

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4406607号
(P4406607)

(45) 発行日 平成22年2月3日(2010.2.3)

(24) 登録日 平成21年11月13日(2009.11.13)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 7/06 (2006.01)

C O 7 K 7/06 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 Z

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 12 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-530567 (P2004-530567)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月19日(2003.8.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2003/010459
 (87) 国際公開番号 W02004/018667
 (87) 国際公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)
 審査請求日 平成18年7月20日(2006.7.20)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-245831 (P2002-245831)
 (32) 優先日 平成14年8月26日(2002.8.26)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 502240113
 オンコセラピー・サイエンス株式会社
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 西村 泰治
 熊本県熊本市本荘1-1-1 熊本大学大
 学院 医学薬学研究部 免疫識別学分野内
 (72) 発明者 中面 哲也
 熊本県熊本市本荘1-1-1 熊本大学大
 学院 医学薬学研究部 免疫識別学分野内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド及びこれを含む医薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項2】

配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列において1個のアミノ酸が置換または付加されており、かつ、細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチドであって、ここで該置換は、該アミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸のフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンへの置換、あるいは、該アミノ酸配列のC末端のアミノ酸のフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンへの置換である、前記ペプチド。

【請求項3】

請求項1または2に記載のペプチドを1種以上含む、腫瘍の治療及び/または予防のための医薬。

【請求項4】

請求項1または2に記載のペプチドとHLA分子とを含む複合体を表面に提示しているエキソソーム。

【請求項5】

HLA分子がHLA-A24である、請求項4に記載のエキソソーム。

【請求項6】

HLA分子がHLA-A*2402である、請求項5に記載のエキソソーム。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドを用いて細胞傷害性 T 細胞誘導能の高い抗原提示細胞をインビトロで誘導する方法。

【請求項 8】

グリピカン 3 (g l y p i c a n - 3 ; G P C 3) タンパク質または請求項 1 または 2 に記載のペプチドを含むその部分ペプチドをコードする遺伝子を抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性 T 細胞誘導能の高い抗原提示細胞をインビトロで誘導する方法。

【請求項 9】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドを用いて細胞傷害性 T 細胞をインビトロで誘導する方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 11】

H L A 分子と請求項 1 または 2 に記載のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞。

【請求項 12】

請求項 7 または 8 に記載の方法によって誘導される、請求項 11 に記載の抗原提示細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

本発明は、癌ワクチンとして有効な新規ペプチド、当該ペプチドを含む腫瘍の治療及び予防のための医薬、並びに肝細胞癌の新規な診断剤に関する。

【背景技術】

原発性肝細胞癌 (H C C) は、世界中で最も一般的な悪性疾患の一つである。B 型及び C 型肝炎の世界的な流行により、アジアや欧州諸国における H C C の発生率は急激に上昇しており (S c h a f e r , D . F . 及び S o r r e l l , M . F . , L a n c e t 3 5 3 , 1 2 5 3 - 1 2 5 7 (1 9 9 9))、H C C 感染から発病までの長い潜在期間を考慮すると今後 5 0 年にわたってこの傾向が続くものと予想される。病状の進んだ H C C の予後は芳しくなく、新たな治療戦略が緊急に必要とされている。

一方、近年の分子生物学及び腫瘍免疫学の進展により、腫瘍応答性細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) によって認識される腫瘍抗原及び抗原性のあるペプチドをコードする多数の遺伝子が同定されてきており、抗原特異的腫瘍免疫療法の可能性が高まってきている (B o o n , T . 及び v a n d e r B r u g g e n , P . , J . E x p . M e d . 1 8 3 , 7 2 5 - 7 2 9 (1 9 9 6) ; R o s e n b e r g , S . A . , J . N a t l . C a n c e r I n s t . 8 8 , 1 6 3 5 - 1 6 4 4 (1 9 9 6))。

30

- フェトタンパク質 (A F P) は、正常組織では胎生期にのみ発現するが、多くの H C C において発現が再活性化されることが報告されている (F u j i y a m a , S . ら , O n c o l o g y 6 2 , 5 7 - 6 3 (2 0 0 2))。またマウス及びヒトの T 細胞レパートリーは、M H C クラス I 分子により提示された A F P 由来ペプチドエピトープを認識できる (B u t t e r f i e l d , L . H . ら , C a n c e r R e s . 5 9 , 3 1 3 4 - 3 1 4 2 ; J r V o l l m e r , C . M . ら , C a n c e r R e s . 5 9 , 3 0 6 4 - 3 0 6 7 (1 9 9 9) ; B u t t e r f i e l d , L . H . ら J . I m m u n o l . 1 6 6 , 5 3 0 0 - 5 3 0 8 (2 0 0 1))。胎児の発達段階においてこの癌胎児性タンパク質に対して高い血漿レベルで曝されているにも関わらず、成熟 T 細胞は A F P に対して完全な免疫寛容 (トレランス) を獲得することはなく、A F P 特異的な T 細胞が末梢血中に検出される。すなわち、癌胎児性タンパク質は免疫治療の標的となり得る。また、A F P 及び P I V K A - I I (F u j i y a m a , S . ら , O n c o l o g y 6 2 , 5 7 - 6 3 (2 0 0 2)) は H C C の周知の腫瘍マーカーである。

40

更に、研究者が遺伝子 - 発現プロファイルに関する包括的なデータを得ることを可能とする c D N A マイクロアレイ技術が急速に発展している。いくつかの研究によって、この

50

技術が新規癌関連遺伝子の同定及び分子レベルにおけるヒト癌の分類に有用であることが証明されている (Golub, T. R. ら, *Science* 286, 531 - 537 (1999); Alizadeh, A. A. ら, *Nature* 403, 503 - 511 (2000); Ono, K. ら, *Cancer Res.* 60, 5007 - 5011 (2000); Kitahara, O. ら, *Cancer Res.* 61, 3544 - 3549 (2001); Kihara, C. ら, *Cancer Res.* 61, 6474 - 6479 (2001))。本発明者等は先に、23,040種の遺伝子を含むゲノムワイドのcDNAマイクロアレイの使用によって、HCCの発生の際に発現が変化する遺伝子の同定を報告した。そして20種の原発性HCCにおけるこれらの遺伝子の発現プロファイルを検討した (Okabe, H. ら, *Cancer Res.* 61, 2129 - 2137 (2001))。

10

1996年、Pilia らは、グリピカンファミリーのメンバーの1種をコードするグリピカン3 (glypican-3; GPC3) 遺伝子が、Simpson-Golabi-Behmel症候群 (SGBS) 患者において変異していることを報告した (Pilia, G. ら, *Nat. Genet.* 12, 241 - 247 (1996))。SGBSは出生前後の過成長、及び女性キャリアにおける非常に軽い表現型から男性乳児の致死性症状までの幅広い臨床症状によって特徴付けられるX連鎖遺伝性疾患である (Neri, G. ら, *Am. J. Med. Genet.* 79, 279 - 283 (1998))。SGBSの臨床的特徴としては、特徴的な顔貌 (distinct facial appearance)、口蓋裂、合指、多指、副乳、嚢胞性及び異形成腎、先天性心欠陥等が挙げられる (Behmel, A. ら, *Hum. Genet.* 67, 409 - 413 (1984); Garganta, C. L. 及び Bodurtha, J. N., *Am. J. Med. Genet.* 44, 129 - 135 (1992); Golabi, M. 及び Rosen, L., *Am. J. Med. Genet.* 17, 345 - 358 (1984); Gurrieri, F. ら, *Am. J. Med. Genet.* 44, 136 - 137 (1992))。GPC3変異のほとんどは点突然変異または幾つかのエクソンを含む小さな遺伝子の欠失であると報告されている (Hughes-Benzies, R. M. ら, *Am. J. Med. Genet.* 66, 227 - 234 (1996); Lindsay, S. ら, *J. Med. Genet.* 34, 480 - 483 (1997); Veugelers, M. ら, *Hum. Mol. Genet.* 9, 1321 - 1328 (2000); Xuan, J. Y. ら, *J. Med. Genet.* 36, 57 - 58 (1999))。また、患者の表現型と変異の位置に相関性がないことから、SGBSは機能的GPC3タンパク質の欠損と、家系内及び家系間の表現型の差を生み出す他の遺伝的要因によって引き起こされる可能性が挙げられており (Hughes-Benzies, R. M. ら, *Am. J. Med. Genet.* 66, 227 - 234 (1996))、GPC3欠損マウスの研究からも、この仮説に対する支持が得られている (Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255 - 264 (1999))。これらのマウスはSGBS患者に見られる、過成長、嚢胞性及び異形成腎を含む異常のいくつかを有している。

