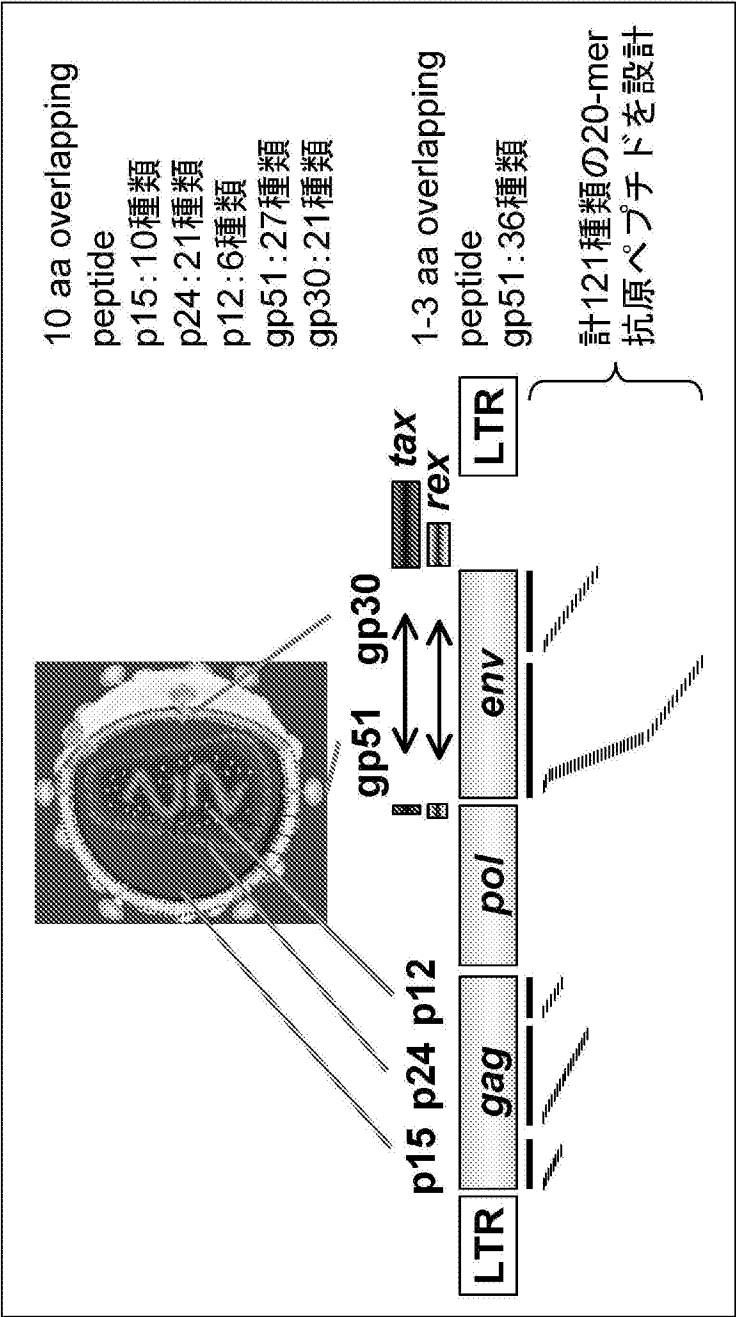
[請求項12] 請求項11に記載のポリヌクレオチドを含んでいるベクター。

[請求項13] 請求項11に記載のポリヌクレオチド、または請求項12に記載のベクターが発現可能に導入されている細胞。

[請求項14] 請求項1～10の何れか1項に記載のポリペプチドを有効成分として含んでいるCD4陽性T細胞活性化剤。

[請求項15] 請求項1～10の何れか1項に記載のポリペプチドまたは請求項12に記載のベクターを含んでいる牛白血病の予防または治療のための薬剤。

[図1]



[図2]

p15

MGNSPSYNPPAGISPSDWLN

p15-1

AGISPSDWLNLVQSAQRINP

p15-2

LVQSAQRINPRPSDFTDL

p15-3

RPSPSDFTDLKNYIHWFKT

p15-4

KNYIHWFKTQKKPWTFISG

p15-5

QKKPWTFISGGPTSCPPGRF

p15-6

GPTSCPPGRFGRVPLVLTAL

p15-7

GRVPLVLTALNEVLSNEGGA

p15-8

NEVLSNEGGA PGASAPEEQP

p15-9

PGASAPEEQPPPYDPPAIL

p15-10

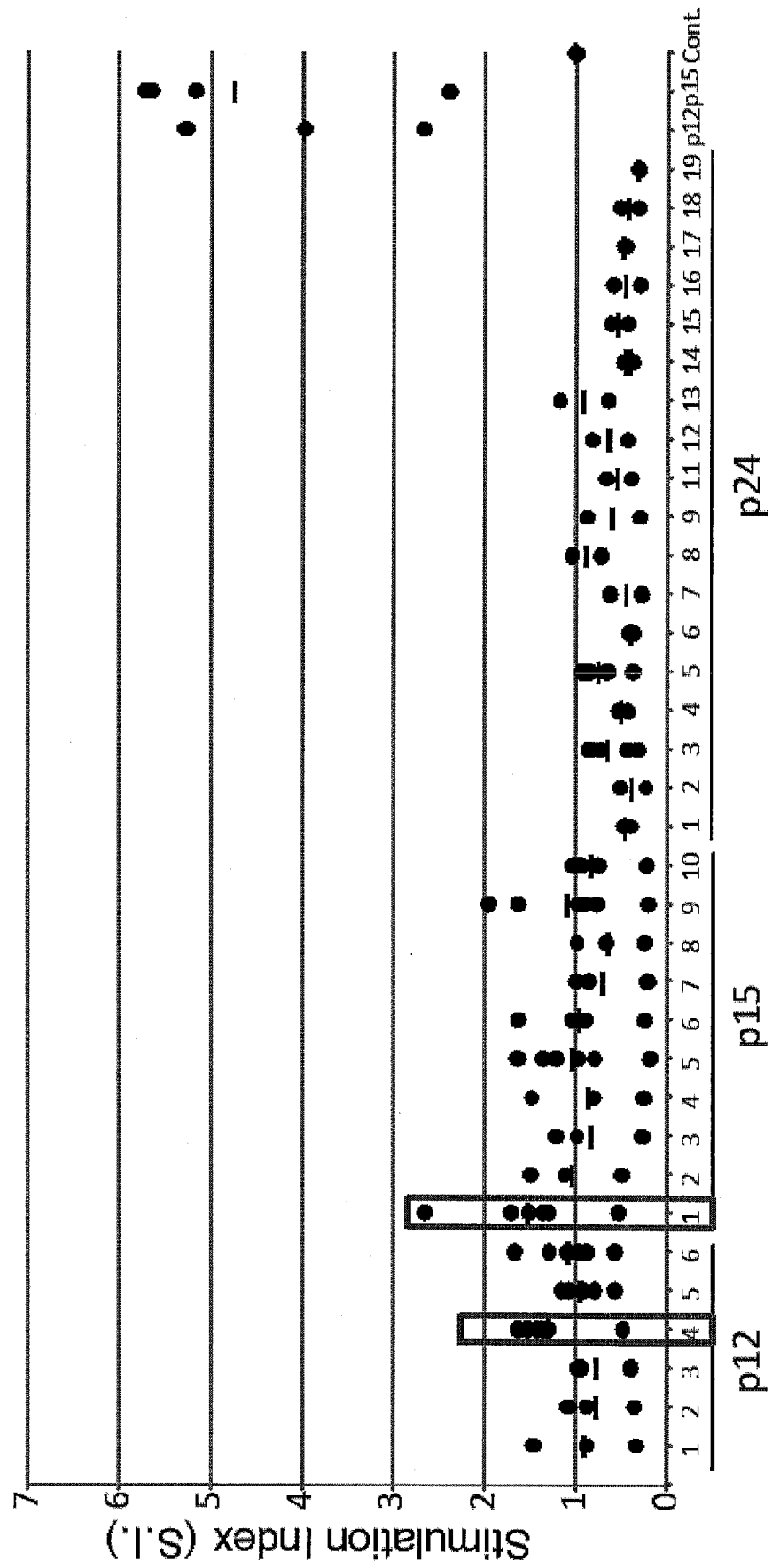
[3]