20

30

癌に特異的に過剰発現し、種々の正常組織においては発現レベルが無視できる抗原は、免疫療法において理想的な標的である可能性がある。こうした場合、CTLは抗原を過剰発現する癌に対してのみ細胞傷害性を示し、正常な組織には副作用を示さないと期待できる。ノーザンブロット解析を用いた研究から、GPC3 mRNAはHCC、胎盤、胎児肝臓、胎児肺、胎児腎臓で過剰発現していることが報告されている (Zhu, Z. W. ら, *Gut* 48, 558 - 564 (2001); Hsu, H. C. ら, *Cancer Res.* 57, 5179 - 5184 (1997); Pellegrini, M. ら, *Dev Dyn.* 213, 431 - 439 (1998))。

40

また、GPC3には細胞増殖の阻害作用があり、ある種の腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導し得るため (Duenas-Gonzales, A. ら, *J. Cell Biol.* 141, 1407 - 1414 (1998); Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255 - 264 (1999))、GPC3発現が種々の

50

起源の腫瘍において発現が抑制されているという報告がある。Linらは、GPC3は正常な卵巣で発現しているが、ある種の卵巣癌細胞系においては検出できないことを示した(Lin, H.ら, Cancer Res. 59, 807-810 (1999))。GPC3発現が見られない全てのケースにおいて、コード領域における変異はなく、GPC3プロモーターが過度にメチル化されており、また脱メチル化剤で処理することによってGPC3発現は回復した。更に、GPC3の異所性発現は数種の卵巣癌細胞系においてコロニー形成活性を阻害することが報告されている。GPC3と癌を関連付ける他のデータとしては、正常なラット中皮細胞と中皮腫細胞株との間のディファレンシャルmRNAディスプレイ研究から得られたものがある(Murthy, S. S.ら, Oncogene 19, 410-416 (2000))。この研究において、GPC3は腫瘍細胞株において絶えず発現が抑制されていることが見出された。更に、同様の発現抑制は原発性ラット中皮腫及びヒトの中皮腫由来の細胞株においても見られている。卵巣癌と同様に、GPC3コード配列中に変異は見出されていないが、ほとんどの細胞株でGPC3プロモーター領域に異常なメチル化が見られている。報告されているように(Duenas Gonzalez, A.ら, J. Cell. Biol. 141, 1407-1414 (1998))、中皮腫細胞株におけるGPC3の異所性発現はコロニー形成活性を阻害することが示された。更に最近、Xiangらは、GPC3がヒトの乳癌においても発現していないことを報告した(Xiang, Y. Y.ら, Oncogene 20, 7408-7412 (2001))。これらのデータから、GPC3がこれらの癌における細胞増殖の負の調節因子として作用し得ることが示唆される。すなわち、GPC3の発現は成人のGPC3陽性組織から生じる癌における腫瘍の進行の間に低下し、この低下が悪性の表現型の発生において何らかの役割を果たしているように思われる。

反対に、HCCの場合、腫瘍は胎児においてのみGPC3を発現する肝臓組織から生じ、GPC3発現は悪性への形質転換において再び現れる傾向がある。GPC3の再発現がこれらの腫瘍の進行において重要であるか否かは明らかでない。ここ数年の間に、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が線維芽細胞増殖因子(FGF)及びWnt等のヘパリン結合性成長因子の最適な活性の発現に必要であることが明らかとなった(Yayon, A.ら, Cell 64, 841-848 (1991); Schlesinger, J.ら, Cell 83, 357-360 (1995))。グリピカン(GPI)はGPIアンカー型細胞表面HSPGのファミリーであり、腫瘍形成とGPC3の発現レベルの関係におけるこの組織特異的な差異は、GPC3が各組織ごとに異なった方法で成長と生存因子を調節しているためではないかと推測される。GPC3は少なくともこれらの臓器において癌胎児性タンパク質として働いているように思われる。一般に、癌胎児性タンパク質は腫瘍の進行において重要な役割を持つとはされていないが、腫瘍マーカーまたは免疫治療の標的として使用されてきた(Cogglin, J. H. Jr., CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology 5, 37-55 (1992); Matsuura, H.及びHakomori S. - I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6517-6521 (1985))。GPC3の癌胎児性挙動が臨床的用途に利用し得るか否か、このグリピカンの再発現がHCCの進行において重要であるか否かは、更に研究の余地がある。

HCCの治療法は様々なものがあるにも関わらず、他の癌に比べて予後が悪く、難治性癌のひとつになっている。HCCのベースに肝硬変があり、もともとの患者の肝機能が悪いことや、1個の癌を治療してもまた別の場所から癌が発生するという性質もその理由である。早急かつ新たな治療戦略が要求されている。HCCに特異的に高発現している抗原を標的にした免疫療法を開発できれば、自己の正常臓器に障害を及ぼすことなく、癌だけを有効に排除する治療法になる可能性がある。また、どんな末期の癌患者でも、肝機能が悪すぎて他の治療が行えない患者にでも使用できる治療法になり得る。また、現在日本ではHCC予備群であるC型肝炎感染者が200万人以上いるといわれている。これらの感染者のHCCの予防に対してもこのような免疫療法は使用できる可能性がある。HCCの腫瘍マーカーとしてAFP及びPIVKA-IIが知られているが、患者によっては検出

10

20

30

40

50

されない場合や、良性肝疾患である肝硬変や慢性肝炎の患者で偽陽性となる場合があり、特に早期のHCCの診断は難しいとされている。HCCの早期診断のためにも他に有用な腫瘍マーカーが必要である。

【発明の開示】

本発明者等は、cDNAマイクロアレイ解釈データに基づいて、ヒト肝細胞癌において特異的に過剰発現している新規な癌胎児性タンパク質としてグリピカン3 (GPC3) を同定し、免疫治療のための標的抗原の潜在的な候補となり得る新規なペプチドを見出した。次いで本発明者等はHCC患者血清中に可溶性GPC3タンパク質を検出し、GPC3はHCCの新たな腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。

すなわち、本発明は、以下の(1)～(18)を提供する。

10

(1) 配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチド。

(2) 配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列において1個または2個のアミノ酸が置換または付加されており、細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド。

(3) N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンである、上記(2)に記載のペプチド。

(4) C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである、上記(2)または(3)に記載のペプチド。

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドを1種以上含む、腫瘍の治療及び/または予防のための医薬。

(6) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドとHLA分子とを含む複合体を表面に提示しているエキソソーム。

20

(7) HLA分子がHLA-A*24である、上記(6)に記載のエキソソーム。

(8) HLA分子がHLA-A*2402である、上記(7)に記載のエキソソーム。

(9) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドを用いて細胞傷害性T細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。

(10) グリピカン3 (glypican-3; GPC3) タンパク質または上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドを含むその部分ペプチドをコードする遺伝子を抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性T細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。

30

(11) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導する方法。

(12) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性T細胞。

(13) HLA分子と上記(1)～(4)のいずれかに記載のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞。

(14) 上記(9)または(10)に記載の方法によって誘導される、上記(13)に記載の抗原提示細胞。

(15) GPC3に対する抗体を含む、肝細胞癌(HCC)の診断剤。

(16) サンプルとGPC3に対する抗体を接触させることを含む、HCCの診断方法。

40

(17) 更にサンプル中のGPC3を定量することを含む、上記(16)に記載の方法。

(18) GPC3に対する抗体を含む、HCCの診断のためのキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2002-245831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。

【図面の簡単な説明】

図1は、成人組織におけるGPC3 mRNAのHCC特異的発現を示す。

20例のHCC及び種々の正常組織におけるヒトGPC3 mRNAの発現の相対比(RR)を示す。HCCにおけるRRは各症例における腫瘍：非腫瘍の強度比を示す。正常

50

組織における R R は正常各組織：正常肝臓の強度比を示す。

図 2 は、ヒト H C C 細胞株において R T - P C R によって検出された G P C 3 及び - アクチン (対照) の m R N A の発現を示す。

レーン 1 : H e p G 2、レーン 2 : H e p 3 B、レーン 3 : P L C / P R F / 5、レーン 4 : S K - H e p - 1、レーン 5 : H u H - 7

図 3 は、G P C 3 ペプチド (ペプチド (p e p) 1 ~ 1 2 : 配列番号 5 ~ 1 6) で刺激し、更に増殖させた P B M C を、6 時間の ^{51}Cr 放出アッセイを用いて C T L 活性について調べた結果の一部を示す。縦軸の値は 3 回のアッセイの平均値に基づいて計算した特異的細胞溶解率 (%) を示す。H C C 細胞株として H L A - A 2 4 + G P C 3 + + + の H e p G 2、H L A - A 2 4 + G P C 3 - の S K - H e p - 1、H L A - A 2 4 - G P C 3 + + + の H e p 3 B 及び H u H - 7 を用い、患者 1 に対してペプチド 1、3、7、または 1 2 で誘導した C T L、患者 2 に対してペプチド 5、6、1 0、または 1 1 で誘導した C T L、患者 3 に対してペプチド 2 または 1 2 で誘導した C T L、患者 4 に対してペプチド 1、2、3、4、7、または 1 0 で誘導した C T L、患者 5 に対してペプチド 1、3、4、1 1、または 1 2 で誘導した C T L、患者 6 に対してペプチド 6 または 9 で誘導した C T L、患者 7 に対してペプチド 4、5、6、8、9、1 1、または 1 2 で誘導した C T L、患者 8 に対してペプチド 5、7、または 1 0 で誘導した C T L の結果を示す。尚、横軸は E f f e c t o r / T a r g e t 比 (E / T 比)、すなわち癌細胞数に対する C T L 数の比を示す。

図 4 は、ウエスタンブロットを用いて H e p G 2 の培養上清における G P C 3 タンパク質の存在を示す。

レーン 1、3、5、及び 7 : 6、1 2、2 4、及び 4 8 時間の培養後の H e p G 2 細胞 1×10^5 個の溶解物

レーン 2、4、6、及び 8 : 6、1 2、2 4、及び 4 8 時間の培養後の H e p G 2 培養上清 $20 \mu l$

図 5 は、3 種類の H C C 細胞株 (H e p G 2、H e p 3 B および S K - H e p - 1) の培養上清中に分泌される G P C 3 タンパク質の E L I S A による定量的結果を示す。H e p G 2 細胞 1×10^5 個の 2 4 時間培養後の培養上清 1 m l 中の G P C 3 タンパク質の濃度を 1 U / m l と定義した。

図 6 は、ウエスタンブロットによる H C C 患者血清中の可溶性 G P C 3 タンパク質の検出を示す。

図 7 は、H C C 患者 2 8 名及び健康なドナー (H D) 5 4 名の血清中の G P C 3 タンパク質の E L I S A による定量的結果を示す。1 . 7 1 は、5 4 名の H D 由来の血清中の G P C 3 タンパク質の平均値 + 3 S D として規定される、血清中の可溶性 G P C 3 タンパク質の正常上限の値である。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明者等は、O k a b e , H . ら (C a n c e r R e s . 6 1 , 2 1 2 9 - 2 1 3 7 (2 0 0 1)) に記載の方法を用い、c D N A マイクロアレイに基づいてヒト肝細胞癌において特異的に過剰発現している新規な癌胎児性タンパク質としてグリピカン 3 (G P C 3) を同定した。血清中の G P C 3 を検出した結果では、肝細胞癌以外の癌、例えば胃、食道、肺、乳房、すい臓、胆管、結腸等の癌では G P C 3 は陰性であり、また、肝硬変、慢性肝炎等の良性的肝疾患においても陰性であることを確認した。更に本発明者等は、肝細胞癌の外科的治療後の患者において、術後の血清中 G P C 3 が陰性になることも確認した。

ヒト G P C 3 タンパク質のアミノ酸配列は公知であり、例えば G e n B a n k のタンパク質データベースに A c c e s s i o n N o . N P 0 0 4 4 7 5 として登録されており、当業者であれば容易に入手することができる。本発明者等は次に、種々のタンパク質が i n v i v o において抗原提示細胞上に提示される場合に、9 個のアミノ酸からなるペプチド (ノナペプチド) に分解されてから提示されることを考慮し、日本人全体の 6 0 % を占める H L A - A 2 4 に対する結合モチーフを有する G P C 3 由来の 9 個のアミノ酸

10

20

30

40

50

または10個のアミノ酸からなる部分ペプチドを合成した。

H L A - A 2 4 に対する結合モチーフを有するペプチドの選択は、例えば (J . I m m u n o l . , 1 5 2 , 3 9 1 3 , 1 9 9 4 ; J . I m m u n o l . 1 5 5 : 4 3 0 7 , 1 9 9 4) に記載の方法に基づいて行うことができる。H L A - A 2 4 以外のH L A の型についても同様にペプチドを選択することが可能である。あるいはまた、最近インターネット上で利用可能となっているソフトウェア、例えばP a r k e r K . C . , J . I m m u n o l . 1 5 2 , 1 9 9 4 に記載されているもの等を用いて、種々のペプチドとH L A 分子 (H L A 抗原と呼ばれることもある) との結合親和性を *i n s i l i c o* で計算することもできる。尚、H L A 分子との結合親和性は、例えば上記のソフトウェアを利用できるB I M A S : H L A B i n d i n g P r e d i c t i o n : http://biomas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/ (P a r k e r , K . C . ら , J . I m m u n o l . , 1 5 2 , 1 9 9 4) 、あるいはN u k a y a , I . , I n t . J . C a n c e r , 8 0 , 1 9 9 9 等に記載の方法を用いて推定することができる。

10

9 - m e r 及び10 - m e r ペプチドは、得られたG P C 3 タンパク質の全アミノ酸配列に基づいて、任意の位置からのペプチドを合成して得ることができる。ペプチドの合成は、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。通常用いられる合成方法は、例えば、P e p t i d e S y n t h e s i s , I n t e r s c i e n c e , N e w Y o r k , 1 9 6 6 ; T h e P r o t e i n s , V o l 2 , A c a d e m i c P r e s s I n c . , N e w Y o r k , 1 9 7 6 ; ペプチド合成、丸善 (株) 、1 9 7 5 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) 、1 9 8 5 ; 医薬品の開発 続第14巻・ペプチド合成、広川書店、1 9 9 1 等の文献や、国際公開W O 9 9 / 6 7 2 8 8 号等の公報に記載されている。H L A 分子とペプチドとの実際の結合は、T A P 欠損T 2 あるいはR M A - S 細胞株に当該H L A 遺伝子を発現させたトランスフェクタントとペプチドをインキュベートし、細胞表面に発現するH L A クラスI 分子をフローサイトメーターで定量して測定することができる (例えばI m m u n o l . L e t t . 2 0 0 2 A u g 1 , 8 3 (1) : 2 1 - 3 0 ; I m m u n o g e n e t i c s , 4 4 : 2 3 3 - 2 4 1 , 1 9 9 6 ; N a t u r e 3 4 6 : 3 2 1 - 3 2 5 , 1 9 9 0 を参照のこと) 。