p24	
p24-1	PIISEGNRRHRAWALRELQ
p24-2	HRAWALRELQDIKKEIENKA
p24-3	DIKKEIENKAPGSQVWIQTIL
p24-4	PGSQVWIQTILRLAILQADPT
p24-5	RLAILQADPTPADLEQLCQY
p24-6	PADLEQLCQYIASPVDQTAH
p24-7	IASPVDQTAHMTSLTAAIAA
p24-8	MTSLTAAIAAAEAANTLQGF
p24-9	AEAANTLQGFNPQNGTLTQQ
p24-10	NPQNGTLTQQSAQPNAGDLR
p24-10	(NPQNGTLTQQSAQPNAGDLR)
p24-11	SAQPNAGDLRSQYQNINLQA
p24-12	SQYQNINLQAWKNLPTRPVS
p24-13	WKNLPTRPVSQPNWSTIVQGP
p24-14	QPNWSTIVQGPASVEFVNR
p24-15	ASVEFVNRQLISLADNLP
p24-16	LQISLADNLPDGVPKPEIID
p24-17	DGVPKPEIIDSLSYANANKE
p24-18	SLSYANANKECQQLQGRGL
p24-19	CQQLQGRGLVAAPVGQKLQ
p24-19	(CQQLQGRGLVAAPVGQKLQ)
p24-20 (n)	VAAPVGQKLQACAHWAPKMK
p24-21 (n)	ACAHWAPKMKQPAILL

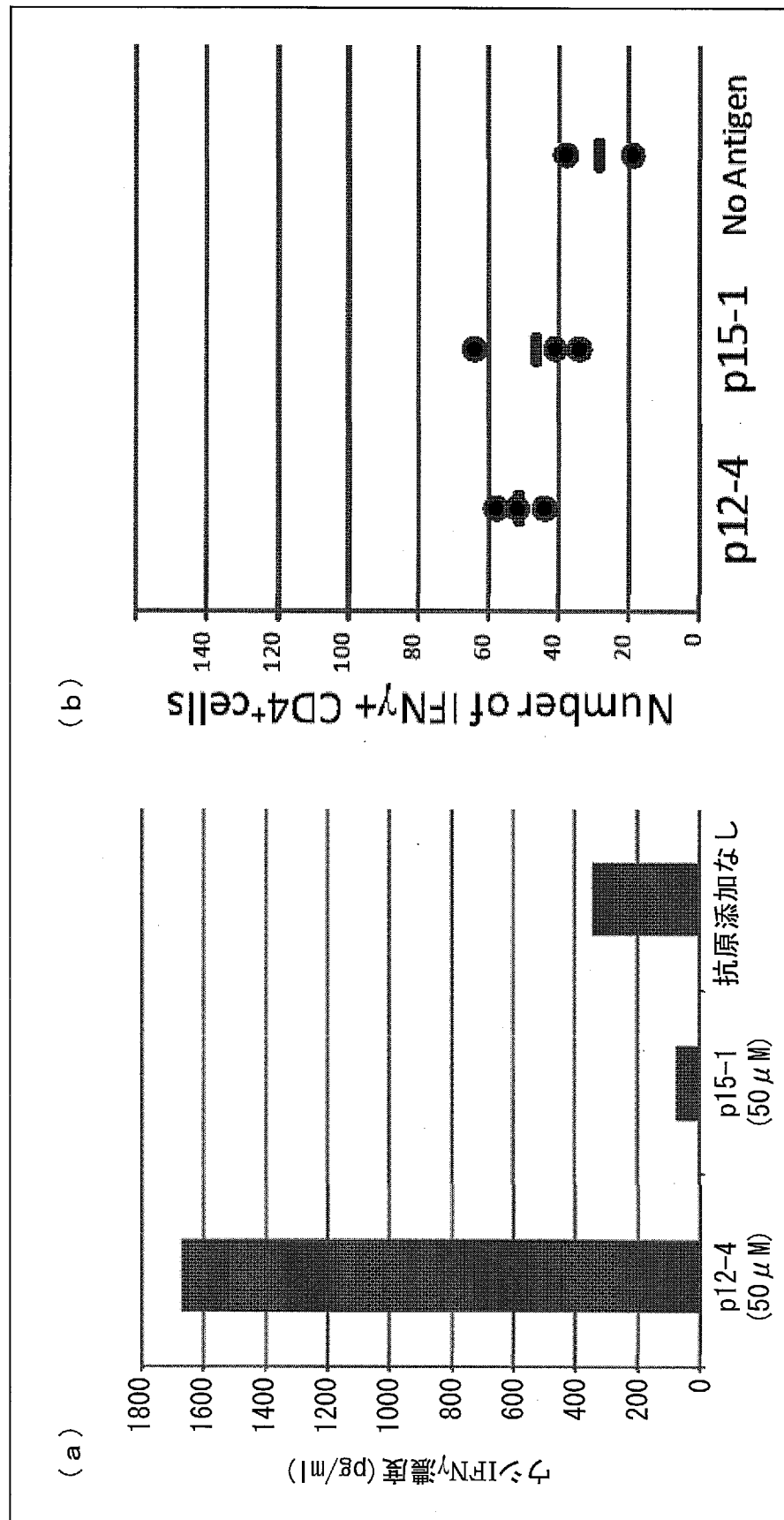
[図4]

p12	
p12-1	VHTPGPKMGPQRQPAKRP
p12-2	PRQPAKRRPPFGFCYRCLKE
p12-3	PGPCYRCLKEGHWARDCTK
p12-4	GHWARDCTKATGPPPGPCP
p12-5	ATGPPPGPCPICKDP SHWR
p12-6	ICKDP SHWRDCPTLKS

[図5]



[図6]



[7]

gp30
gp30-1 SPVAALTIGLALSVGLTGIN
gp30-2 ALSVGLTGINVAVSALSHQR
gp30-3 VAVSALSHQRITSLIHVLEQ
gp30-4 LTSLIHVLEQDQORLITAIN
gp30-5 DQORLITAINQTHYNLLNVA
gp30-6 QTHYNLLNVASVVAQNRRGL
gp30-7 SVVAQNRRGLDWLYIRLGFQ
gp30-8 DWLYIRLGFQSLCPTINEPC
gp30-9 SLCPTINEPCCFRLIQNDSI
gp30-10 CFRLIQNDSIIRLGDLPPLS

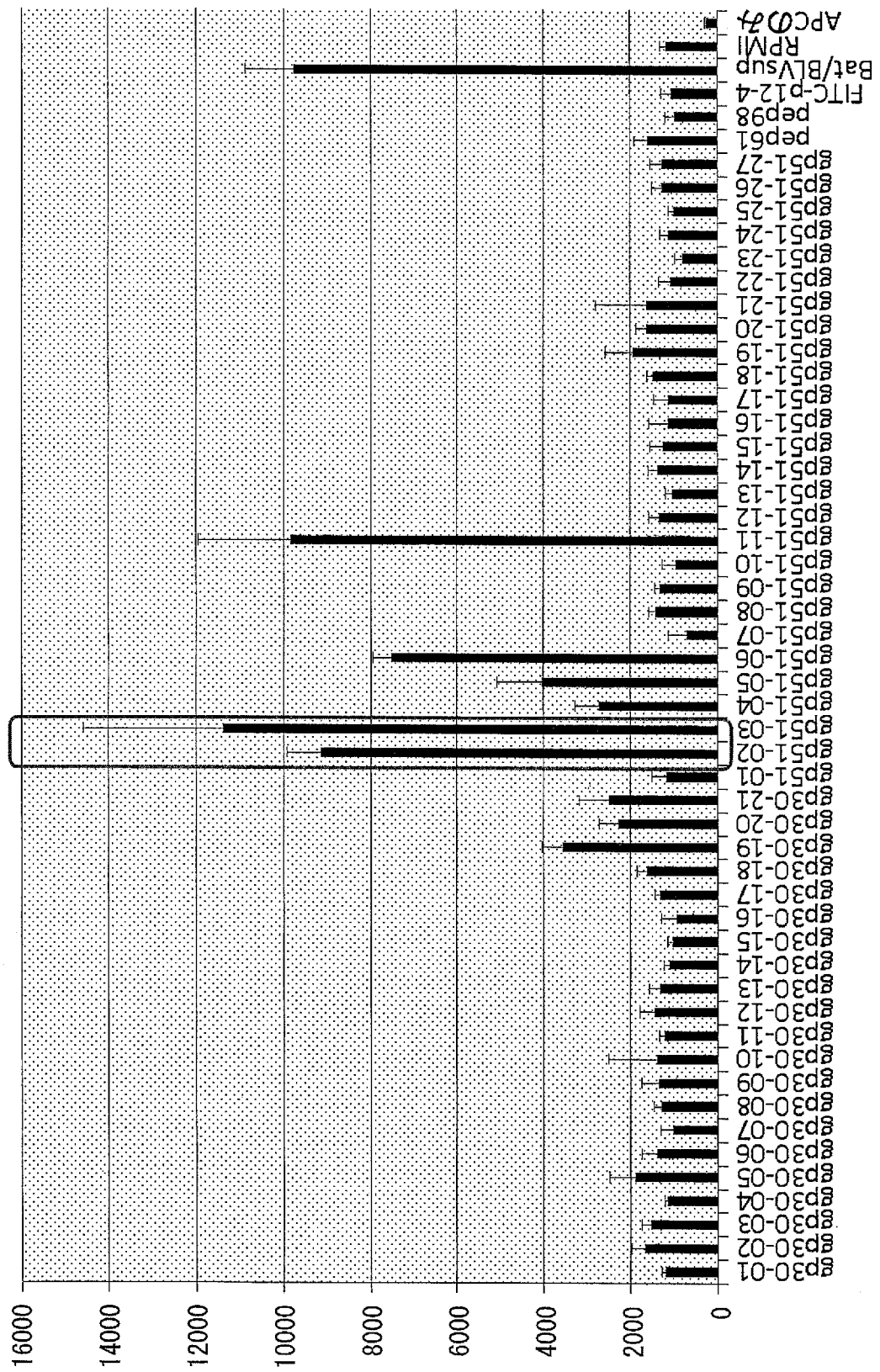
gp30-10 (CFRLIQNDSIIRLGDLPPLS)
gp30-11 IRLGDLPPLSQRVSTDWQWP
gp30-12 QRVSTDWQWPNWDLGLTAW
gp30-13 WNDLGLTAWVRETIHSVLS
gp30-14 VRETIHSVLSLFLALFLF
gp30-15 LFLALFLFLAPCLIKCLT
gp30-16 LAPCLIKCLTSRLKLLRQA
gp30-17 SRLKLLRQAPHFPEISLTP
gp30-18 PHFPEISLTPKPDSDYQALL
gp30-19 KPDSYQALLPSAPEIYSHL

gp30-19 (KPDSYQALLPSAPEIYSHL)
gp30-20 PSAPEIYSHLSPVKPDYINL
gp30-21 EIYSHLSEVKPDYINLRPCP

[8]

gp51	
gp51-1	WRCSLSLGNQNMNTAYNQEAA
gp51-2	QWMTAYNQEAKFSLSIDQIL
gp51-3	KFSISIDQILEAHNQSPFCA
gp51-4	EAHNQSPFCAKSPRYTLDV
gp51-5	KSPRYTLDVNGYPKIYWPP
gp51-6	NGYPKIYWEPFQRRRFGAR
gp51-7	PQRRRFGARAMVTYDCEPR
gp51-8	AMVTYDCEPRCPYVGADRFD
gp51-9	CPYVGADRFDCPHMDNASQA
gp51-10	CPHMDNASQADQGSFYVNHQ
gp51-10	(CPHMDNASQADQGSFYVNHQ)
gp51-11	DQGSFYVNHQILFLHLKQCH
gp51-12	ILFLHLKQCHGIFTLTWEIW
gp51-13	GIFTLTWEIWGYDPLITFSL
gp51-14	GYDPLITFSLHKIPDPQPD
gp51-15	HKIPDPQDPFPQLNSDWVP
gp51-16	FPQLNSDWVPVSRWALLLN
gp51-17	SVRSWALLLNQTARAFPDCA
gp51-18	QTARAFPDCAICWEPSPWA
gp51-19	ICWEPSPWAPILVYNKTI
gp51-19	(ICWEPSPWAPILVYNKTI)
gp51-20	PEILVYNKTISSGPGGLALP
gp51-21	SSSGPGGLALPDAQIFWNTS
gp51-22	DAQIFWNTSSSENTTQGMHH
gp51-23	SENTTQGMHHPSQRLLENVS
gp51-24	PSQRLLENVSQGNALLPPI
gp51-25	QGNALLPPISLVNLSTASS
gp51-26	SLVNLSTASSAPPTRVRRSD
gp51-27 (n)	PPTRVRRSDAPPTRVRRSDS

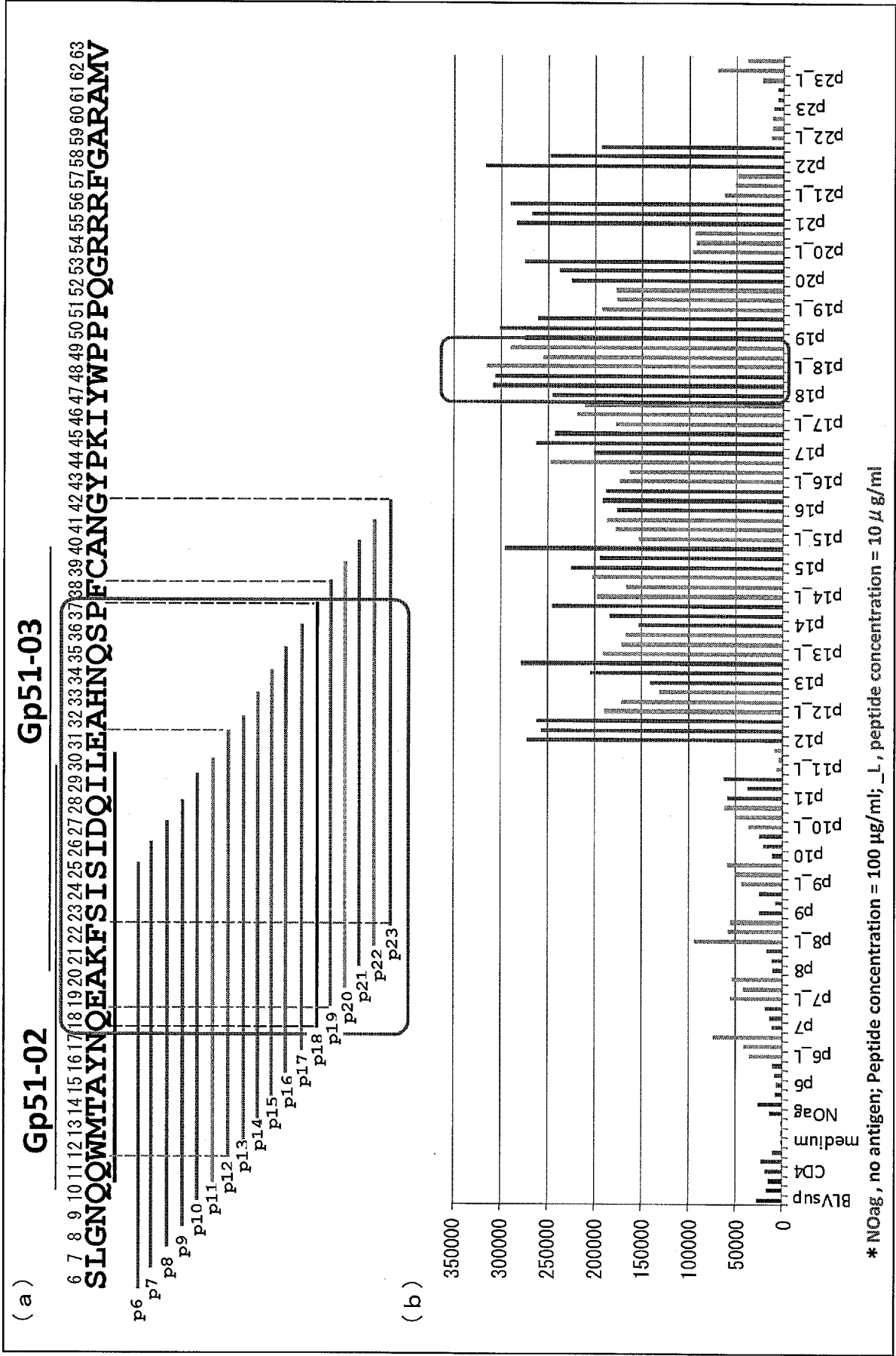
[図9]