20

H L A 分子としては、日本人の多く (6 0 %) が保有しているA 2 4 型を用いることが有効な結果を得るために好ましく、更に好ましくはA * 2 4 0 2 等のサブタイプである。しかしながら、臨床においては、治療を必要とする患者のH L A 分子の型を予め調べることにより、これとの結合親和性、あるいは抗原提示による細胞傷害性T 細胞 (C T L) 誘導能の高いペプチドを適宜選択することができる。更に、結合親和性及びC T L 誘導能の高いペプチドを得るために、天然に存在するG P C 3 部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて1 個または2 個のアミノ酸の置換または付加を行うこともできる。天然において提示されるペプチド以外にも、既にH L A 分子に結合して提示されるペプチドの配列の規則性が知られているので (J . I m m u n o l . , 1 5 2 , 3 9 1 3 , 1 9 9 4 ; I m m u n o g e n e t i c s . 4 1 : 1 7 8 , 1 9 9 5 ; J . I m m u n o l . 1 5 5 : 4 3 0 7 , 1 9 9 4) 、得られたペプチドに対してこれらの規則性に基づいた改変を行っても良い。例えば、H L A - A 2 4 結合親和性の高いものはペプチドのN 末端から2 番目のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンに置換したり、C 末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換したペプチドも好適に使用することができる。

30

40

しかしながら、ペプチドの配列が他の機能を有する内在性または外来性のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一となる場合には、自己免疫疾患等の副作用が生じたり、あるいは特定の物質に対するアレルギー症状を引き起こしたりする可能性があるため、利用可能なデータベースを用いてホモロジー検索を行い、他のタンパク質のアミノ酸配列と一致することを避けるのが好ましい。更に、ホモロジー検索において、アミノ酸が1 個または2 個異なるペプチドも存在しないことが明らかであれば、H L A 分子との結合親和性及び / またはC T L 誘導能を高めるための上記アミノ酸配列の改変もこのような問題を生じるお

50

それがない。

上記のようにしてHLA分子との結合親和性の高いペプチドは、癌ワクチンとして有効である可能性が高いことが予想されるが、高い結合親和性を有することを指標として選択した候補ペプチドについて、実際にCTL誘導能を有するか否かを検討することが必要である。CTL誘導能の確認は、例えばHLA分子を有する抗原提示細胞（例えばB-リンパ球、マクロファージ、樹状細胞）、具体的にはヒト末梢血単核細胞由来の樹状細胞等を誘導し、ペプチドで刺激した後にCD8陽性細胞と混合し、標的細胞に対する細胞傷害活性を測定する。あるいはまた、Nakatsura, T.ら（Eur. J. Immunol. 32, 826-836 (2002)）に記載の方法に基づいてPBMCからペプチド特異的CTLを誘導することができる。更に、反応系として、ヒトHLA分子を発現するように作製されたトランスジェニック動物（例えば、Hum. Immunol. 2000 Aug.; 61(8): 764-79 Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response., BenMohamed L., Krishnan R., Longmate J., Auge C., Low L., Primus J., Diamond D.J.に記載のもの）を用いることもできる。細胞傷害活性は、例えば標的細胞を⁵¹Cr等で放射標識し、標的細胞から遊離した放射活性から計算することができる。あるいはまた、ペプチドを負荷した抗原提示細胞の存在下でCTLが産生・放出したIFN- γ 及び抗IFN- γ モノクローナル抗体によって培地上に可視化されるスポットを測定することによって観察することもできる。

上記のようにしてペプチドのCTL誘導能を検討した結果、以下の配列番号5～16に示すアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれるノナペプチドまたはデカペプチドが特に高いCTL誘導能を有することが明らかとなった。

Ser-Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu（配列番号5）

Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu（配列番号6）

Met-Phe-Lys-Asn-Asn-Tyr-Pro-Ser-Leu（配列番号7）

Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile-Leu（配列番号8）

Lys-Phe-Ser-Lys-Asp-Cys-Gly-Arg-Met-Leu（配列番号9）

Trp-Tyr-Cys-Ser-Tyr-Cys-Gln-Gly-Leu（配列番号10）

Lys-Tyr-Trp-Arg-Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu（配列番号11）

Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Leu（配列番号12）

Ile-Tyr-Asp-Met-Glu-Asn-Val-Leu-Leu（配列番号13）

Ala-Tyr-Tyr-Pro-Glu-Asp-Leu-Phe-Ile（配列番号14）

Phe-Tyr-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Tyr-Ile（配列番号15）

Arg-Phe-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Tyr-Asp-Leu（配列番号16）

本発明は更に、配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列において1個または2個のアミノ酸が置換または付加されており、細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチドも提供する。1個または2個のアミノ酸の置換または付加は、他のタンパク質のアミノ酸配列との一致がない限りにおいて、CTL誘導能を有し得る。特に、アミノ酸の置換として、N末端から2番目のアミノ酸のフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンへの置換、C末端のアミノ酸のフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、

トリプトファンまたはメチオニンへの置換は好適な例である。

上記の本発明のペプチドは、1種または2種以上の組み合わせとして、生体内でCTLを誘導し得る癌ワクチンとして使用することができる。本発明のペプチドの投与により、抗原提示細胞のHLA分子に当該ペプチドが高密度に提示され、提示されたペプチドとHLA分子との複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導され、標的細胞となるべき肝細胞癌細胞に対する攻撃力が高まる。あるいは、被験者から樹状細胞を取り出して本発明のペプチドで刺激することにより、細胞表面に本発明のペプチドを負荷した抗原提示細胞が得られ、これを再度被験者に投与することで被験者においてCTLを誘導し、標的細胞に対する攻撃力を高めることができる。

すなわち、本発明は、本発明のペプチドを1種以上含む、腫瘍の治療または腫瘍の増殖・転移等の予防のための医薬を提供するものである。尚、*in vivo*及び*in vitro*において、本発明のペプチドによる抗原提示細胞の刺激は、細胞に対して高濃度のペプチドを存在させることによって、当該細胞に予め負荷されているペプチドとの交換が生じ、容易に行われる。このため、HLA分子との結合親和性はある程度以上高いことが必要とされる。

本発明の医薬は、本発明のペプチドを単独で直接投与しても良いが、通常用いられる製剤学的方法によって製剤化した医薬組成物として投与しても良い。その場合、本発明のペプチドの他に、通常医薬に用いられる担体、賦形剤等を適宜含むことができ、特に限定されるものではない。

本発明のペプチドを有効成分とする肝細胞癌の治療及び/または予防のための医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントと共に投与したり、他の抗癌剤等の有効成分と共に投与したり、また粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献(Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能である。また、リボソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、経口投与、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが利用でき、全身投与、あるいは目的となる腫瘍の近傍に局所投与しても良い。本発明のペプチドの投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法等により適宜調整することができるが、通常0.001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~1000mg、より好ましくは0.1mg~10mgであり、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。当業者であれば、適当な投与量を適宜選択することが可能である。

あるいはまた、本発明は、本発明のペプチドとHLA分子との複合体を表面に提示している、エキソソームと呼ばれる細胞内小胞を提供する。エキソソームの調製は、例えば特表平11-510507号、及び特表2000-512161号に詳細に記載されている方法を用いて行うことができるが、好ましくは治療及び/または予防の対象となる被験者から得た抗原提示細胞を用いて調製する。本発明のエキソソームは、上記本発明のペプチドと同様に癌ワクチンとして接種することができる。

HLA分子としては、治療及び/または予防を必要とする被験者のHLA分子と同じ型のものであることが必要である。例えば、日本人の場合にはHLA-A24、特にHLA-A*2402とすると好適であることが多い。