[図10]

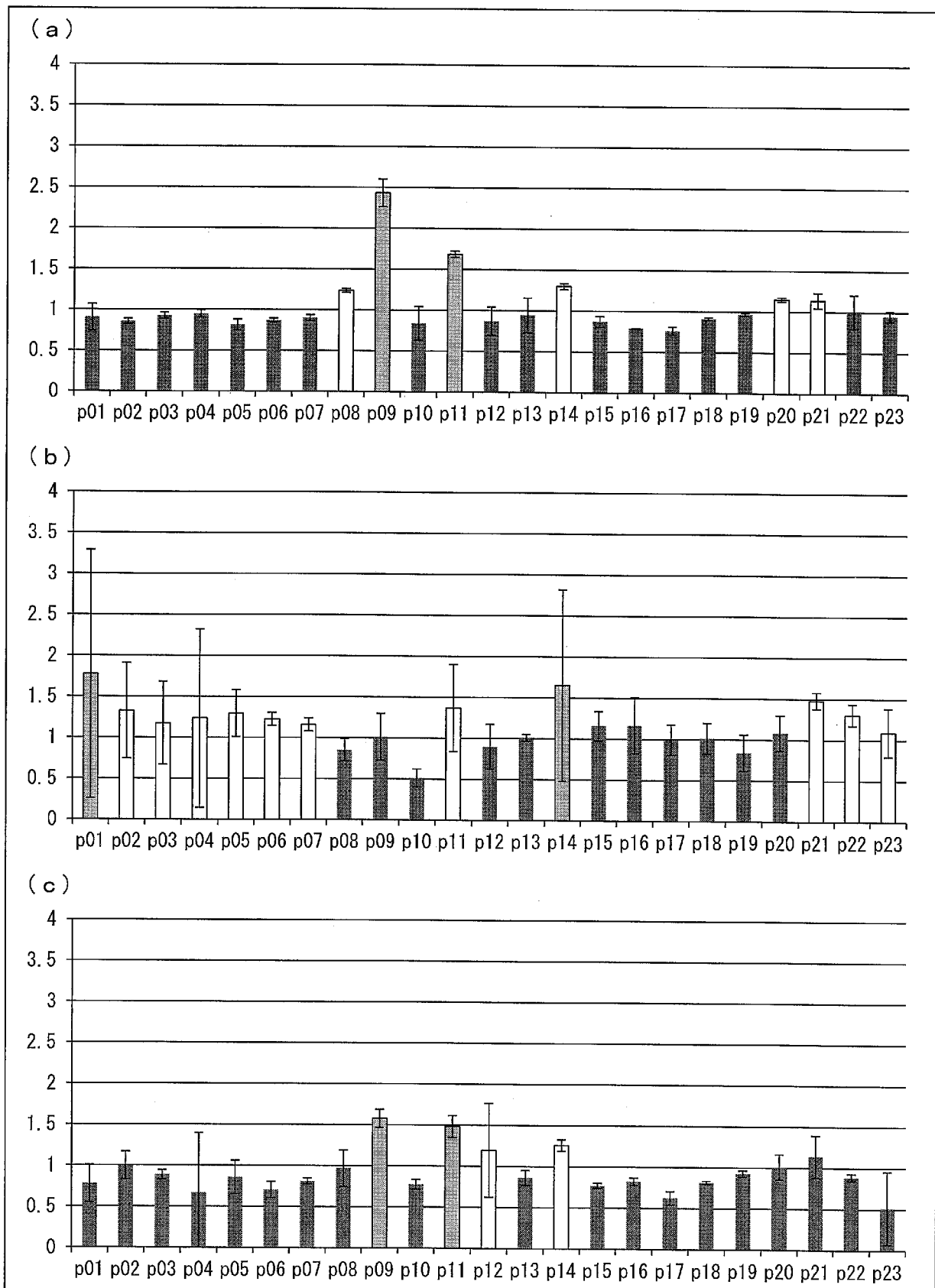
gp51p6	[H]	SLGNQQWMTAYNQEAKFSSIS	[OH]	gp51p24	[H]	ISIDQILEAHNQSPFCAKSP	[OH]
gp51p7	[H]	LGNQQWMTAYNQEAKFSSIS	[OH]	gp51p25	[H]	SIDQILEAHNQSPFCAKSPR	[OH]
gp51p8	[H]	GNQQWMTAYNQEAKFSSISID	[OH]	gp51p26	[H]	IDQILEAHNQSPFCAKSPRY	[OH]
gp51p9	[H]	NQQWMTAYNQEAKFSSISIDQ	[OH]	gp51p27	[H]	DQILEAHNQSPFCAKSPRYT	[OH]
gp51p10	[H]	QQWMTAYNQEAKFSSISIDQI	[OH]	gp51p28	[H]	QILEAHNQSPFCAKSPRYTL	[OH]
gp51p11	[H]	QWMTAYNQEAKFSSISIDQIL	[OH]	gp51p29	[H]	ILEAHNQSPFCAKSPRYTLD	[OH]
gp51p12	[H]	WMTAYNQEAKFSSISIDQILE	[OH]	gp51p30	[H]	LEAHNQSPFCAKSPRYTLD	[OH]
gp51p13	[H]	MTAYNQEAKFSSISIDQILEA	[OH]	gp51p31	[H]	EAHNQSPFCAKSPRYTLD	[OH]
gp51p14	[H]	TAYNQEAKFSSISIDQILEAH	[OH]	gp51p33	[H]	HNQSPFCAKSPRYTLD	[OH]
gp51p15	[H]	AYNQEAKFSSISIDQILEAHN	[OH]	gp51p36	[H]	SPFCAKSPRYTLD	[OH]
gp51p16	[H]	YNQEAKFSSISIDQILEAHNQ	[OH]	gp51p39	[H]	CAKSPRYTLD	[OH]
gp51p17	[H]	NQEAKFSSISIDQILEAHNQS	[OH]	gp51p42	[H]	SPRYTLD	[OH]
gp51p18	[H]	QEAKFSSISIDQILEAHNQSP	[OH]	gp51p45	[H]	YTLD	[OH]
gp51p19	[H]	EAKFSSISIDQILEAHNQSPF	[OH]	gp51p48	[H]	DSVNGYPKIYWPPPGRRRF	[OH]
gp51p20	[H]	AKFSSISIDQILEAHNQSPFC	[OH]	gp51p51	[H]	NGYPKIYWPPPGRRRFGAR	[OH]
gp51p21	[H]	KFSSISIDQILEAHNQSPFCA	[OH]	gp51p54	[H]	PKIYWPPPGRRRFGAR	[OH]
gp51p22	[H]	FSISIDQILEAHNQSPFCAK	[OH]	gp51p57	[H]	YWPPPGRRRFGAR	[OH]
gp51p23	[H]	SISIDQILEAHNQSPFCAKS	[OH]	gp51p60	[H]	PPQGRRRFGAR	[OH]

[11]