本発明はまた、本発明のペプチドを用いた抗原提示細胞の誘導方法も提供する。樹状細胞を末梢血単球から誘導した後、*in vitro*または*in vivo*で本発明のペプチドと接触(刺激)させ、抗原提示細胞を誘導することができる。本発明のペプチドを被験者に投与した場合、被験者の体内で本発明のペプチドを負荷した抗原提示細胞が誘導される。あるいは、抗原提示細胞に本発明のペプチドを*in vitro*で負荷した後に被験者にワクチンとして投与することもできる。

本発明はまた、GPC3タンパク質または上記本発明のペプチドを含む、その部分ペプチドをコードする遺伝子を*in vitro*で抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性T細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法を提供する。導入する遺伝子はDNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。導入の方法は当分野において通常行

10

20

30

40

50

われるリポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法等の種々の方法を用いれば良く、特に限定するものではない。具体的には、例えば *Cancer Res.*, 56: 5672, 1996; *J. Immunol.*, 161: 5607, 1998; *J. Exp. Med.*, 184: 465, 1996; 特表2000-509281号に記載のようにして行うことができる。遺伝子を抗原提示細胞に導入することによって、当該遺伝子は細胞中で転写、翻訳等の処理の後、得られたタンパク質がHLAクラスIまたはクラスIIのプロセッシング及び提示経路を経て、部分ペプチドが提示される。

本発明は更に、上記本発明のペプチドを用いてCTLを誘導する方法を提供する。本発明のペプチドを被験者に投与した場合、被験者の体内でCTLが誘導され、肝細胞癌細胞を標的とした免疫力が増強される。あるいは、被験者由来の抗原提示細胞及びCD8陽性細胞、または末梢血単核球を *in vitro* で本発明のペプチドと接触（刺激）させ、CTLを誘導してから被験者にもどす *ex vivo* の治療方法にも用いることができる。

10

本発明は更に、本発明のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性T細胞を提供する。本発明のペプチドを提示した抗原提示細胞による刺激に基づいて誘導された細胞傷害性T細胞は、好ましくは治療及び/または予防の対象である被験者由来のものであり、単独、または、本発明のペプチド、エキソソーム等を含む、他の医薬と共に抗腫瘍効果を目的として投与することができる。

本発明は更に、HLA分子と本発明のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞を提供する。本発明のペプチド、あるいは本発明のペプチドを含むGPC3タンパク質、またはその部分ペプチドをコードする遺伝子との接触によって得られる当該抗原提示細胞は、好ましくは治療及び/または予防の対象である被験者由来のものであり、単独、または、本発明のペプチド、エキソソーム、細胞傷害性T細胞等を含む、他の医薬と共にワクチンとして投与することができる。

20

本発明は更に、GPC3に対する抗体を含む、肝細胞癌の診断剤を提供する。GPC3に対する抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれでも良く、当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座1，タンパク質I，389-406，東京化学同人」参照）により調製することが可能である。GPC3タンパク質はアミノ酸配列が前記のように公知であり、当該アミノ酸配列に基づいて通常のタンパク質発現技術を用いて製造でき、また市販のもの（Santa Cruz, CA）を利用することも可能である。市販のGPC3を用いる場合は、必要に応じてSDS-outTM（Sodium Dodecyl Sulfate Precipitation Reagent; Pierce, Rockford, ILより購入）を用いてSDSを除いて使用することが好ましい。またGPC3の部分ペプチドは、GPC3のアミノ酸配列から適当な部分配列を選択し、通常のペプチド合成技術を用いて製造できる。

30

ポリクローナル抗体の調製は、まず、例えば、ウサギ、モルモット、マウス、ラット、ハムスター、ニワトリ、サルなどの動物にGPC3タンパク質またはその部分ペプチドを感作抗原として投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント（FIAやFCA）と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。

40

一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、GPC3タンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46）等に準じて行うことができる。得られたハイブリドーマは、通常の選択培養

50

液、例えばH A T培養液（ヒボキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記H A T培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間継続する。次いで、目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。

また、本発明の抗体は、遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生させても良い。例えば、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、V andamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

10

本発明で使用する抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。次に、形質転換させた宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。

モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる精製により行うことができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、例えば、上記アフィニティークラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる。

20

本発明で使用する抗体は、抗体の全体分子に限られずGPC3に結合する限り、抗体の断片又はその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させた単鎖Fv(scFv)が挙げられる。尚、本発明の目的のためには、抗体はGPC3のいかなるエピトープを認識するものであっても良い。

診断剤としての正確性のためには、抗体はヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、GPC3タンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞に導入することにより調製できる。また、ヒト抗体は、免疫グロブリン遺伝子をヒトと入れ換えたマウスにGPC3タンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

30

本発明の診断剤において、限定するものではないが、抗体は例えば1 µg/mlの濃度で用いることができる。診断剤には上記GPC3に対する抗体の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体等を適宜含有させることができる。

本発明は更に、サンプルとGPC3に対する抗体を接触させることを含む、肝細胞癌の診断方法を提供する。診断方法は、更にサンプル中のGPC3を定量することを含み得る。本発明において、サンプルは、HCCに罹患しているおそれのある被験者から得られる血清、唾液、尿等が挙げられるが、特に好ましくは血清である。サンプルと上記抗体との接触は、当分野において通常行われている方法に基づいて行えば良く、特に限定するものではない。診断は、例えばサンプルと上記抗体との接触の後、サンプル中に存在し得るGPC3と抗体との特異的結合を、蛍光物質や発光物質、酵素等で標識した二次抗体等を使用して定量的に検出することにより行うことができる。また、診断のための反応をウェル等の液相中で行っても良く、あるいはGPC3に対する抗体を固定した固相支持体上で行っても良い。この場合、HCCに罹患していない正常なサンプル、あるいはHCCであることが判明しているサンプルを用いて予め作製した標準値と比較することによって、測定された値がHCC陽性であるか否かを判定することができる。また、診断の際には、多数

40

50

のHCC患者と健常人の血清中GPC3量を測定して、カットオフ値を設定することが好ましい。

本発明の診断方法は、HCCに罹患しているか否かの診断に用いることができる他、HCCに対する治療の効果を確認するために経時的に行うこともできる。

更に本発明は、GPC3に対する抗体を含む、HCCの診断のためのキットを提供する。当該キットには、GPC3に対する抗体の他、二次抗体、定量的ための標準サンプル、バッファー等を含めることができる。

以下、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] HCCで特異的に過剰発現するGPC3遺伝子の同定

cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現のプロファイリングは先に報告したように行った(Okabe, H.ら, Cancer Res. 61, 2129-2137(2001))。肝切除術を行った20名の患者から、原発性HCC及び対応する非癌性肝臓組織を得た。そのうち10例はB型肝炎表面抗原陽性、10例はC型肝炎ウイルス(HCV)陽性であり、HBV及びHCVの双方に感染している例はなかった。HBV陽性及びHCV陽性のもので、年齢、性別、分化の程度、血管の浸潤、腫瘍の段階に関して有意な差異はなかった。National Center for Biotechnology InformationのUniGeneデータベースから選択した23,040種のcDNAを含む「ゲノムワイドの」cDNAマイクロアレイを作製した。HCC及び対応する非癌性肝臓組織間での発現プロファイルを比較してHCCにおいて特異的に過剰発現している遺伝子を探索し、その結果、HCC患者に対する免疫治療の候補であり、おそらくは理想的な標的であり得るGPC3を同定した。20例のHCC中16例において、癌組織におけるGPC3 mRNAの発現は非癌性組織における発現よりも5倍以上高かった(図1)。すなわち、GPC3はほとんどのHCCにおいて過剰発現しており、B型肝炎ウイルス(HBV)またはHCV感染とは関連していなかった。一方、GPC3 mRNAは胎盤、胎児肝臓、胎児肺、及び胎児腎臓において高発現しており、成人の正常組織のほとんどで発現が低かった(図1)。これらのGPC3に関するデータは、ノーザンブロットング研究に基づいて公表されているものと一致した(Zhu, Z.W.ら, Gut 48, 558-564(2001); Hsu, H.C.ら, Cancer Res. 57, 5179-5184(1997); Pellegrini, M.ら, Dev Dyn 213, 431-439(1998))。この結果から、GPC3は - フェトタンパク質(AFP)と同様に、HCCにおける新規な癌胎児性抗原であることが明らかとなった。

[実施例 2] ヒトHCC細胞系におけるGPC3 mRNA及びHLA-A24の発現

CTLアッセイのための標的HCC細胞系を選択するために、逆転写-PCR(RT-PCR)を用いたGPC3 mRNA発現、抗HLAクラスI(w6/32、IgG2a)または抗HLA-A24(IgG2)モノクローナル抗体(VERITAS、東京)、及びFITCコンジュゲートヤギ抗マウスIgG(ICN/CAPPEL、Aurora、OH)を用いた免疫染色及びフローサイトメトリーによるHLA-クラスI及び-A24の発現を検討した。HCC細胞系であるHep G2、Hep 3B、PLC/PRF/5、及びHuH-7は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。またSK-Hep-1は久留米大学のK. Itoh博士よりご供与頂いた。

RT-PCRは公知の方法(例えばNakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944(2001))に従って行った。939bpの断片を増幅するGPC3遺伝子特異的PCRプライマーを設計し、これを用いて94℃、5分の初期変性、及び58℃のアニーリング温度での30増幅サイクルからなるRT-PCR反応を行った。用いたGPC3 PCRプライマー配列は、

センス：5'-GTTACTGCAATGTGGTCATGC-3'（配列番号1）

アンチセンス：5'-CTGGTGCCCAGCACATGT-3'（配列番号2）であり、

対照実験のための β -アクチンPCRプライマー配列は、

センス：5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'（配列番号3）

アンチセンス：5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'（配列番号4）である。

対照である β -アクチンmRNAによる標準化の後、HCC細胞系におけるGPC3 mRNAの発現を比較した。

10

その結果、HepG2、Hep3B、及びHuH-7 HCC細胞系においてGPC3 mRNAの強い発現が示され、PLC/PRF/5細胞系において中程度の発現が示されたが、SK-Hep-1ではそのような発現は見られなかった（図2）。尚、HepG2及びSK-Hep-1はHLA-A24を発現したが、Hep3B及びHuH-7は発現しなかった。

【実施例3】 末梢血単核球（PBMC）の刺激による腫瘍応答性CTLの誘導

先行技術（Kubo, R. T. ら, J. Immunol. 152, 3913-3924 (1994)）に基づいて、HLA-A24分子に結合することが予想されるGPC3由来ペプチドを探索し、12種の異なるペプチドを合成して使用した（表1）。これらのペプチドは、Fmoc/PyBOP法を用いて合成したものであり（後記参考例1～12を参照のこと）、biologica（東京）から購入した。ペプチドの純度は、HPLCでいずれも95%を超えることが確認された。

20

表 1 GPC3ペプチドで刺激したHLA-A24陽性のHCC患者のPBMCからのHLA-A24拘束性肝細胞癌反応性CTLの誘導率

GPC3ペプチド			ペプチドによるPBMCからのCTLの誘導											
No.	位置	配列	結合スコア ^a	HLA-A24陽性HCC患者										各ペプチドのCTL誘導率
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	GPC3 40-49	SFFQRLQPGL	24	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	3/8
2	GPC3 41-49	FFQRLQPGL	36	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2/8
3	GPC3 129-137	MFKNNYPSL	20	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	3/8
4	GPC3 148-157	FTDVSLYL	24	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	3/8
5	GPC3 247-256	KFSKDCGRML	40	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	3/8
6	GPC3 260-268	WYCSYCQGL	240	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3/8
7	GPC3 294-303	KYWREYILSL	400	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	3/8
8	GPC3 298-306	EYILSLEEL	330	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1/8
9	GPC3 313-321	IYDMENVLL	200	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2/8
10	GPC3 360-368	AYYPEDLFI	60	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	3/8
11	GPC3 401-409	FYSALPGYI	60	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	3/8
12	GPC3 521-530	RFLAELAYDL	72	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	4/8
各患者のCTL誘導率				4/12	4/12	2/12	2/12	6/12	5/12	2/12	7/12	3/12		

^a, 各配列を有する分子の解離の半減期の評価(BIMAS: HLA Binding Prediction: Dr. Kenneth Parkerの研究より :http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/;^b, +はペプチド特異的かつHLA-A24+ 腫瘍細胞に反応性のCTLの誘導が成功したことを示す。

インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部外科学第二講座において治療中のHLA-A24⁺HCC患者から血液サンプル30mlを得、先に報告したように(Nakatsura, T.ら, Eur. J. Immunol. 32, 826-836(2002))、Ficoll-Conray密度勾配遠心法によってPBMCを単離した。HLA-A24結合モチーフを有するglypican-3由来のペプチド12種(表1、No. 1~12: 配列番号5~16に対応)について、8名のHLA-A24⁺HCC患者

10

20

30

40

50

(P t 1 ~ 8) から得た P B M C から H L A - A 2 4 拘束性で、かつ腫瘍応答性の C T L を誘導する能力について検討した (図 3 、 表 1) 。 P B M C からペプチド特異的 C T L を誘導する方法は、先に報告した方法 (Nakatsura, T. ら, Eur. J. Immunol. 32, 826 - 836 (2002)) を用いた。C T L の表面表現型は F I T C - コンジュゲート抗 - C D 3 、 - C D 4 、または - C D 8 モノクローナル抗体 (ニチレイ、東京) を用いた直接免疫蛍光染色によって検討した。エフェクター細胞及び H L A 拘束性を決定するために、培養開始時に各 20 μ g / m l の抗 - H L A - クラス I (W 6 / 3 2 、 I g G 2 a) 、抗 - H L A - A 2 4 (0 0 4 1 H A 、 I g G 2 a) 、抗 - C D 8 (Nu - Ts / c 、 I g G 2 a) 、抗 - H L A - D R (H - D R - 1 、 I g G 2 a) 、及び抗 - C D 4 (Nu - Th / I 、 I g G 1) モノクローナル抗体を添加した。アイソタイプが合った対照として、抗 - C D 1 3 (M C S - 2 、 I g G 2 a) 及び抗 - C D 1 4 (J M L - H 1 4 、 I g G 1) モノクローナル抗体を使用した。3 ~ 4 週間後、これらの C T L 株の数は P B M C の培養前の数と比較して約 10 倍に増加した。次にこれらの C T L 株の H C C 細胞株に対する細胞傷害活性を 6 時間の 51 Cr 放出アッセイによって検討した。結果を図 3 及び表 1 に示す。96 種中 33 種 (34.4%) の C T L 株が、H L A - A 2 4 - G P C 3 $^{+}$ の H e p 3 B 及び H u H - 7 、及び H L A - A 2 4 $^{+}$ G P C 3 $^{-}$ の S K - H e p - 1 に対してよりも、H L A - A 2 4 $^{+}$ G P C 3 $^{+}$ の H e p G 2 に対して強い細胞傷害性を示した。この細胞傷害性はペプチド特異性を示し、抗 - H L A - クラス I 、抗 - C D 8 または抗 - H L A - A 2 4 モノクローナル抗体によって阻害されることから、これらの T 細胞応答が H L A - A 2 4 拘束性の C D 8 $^{+}$ C T L によって担われていることが示される。各ペプチドまたは各患者における C T L の誘導率を表 1 に示す。これらの結果から、G P C 3 由来の 12 種のペプチドの全てが C T L 誘導能を有し、H L A - A 2 4 拘束性の G P C 3 由来ペプチド特異的 C D 8 $^{+}$ C T L 株が 8 名の H C C 患者の全員において誘導されたことが示される。