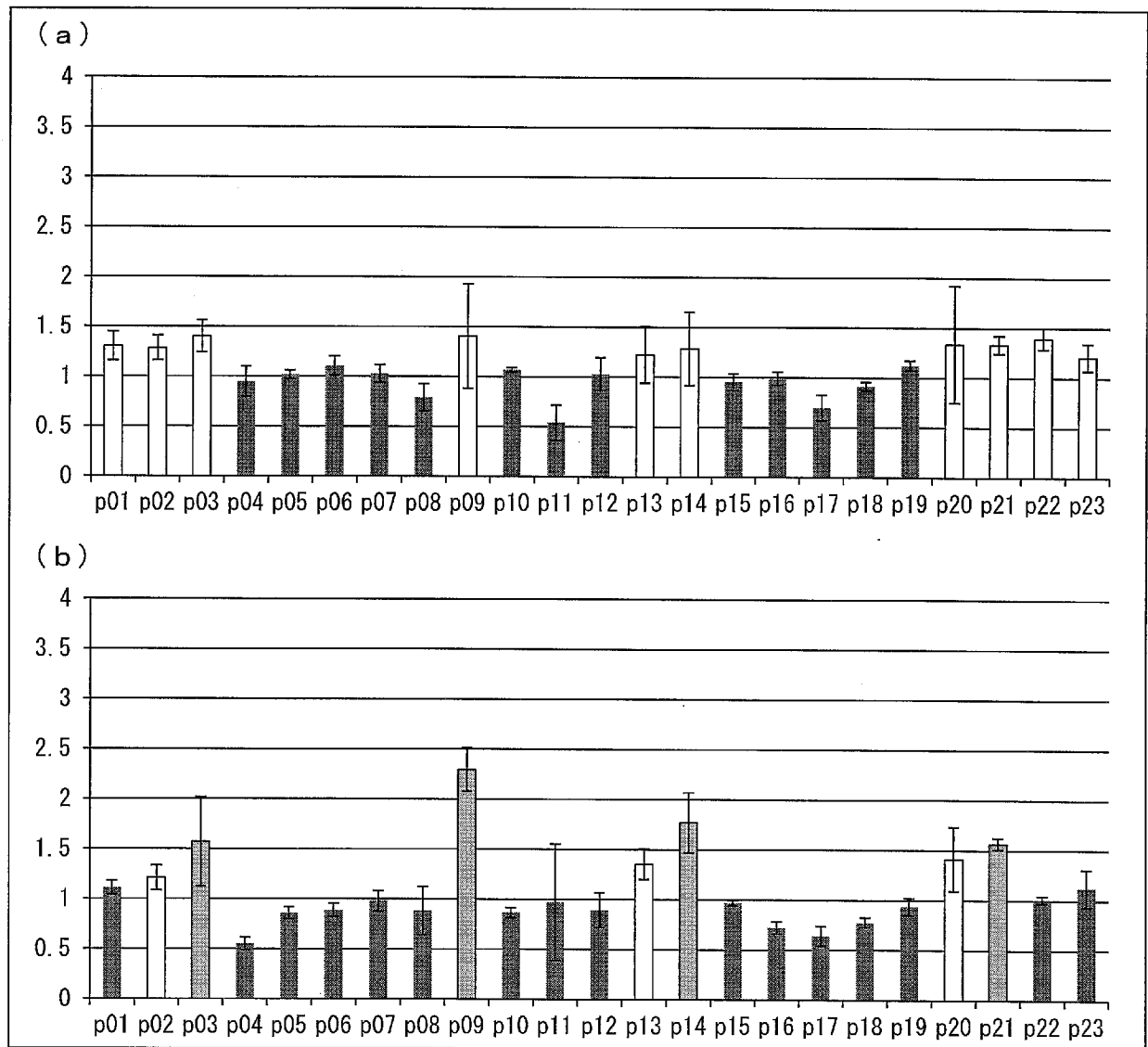


name	sequence	pool-1	pool-2	pool-3	pool-4	pool-5	pool-6	pool-7	pool-8	pool-9	pool-10	pool-11	pool-12	pool-13	pool-14	pool-15	pool-16	pool-17	pool-18	pool-19	pool-20	pool-21	pool-22	pool-23	pool-24	pool-25	pool-26	pool-27	pool-28	pool-29	pool-30	pool-31	pool-32	pool-33	pool-34	pool-35	pool-36	pool-37	pool-38	pool-39	pool-40	pool-41	pool-42	pool-43	pool-44	pool-45	pool-46	pool-47	pool-48	pool-49	pool-50	pool-51	pool-52	pool-53	pool-54	pool-55	pool-56	pool-57	pool-58	pool-59	pool-60	pool-61	pool-62	pool-63	pool-64	pool-65	pool-66	pool-67	pool-68	pool-69	pool-70	pool-71	pool-72	pool-73	pool-74	pool-75	pool-76	pool-77	pool-78	pool-79	pool-80	pool-81	pool-82	pool-83	pool-84	pool-85	pool-86	pool-87	pool-88	pool-89	pool-90	pool-91	pool-92	pool-93	pool-94	pool-95	pool-96	pool-97	pool-98	pool-99	pool-100	pool-101	pool-102	pool-103	pool-104	pool-105	pool-106	pool-107	pool-108	pool-109	pool-110	pool-111	pool-112	pool-113	pool-114	pool-115	pool-116	pool-117	pool-118	pool-119	pool-120	pool-121	pool-122	pool-123	pool-124	pool-125	pool-126	pool-127	pool-128	pool-129	pool-130	pool-131	pool-132	pool-133	pool-134	pool-135	pool-136	pool-137	pool-138	pool-139	pool-140	pool-141	pool-142	pool-143	pool-144	pool-145	pool-146	pool-147	pool-148	pool-149	pool-150	pool-151	pool-152	pool-153	pool-154	pool-155	pool-156	pool-157	pool-158	pool-159	pool-160	pool-161	pool-162	pool-163	pool-164	pool-165	pool-166	pool-167	pool-168	pool-169	pool-170	pool-171	pool-172	pool-173	pool-174	pool-175	pool-176	pool-177	pool-178	pool-179	pool-180	pool-181	pool-182	pool-183	pool-184	pool-185	pool-186	pool-187	pool-188	pool-189	pool-190	pool-191	pool-192	pool-193	pool-194	pool-195	pool-196	pool-197	pool-198	pool-199	pool-200	pool-201	pool-202	pool-203	pool-204	pool-205	pool-206	pool-207	pool-208	pool-209	pool-210	pool-211	pool-212	pool-213	pool-214	pool-215	pool-216	pool-217	pool-218	pool-219	pool-220	pool-221	pool-222	pool-223	pool-224	pool-225	pool-226	pool-227	pool-228	pool-229	pool-230	pool-231	pool-232	pool-233	pool-234	pool-235	pool-236	pool-237	pool-238	pool-239	pool-240	pool-241	pool-242	pool-243	pool-244	pool-245	pool-246	pool-247	pool-248	pool-249	pool-250	pool-251	pool-252	pool-253	pool-254	pool-255	pool-256	pool-257	pool-258	pool-259	pool-260	pool-261	pool-262	pool-263	pool-264	pool-265	pool-266	pool-267	pool-268	pool-269	pool-270	pool-271	pool-272	pool-273	pool-274	pool-275	pool-276	pool-277	pool-278	pool-279	pool-280	pool-281	pool-282	pool-283	pool-284	pool-285	pool-286	pool-287	pool-288	pool-289	pool-290	pool-291	pool-292	pool-293	pool-294	pool-295	pool-296	pool-297	pool-298	pool-299	pool-300	pool-301	pool-302	pool-303	pool-304	pool-305	pool-306	pool-307	pool-308	pool-309	pool-310	pool-311	pool-312	pool-313	pool-314	pool-315	pool-316	pool-317	pool-318	pool-319	pool-320	pool-321	pool-322	pool-323	pool-324	pool-325	pool-326	pool-327	pool-328	pool-329	pool-330	pool-331	pool-332	pool-333	pool-334	pool-335	pool-336	pool-337	pool-338	pool-339	pool-340	pool-341	pool-342	pool-343	pool-344	pool-345	pool-346	pool-347	pool-348	pool-349	pool-350	pool-351	pool-352	pool-353	pool-354	pool-355	pool-356	pool-357	pool-358	pool-359	pool-360	pool-361	pool-362	pool-363	pool-364	pool-365	pool-366	pool-367	pool-368	pool-369	pool-370	pool-371	pool-372	pool-373	pool-374	pool-375	pool-376	pool-377	pool-378	pool-379	pool-380	pool-381	pool-382	pool-383	pool-384	pool-385	pool-386	pool-387	pool-388	pool-389	pool-390	pool-391	pool-392	pool-393	pool-394	pool-395	pool-396	pool-397	pool-398	pool-399	pool-400	pool-401	pool-402	pool-403	pool-404	pool-405	pool-406	pool-407	pool-408	pool-409	pool-410	pool-411	pool-412	pool-413	pool-414	pool-415	pool-416	pool-417	pool-418	pool-419	pool-420	pool-421	pool-422	pool-423	pool-424	pool-425	pool-426	pool-427	pool-428	pool-429	pool-430	pool-431	pool-432	pool-433	pool-434	pool-435	pool-436	pool-437	pool-438	pool-439	pool-440	pool-441	pool-442	pool-443	pool-444	pool-445	pool-446	pool-447	pool-448	pool-449	pool-450	pool-451	pool-452	pool-453	pool-454	pool-455	pool-456	pool-457	pool-458	pool-459	pool-460	pool-461	pool-462	pool-463	pool-464	pool-465	pool-466	pool-467	pool-468	pool-469	pool-470	pool-471	pool-472	pool-473	pool-474	pool-475	pool-476	pool-477	pool-478	pool-479	pool-480	pool-481	pool-482	pool-483	pool-484	pool-485	pool-486	pool-487	pool-488	pool-489	pool-490	pool-491	pool-492	pool-493	pool-494	pool-495	pool-496	pool-497	pool-498	pool-499	pool-500	pool-501	pool-502	pool-503	pool-504	pool-505	pool-506	pool-507	