[実施例 4] H C C における G P C 3 タンパク質の発現

4 名の H C C 患者から切除した肝臓組織周辺の H C C 及び非癌性領域における G P C 3 のウエスタンブロッティング解析及び免疫組織化学分析を行った。

ウエスタンブロッティングは以下のように行った。サンプルを適量の溶解用バッファー (150 m M N a C l 、50 m M T r i s 、p H 7.4、1% N o n i d e t P - 40、1 m M オルトバナジウム酸ナトリウム (和光純薬工業 (株)) 、1 m M E D T A 、及びプロテアーゼ阻害剤タブレット (A m e r s h a m , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L)) 中で溶解した。溶解物の上清を S D S - P A G E ゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜 (B i o - R a d , H e r c u l e s , C A) にトランスファーした。5% 脱脂乳、0.2% T w e e n 20 を含有する T r i s 緩衝生理食塩水中でブロッキングした後、この膜を、G P C 3 303 - 464 のアミノ酸に対応する組換えタンパク質に対して作製された抗 - G P C 3 ウサギポリクローナル抗体 (S a n t a C r u z , C a l i f o r n i a) と共にインキュベートし、P B S でよく洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗 - ウサギ I g 、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合 F (a b ') $_2$ 断片 (ロバ由来) (A m e r s h a m) を用い、E C L キット (A m e r c h a m) を使用して化学発光検出を行った。

免疫組織化学分析は、当分野において公知の方法に従って行った (Nakatsura, T. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936 - 944 (2001)) 。O C T 包埋用化合物に包埋した厚さ 4 μ m の組織サンプル切片を 1 : 200 に希釈した抗 - G P C 3 抗体と共に染色した。陽性対照のために 45 k D a タグ付き融合タンパク質として大腸菌から産生される G P C 3 303 - 464 (S a n t a C r u z , C A) 及び抗 - g l y p i c a n - 3 ウサギポリクローナル抗体のビオチン化のために F l u o R e p o r t e r M i n i - B i o t i n - X X P r o t e i n L a b e l i n g K i t (F - 6347) (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . , E u g e n e) を使用した。96 ウェルの E L I S A プレート (N u n c , D e n m a r k) を 4 で一晩、P B S 、p H 7.4 中 0.1 μ g / ウェルの抗 - ヒト G P

C3 303-464 (Santa Cruz) でコートした。次いで、4%ウシ血清アルブミン/PBSを用い、室温で1時間、プレートをブロッキングした。陽性対照の標準サンプル及び培養上清をビオチン化抗-GPC3抗体と共に添加し、室温で2時間インキュベーションした。PBSで3回洗浄した後、各ウェルにHRP-コンジュゲートストربتアビジン (ENDOGEN, Woburn) を添加した。30分のインキュベーションの後、プレートをPBSで3回洗浄し、TMB基質溶液 (ENDOGEN) を添加した。解析のためにELISAリーダー (モデル550、Bio-Rad) を405nmで用いた。

インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部外科学第二講座において治療中のHCC患者から組織サンプルを得た。4種の腫瘍全てにおいて、GPC3タンパク質の発現がHCC細胞において非癌性肝細胞と同程度に低いという同様の結果が得られた。従って、HCC細胞中におけるGPC3 mRNA発現とGPC3タンパク質発現の間に矛盾が生じる。GPC3はGPI-アンカー型膜タンパク質であり、分泌タンパク質である可能性が報告されている (Filmus J., Glycobiology 11, 19R-23R (2001))。そこで、次に分泌されたGPC3タンパク質の検出を試みた。
[実施例5] HCC細胞株の培養上清及びHCC患者血清中における可溶性GPC3タンパク質の検出

HepG2の培養上清中に可溶性GPC3タンパク質が存在するか否かを検討するために、所定の培養期間の後に回収したHepG2細胞溶解物及び培養上清についてウエスタンブロッティングを行った。無血清培地における6、12、24、及び48時間の培養後に 1×10^5 個のHepG2細胞から調製した細胞溶解物は、同様の量の60kDaのGPC3タンパク質の存在を示した (図4のレーン1、3、5、及び7)。一方、6、12、24、及び48時間の培養後のHepG2培養上清 (1ml/ウェルの20 μ l) では60kDaのGPC3タンパク質が漸増しており、GPC3タンパク質がHepG2から培養上清中に分泌されたことを示した。

次いで、抗-GPC3 303-464抗体及びビオチン化抗-GPC3抗体を用いて酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) による検出を行った。GPC3 303-464に対応する市販の組換えタンパク質を用い、ELISA系におけるGPC3の定量の精度を確認した。HepG2培養上清の連続希釈を用い、ODデータに基づいてGPC3タンパク質を定量する標準曲線の評価した。 1×10^5 個のHepG2細胞を24時間培養した後の培養上清1ml中のGPC3タンパク質の濃度を1U/mlと定義した。HepG2培養上清中のGPC3タンパク質の量はHep3Bよりはるかに多く、一方SK-Hep-1においては検出できなかった (図5)。

次に、HCC患者血清中の可溶性GPC3タンパク質の検出を行った (図6)。28名のHCC患者から血液サンプルを採取し、医療記録から患者のプロファイルを集めてUICC TNM分類に基づいて臨床段階を決定した。患者7 (Pt7、図6のレーン3) の血清20 μ l中に60kDaのGPC3タンパク質のバンドが検出されたが、他の2名のHCC患者及び4名の健康なドナーの血清からは検出されなかった。次に28名のHCC患者及び54名の健康なドナー (HD) の血清中のGPC3タンパク質の量をELISAによって評価した (図7)。54名のHD血清中のGPC3タンパク質の平均は0.75 U/mlであり、標準偏差 (SD) は0.32であった。男女間で発現に差はなく、従って卵巣でのGPC3の弱い発現は、この系に関して無視できると考えられた。28名のHCC患者の平均値は1.98 U/mlであった。血清中のGPC3タンパク質の正常上限値を決定するために、54名のHD血清のGPC3タンパク質の平均+3SDとして1.71を規定した。HCC患者の35.7% (10/28)、HDの0% (0/54) がGPC3タンパク質陽性 (>1.71) であった。HCC患者血清中のGPC3タンパク質の濃度は、HDにおける濃度よりも有意に高かった ($P < 0.0001$)。患者4、5及び7についてELISAで評価したGPC3の濃度は、図6に示すようにそれぞれ0.94、1.73、及び69.4 U/mlであった (表2)。すなわち、ウエスタンブロッティングでは69.4 U/mlのGPC3タンパク質は検出できるが、1.73 U/mlの

10

20

30

40

50

G P C 3 は検出できなかった。

表 2 の結果から明らかなように、10 名の G P C 3 - 陽性患者のうち 2 名（患者 6 及び 25）は A F P 及び P I V K A - I I の双方が陰性であり、その一方の患者（患者 6）は比較的初期の U I C C ステージ I I として分類された。すなわち、A F P 及び P I V K A - I I の双方が陰性の患者において G P C 3 が陽性となる場合があることから、G P C 3 は H C C の新規な腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなった。