pool-508	pool-509	pool-510	pool-511	pool-512	pool-513	pool-514	pool-515	pool-516	pool-517	pool-518	pool-519	pool-520	pool-521	pool-522	pool-523	pool-524	pool-525	pool-526	pool-527	pool-528	pool-529	pool-530	pool-531	pool-532	pool-533	pool-534	pool-535	pool-536	pool-537	pool-538	pool-539	pool-540	pool-541	pool-542	pool-543	pool-544	pool-545	pool-546	pool-547	pool-548	pool-549	pool-550	pool-551	pool-552	pool-553	pool-554	pool-555	pool-556	pool-557	pool-558	pool-559	pool-560	pool-561	pool-562	pool-563	pool-564	pool-565	pool-566	pool-567	pool-568	pool-569	pool-570	pool-571	pool-572	pool-573	pool-574	pool-575	pool-576	pool-577	pool-578	pool-579	pool-580	pool-581	pool-582	pool-583	pool-584	pool-585	pool-586	pool-587	pool-588	pool-589	pool-590	pool-591	pool-592	pool-593	pool-594	pool-595	pool-596	pool-597	pool-598	pool-599	pool-600	pool-601	pool-602	pool-603	pool-604	pool-605	pool-606	pool-607	pool-608	pool-609	pool-610	pool-611	pool-612	pool-613	pool-614	pool-615	pool-616	pool-617	pool-618	pool-619	pool-620	pool-621	pool-622	pool-623	pool-624	pool-625	pool-626	pool-627	pool-628	pool-629	pool-630	pool-631	pool-632	pool-633	pool-634	pool-635	pool-636	pool-637	pool-638	pool-639	pool-640	pool-641	pool-642	pool-643	pool-644	pool-645	pool-646	pool-647	pool-648	pool-649	pool-650	pool-651	pool-652	pool-653	pool-654	pool-655	pool-656	pool-657	pool-658	pool-659	pool-660	pool-661	pool-662	pool-663	pool-664	pool-665	pool-666	pool-667	pool-668	pool-669	pool-670	pool-671	pool-672	pool-673	pool-674	pool-675	pool-676	pool-677	pool-678	pool-679	pool-680	pool-681	pool-682	pool-683	pool-684	pool-685	pool-686	pool-687	pool-688	pool-689	pool-690	pool-691	pool-692	pool-693	pool-694	pool-695	pool-696	pool-697	pool-698	pool-699	pool-700	pool-701	pool-702	pool-703	pool-704	pool-705	pool-706	pool-707	pool-708	pool-709	pool-710	pool-711	pool-712	pool-713	pool-714	pool-715	pool-716	pool-717	pool-718	pool-719	pool-720	pool-721	pool-722	pool-723	pool-724	pool-725	pool-726	pool-727	pool-728	pool-729	pool-730	pool-731	pool-732	pool-733	pool-734	pool-735	pool-736	pool-737	pool-738	pool-739	pool-740	pool-741	pool-742	pool-743	pool-744	pool-745	pool-746	pool-747	pool-748	pool-749	pool-750	pool-751	pool-752	pool-753	pool-754	pool-755	pool-756	pool-757	pool-758	pool-759	pool-760	pool-761	pool-762	pool-763	pool-764	pool-765	pool-766	pool-767	pool-768	pool-769	pool-770	pool-771	pool-772	pool-773	pool-774	pool-775	pool-776	pool-777	pool-778	pool-779	pool-780	pool-781	pool-782	pool-783	pool-784	pool-785	pool-786	pool-787	pool-788	pool-789	pool-790	pool-791	pool-792	pool-793	pool-794	pool-795	pool-796	pool-797	pool-798	pool-799	pool-800	pool-801	pool-802	pool-803	pool-804	pool-805	pool-806	pool-807	pool-808	pool-809	pool-810	pool-811	pool-812	pool-813	pool-814	pool-815	pool-816	pool-817	pool-818	pool-819	pool-820	pool-821	pool-822	pool-823	pool-824	pool-825	pool-826	pool-827	pool-828	pool-829	pool-830	pool-831	pool-832	pool-833	pool-834	pool-835	pool-836	pool-837	pool-838	pool-839	pool-840	pool-841	pool-842	pool-843	pool-844	pool-845	pool-846	pool-847	pool-848	pool-849	pool-850	pool-851	pool-852	pool-853	pool-854	pool-855	pool-856	pool-857	pool-858	pool-859	pool-860	pool-861	pool-862	pool-863	pool-864	pool-865	pool-866	pool-867	pool-868	pool-869	pool-870	pool-871	pool-872	pool-873	pool-874	pool-875	pool-876	pool-877	pool-878	pool-879	pool-880	pool-881	pool-882	pool-883	pool-884	pool-885	pool-886	pool-887	pool-888	pool-889	pool-890	pool-891	pool-892	pool-893	pool-894	pool-895	pool-896	pool-897	pool-898	pool-899	pool-900	pool-901	pool-902	pool-903	pool-904	pool-905	pool-906	pool-907	pool-908	pool-909	pool-910	pool-911	pool-912	pool-913	pool-914	pool-915	pool-916	pool-917	pool-918	pool-919	pool-920	pool-921	pool-922	pool-923	pool-924	pool-925	pool-926	pool-927	pool-928	pool-929	pool-930	pool-931	pool-932	pool-933	pool-934	pool-935	pool-936	pool-937	pool-938	pool-939	pool-940	pool-941	pool-942	pool-943	pool-944	pool-945	pool-946	pool-947	pool-948	pool-949	pool-950	pool-951	pool-952	pool-953	pool-954	pool-955	pool-956	pool-957	pool-958	pool-959	pool-960	pool-961	pool-962	pool-963	pool-964	pool-965	pool-966	pool-967	pool-968	pool-969	pool-970	pool-971	pool-972	pool-973	pool-974	pool-975	pool-976	pool-977	pool-978	pool-979	pool-980	pool-981	pool-982	pool-983	pool-984	pool-985	pool-986	pool-987	pool-988	pool-989	pool-990	pool-991	pool-992	pool-993	pool-994	pool-995	pool-996	pool-997	pool-998	pool-999	pool-1000
------	----------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------

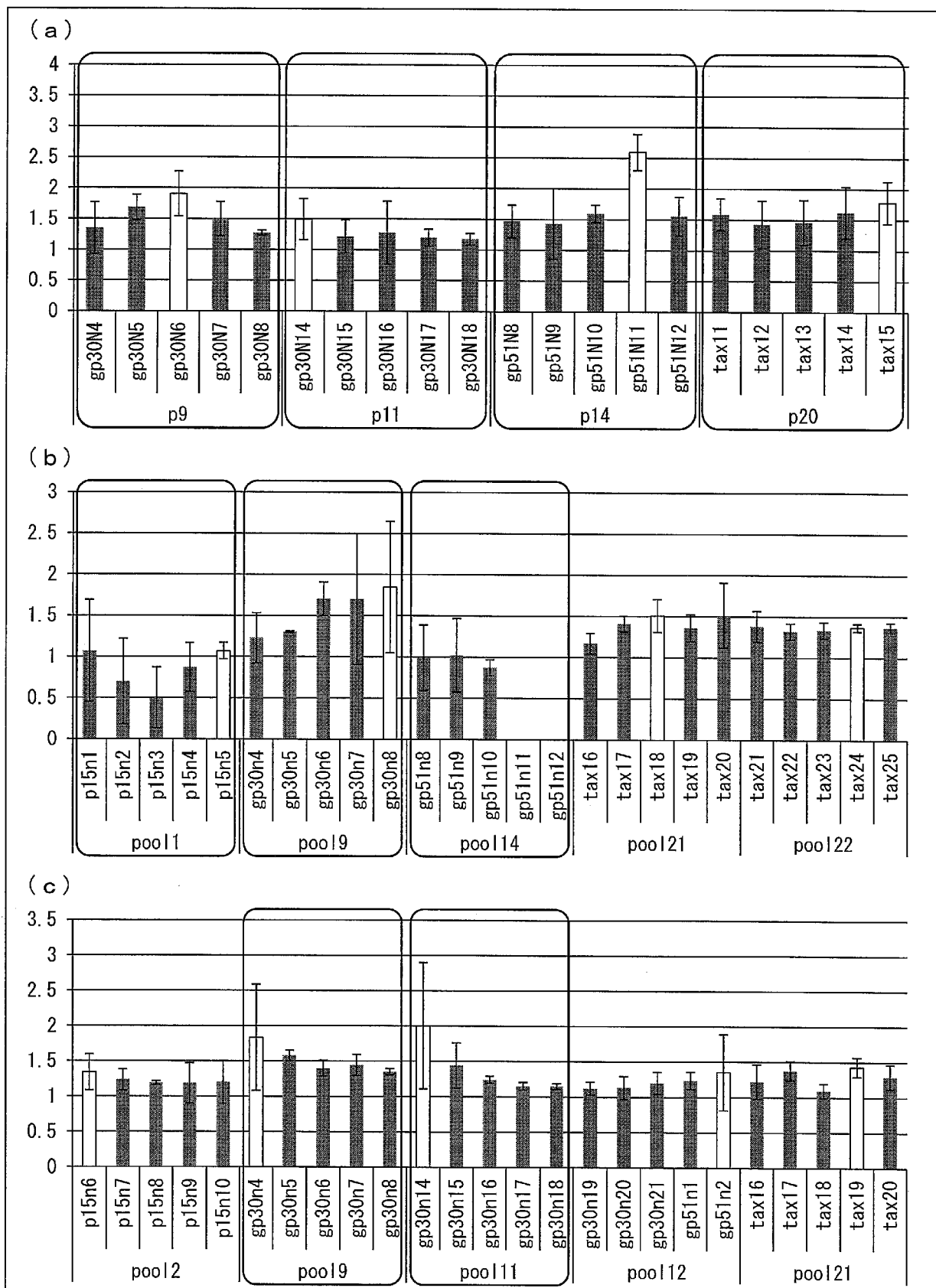
[図13]



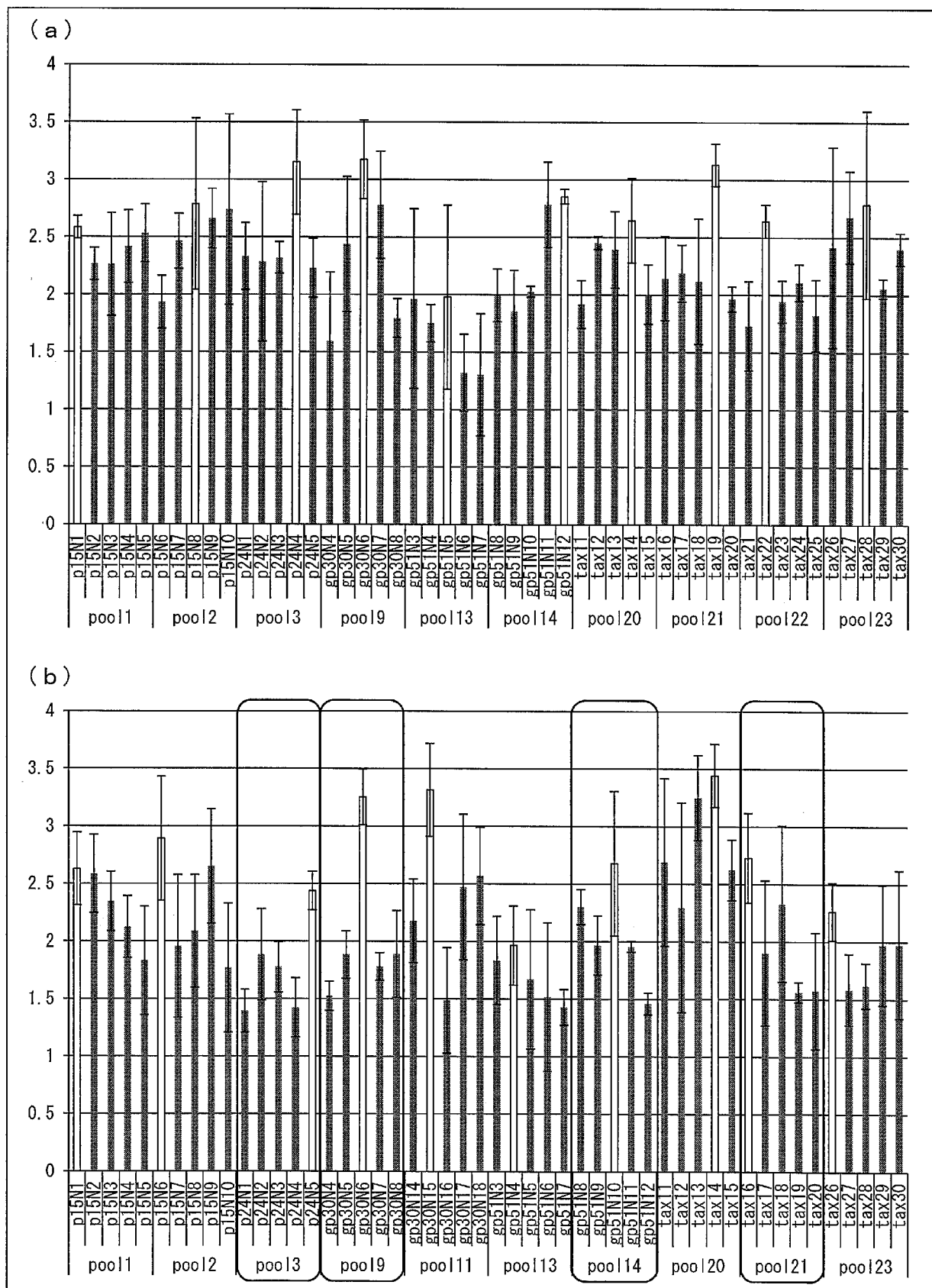
[図14]



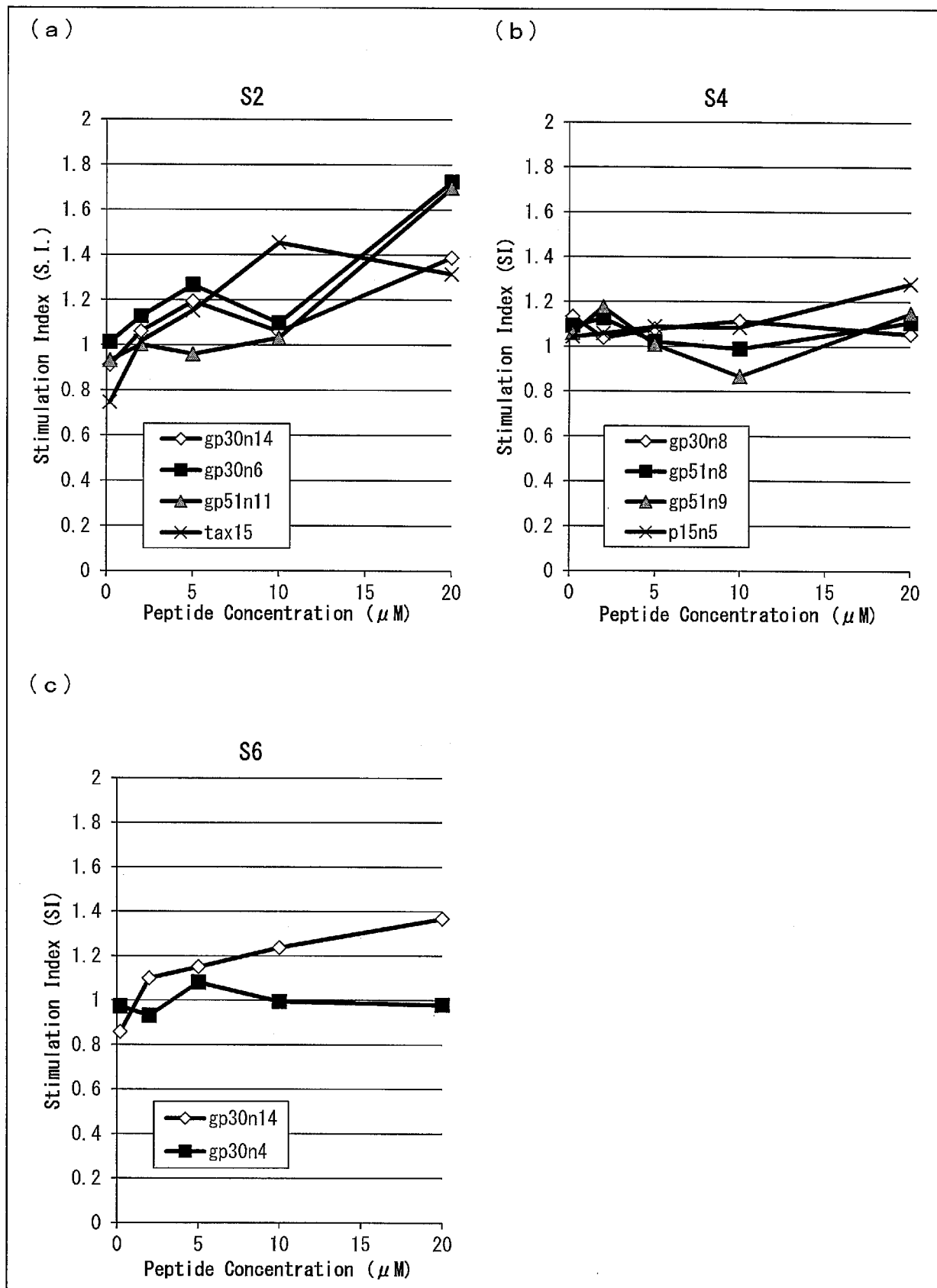
[図15]



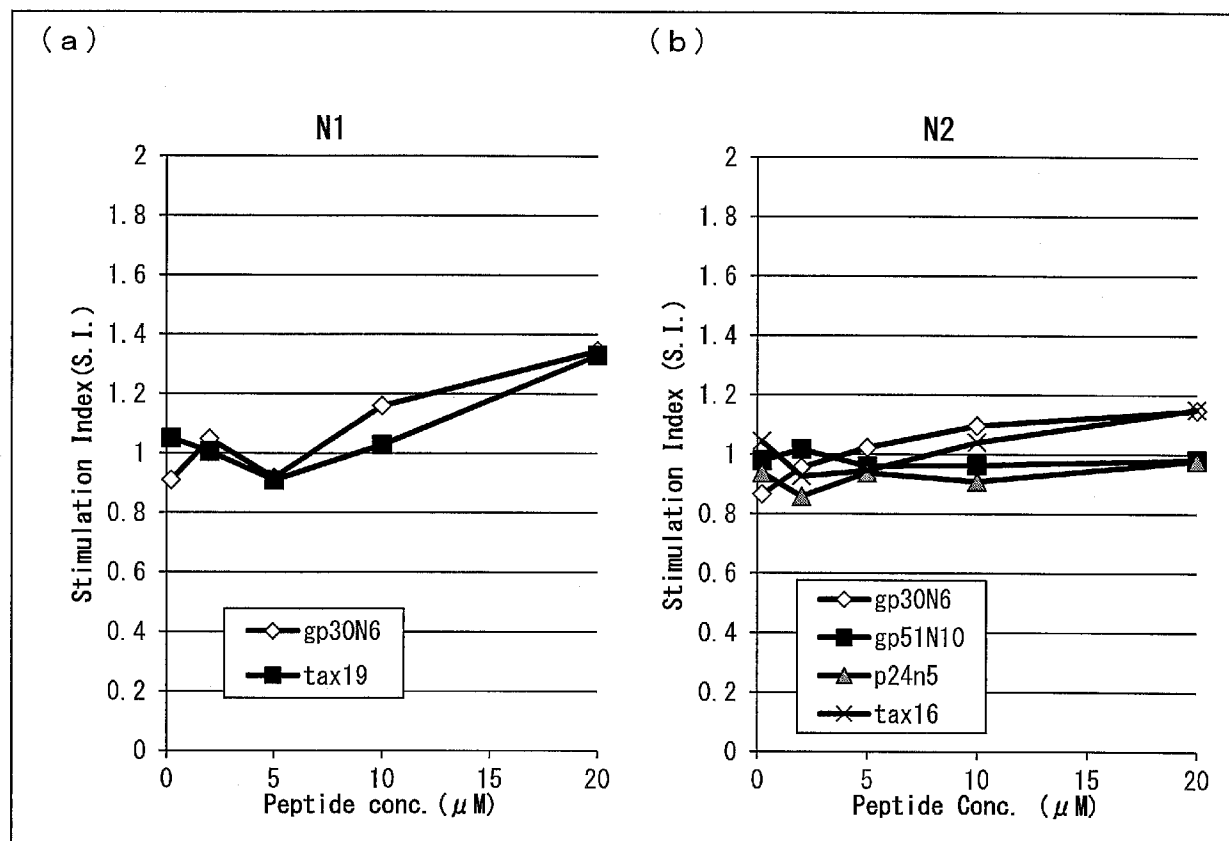
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/059052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K39/21(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A61K39/21, A61P31/14, A61P35/02, A61P37/04, C07K14/15, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	M. H. GATEI, et al., T-cell responses to highly conserved CD4 and CD8 epitopes on the outer membrane protein of bovine leukemia virus: relevance to vaccine development, Journal of Virology, 1993, vol.67, no.4, p.1796-1802	1-5, 11-13 1-15
Y	gp51 [Bovine leukemia virus], [2010.04.07] (online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.CAR64538; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAR64538.1>	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2014 (11.04.14)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2014 (22.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/059052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RecName: Full=Gag polyprotein; Contains: RecName: Full=Matrix protein p15; Short=MA; Contains: RecName: Full=Capsid protein p24; Short=CA; Contains: RecName: Full=Core protein p12, [2013.03.06](online); [retrieved on 2014. 04.11]; GenBank Accession No.P03344; <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ 120813?sat=17&satkey=2248125>	1-15
Y	transmembrane protein gp30 [Bovine leukemia virus], [2003.05.06](online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.AAP32011; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ AAP32011.1>	1-15
Y	Tax [Bovine leukemia virus], [2009.06.30] (online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.ABR13901; <URL:http://www.ncbi. nlm.nih.gov/protein/ABR13901.1>	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K39/21(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, A61K39/21, A61P31/14, A61P35/02, A61P37/04, C07K14/15, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	M. H. GATEI, et al., T-cell responses to highly conserved CD4 and CD8 epitopes on the outer membrane protein of bovine leukemia virus: relevance to vaccine development, Journal of Virology, 1993, vol.67, no.4, p.1796-1802	1-5, 11-13
Y		1-15
Y	gp51 [Bovine leukemia virus], [2010.04.07](online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.CAR64538; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAR64538.1>	1-15

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

馬場 亮人

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 0 4 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	RecName: Full=Gag polyprotein; Contains: RecName: Full=Matrix protein p15; Short=MA; Contains: RecName: Full=Capsid protein p24; Short=CA; Contains: RecName: Full=Core protein p12, [2013.03.06] (online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.P03344; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/120813?sat=17&satkey=2248125>	1-15
Y	transmembrane protein gp30 [Bovine leukemia virus], [2003.05.06] (online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.AAP32011; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAP32011.1>	1-15
Y	Tax [Bovine leukemia virus], [2009.06.30] (online); [retrieved on 2014.04.11]; GenBank Accession No.ABR13901; <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR13901.1>	1-15