表 2 HCC患者28例の血清中のAFP, PIVKA-IIと GPC3の測定結果

Pt ID	年齢(y)	性別	ウイルス ^a	UICC Stage	AFP(ng/ml) ^b (<20) ^c	PIVKA-II(mAU/ml) ^d (<40)	GPC3(U/ml) ^e (<1.71)
3	56M		HBV	IVA	<u>54</u> ^e	<u>957</u>	<u>1.73</u>
5	71M		HCV	IIIB	<u>8900</u>	<u>31577</u>	<u>1.73</u>
11	69M		非B, 非C	IVA	<u>9400</u>	<u>319</u>	<u>3.23</u>
1	64M		HCV	IIIA	<u>50</u>	15	<u>9.40</u>
2	53M		HCV	II	<u>45</u>	38	<u>2.98</u>
8	69M		HCV	III	<u>21</u>	21	<u>2.22</u>
9	73M		HCV	IIIA	<u>25</u>	<u>242</u>	1.18
12	61M		HCV	IVA	<u>349</u>	<u>169</u>	1.49
17	70M		HBV	IVA	<u>56</u>	<u>133</u>	0.52
18	71F		HBV	II	<u>930</u>	<u>994</u>	0.38
19	77M		HCV	II	<u>163</u>	<u>96</u>	0.42
24	50M		HCV	II	<u>29</u>	<u>41</u>	0.28
26	63M		HBV	IVA	<u>5280</u>	<u>1549</u>	0.87
4	69M		HCV	IIIA	<u>178</u>	28	0.94
15	67M		HCV	II	<u>100</u>	32	0.83
22	72M		HCV	IIIA	<u>25</u>	12	1.67
7	62M		HCV	IVA	10	<u>239</u>	<u>69.39</u>
16	72M		HCV	II	<1	<u>840</u>	<u>1.94</u>
14	62M		HCV	II	3	<u>69</u>	0.90
20	75F		非B, 非C	IIIA	<1	<u>63</u>	0.35
27	71M		HCV	IVA	10	<u>19288</u>	0.83
6	72F		HCV	II	9	20	<u>3.09</u>
25	63M		HCV	IVB	<1	<10	<u>62.45</u>
10	58M		非B, 非C	IIIA	3	18	0.66
13	69M		HCV	IVB	6	<10	1.53
21	71M		HBV, HCV	IVA	2	26	0.52
23	59M		HBV	IIIA	3	18	1.70
28	69M		HCV	IIIA	<1	28	0.80

^a, HCV は RT-PCR を用いて検出した。HBsAg はラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて調べた。

^b, AFP は RIA を用いて定量した。

^c, 括弧内の値はカットオフインデックスを示す。

^d, PIVKA-II および GPC3 は エンザイムイムノアッセイ (EIA) を用いて定量した。

^e, 陽性の測定値に下線を付した。

[参考例 1] Ser - Phe - Phe - Gln - Arg - Leu - Gln - Pro - Gly - Leu (配列番号 5) の合成

開始レジンとして Fmoc - Leu - Wang resin (100 - 200 mesh) を用いて後記スケジュール A に従って合成を開始し、工程 5 まで進んだ後、工程 2 へ戻ることで アミノ基の脱保護、洗浄、カップリング、洗浄を繰り返し、Fmoc - Gly - OH、Fmoc - Pro - OH、Fmoc - Gln (Trt) - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Arg (Pbf) - OH、Fmoc - Gln (Trt) - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH を順次カップリングさせた結果、ペプチド結合樹脂を得た。ペプチドは工程 6 に示す試薬との反応によって樹脂から切り離され、冷メチルターブチルエーテル (MTBE) 中にろ過され、沈殿させた。沈殿したペプチドは 2 回冷 MTBE で洗浄され、窒素下で凍結乾燥された。

表 3

スケジュール A

工程		時間 (分)	x	処理 回数	
1. (洗浄)	DMF			2	
2. (脱保護)	20% ピペリジン/DMF 10ml	5	x	1	10
	20% ピペリジン/DMF 10ml	30	x	1	
3. (洗浄)	DMF			4	
	DCM			1	
4. (カップリング)	各 α アミノ基保護アミノ酸 1mmole / 0.45M HBTU/HOBT 2.1ml (1mmole), DIEA 348 μ l (2mmole)	30	x	1	
5. (洗浄)	DMF			4	20
	DCM			1	
6. (クリーベッジ)	5% H ₂ O	120	x	1	
	5% フェノール				
	3% チオアニソール				
	3% エタンジチオール				
	3% トリイソプロピルシレン				
	81% TFA				30
7. (沈殿)	MTBE				
8. (洗浄)	MTBE				
9. (凍結乾燥)					

得られた粗ペプチドは BioCad 60 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) により、粒子サイズ 10 ミクロンの C18 カラム (Phenomenex, Torrance, CA) を用いて逆相 HPLC 法によって精製された。流速 20 ml/min, 45 分で 10% B から 80% B (溶媒 A: 0.05% TFA/H₂O, 溶媒 B: 0.05% TFA/アセトニトリル) の直線濃度勾配で溶出し、溶出液を A220 nm でモニターした。面積割合で 90% 以上を占める主ピークの質量分析を Lasermax 2000 (Finnigan Mat, San Jose, CA) を用い、MALDI-TOF 法で行なった結果、理論値 [MH⁺] 1109.3 に対し、実測値 1109.9 を得た。

[参考例 2] Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu (配列番号 6) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH を順次結合させた

40

50

。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1131.3 に対し、実測値 1130.4 を得た。

[参考例 3] Met - Phe - Lys - Asn - Asn - Tyr - Pro - Ser - Leu (配列番号 7) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Pro - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Asn (Trt) - OH、Fmoc - Asn (Trt) - OH、Fmoc - Lys (Boc) - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Met - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1031.2 に対し、実測値 1032.3 を得た。

[参考例 4] Phe - Thr - Asp - Val - Ser - Leu - Tyr - Ile - Leu (配列番号 8) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Ile - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Val - OH、Fmoc - Asp (OtBu) - OH、Fmoc - Thr (tBu) - OH、Fmoc - Phe - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1121.3 に対し、実測値 1122.1 を得た。

[参考例 5] Lys - Phe - Ser - Lys - Asp - Cys - Gly - Arg - Met - Leu (配列番号 9) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Met - OH、Fmoc - Arg (Pbf) - OH、Fmoc - Gly - OH、Fmoc - Cys (Trt) - OH、Fmoc - Asp (OtBu) - OH、Fmoc - Lys (Boc) - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Lys (Boc) - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1108.3 に対し、実測値 1111.4 を得た。

[参考例 6] Trp - Tyr - Cys - Ser - Tyr - Cys - Gln - Gly - Leu (配列番号 10) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Gly - OH、Fmoc - Gln (Trt) - OH、Fmoc - Cys (Trt) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Cys (Trt) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Trp (Boc) - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1114.3 に対し、実測値 1115.7 を得た。

[参考例 7] Lys - Tyr - Trp - Arg - Glu - Tyr - Ile - Leu - Ser - Leu (配列番号 11) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Ile - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Glu (OtBu) - OH、Fmoc - Arg (Pbf) - OH、Fmoc - Trp (Boc) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Lys (Boc) - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1104.3 に対し、実測値 1105.3 を得た。

[参考例 8] Glu - Tyr - Ile - Leu - Ser - Leu - Glu - Glu - Leu (配列番号 12) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Glu (OtBu) - OH、Fmoc - Glu (OtBu) - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Ile - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Glu (OtBu) - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH+] 1371.6 に対し、実測値 1370.7 を得た。

10

20

30

40

50

[参考例 9] Ile - Tyr - Asp - Met - Glu - Asn - Val - Leu - Leu (配列番号 13) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Val - OH、Fmoc - Asn (Trt) - OH、Fmoc - Glu (Otbu) - OH、Fmoc - Met - OH、Fmoc - Asp (Otbu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Ile - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH +] 1211.4 に対し、実測値 1213.4 を得た。

[参考例 10] Ala - Tyr - Tyr - Pro - Glu - Asp - Leu - Phe - Ile (配列番号 14) の合成

Fmoc - Ile - Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Asp (Otbu) - OH、Fmoc - Glu (Otbu) - OH、Fmoc - Pro - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Ala - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH -] 1216.4 に対し、実測値 1217.4 を得た。

[参考例 11] Phe - Tyr - Ser - Ala - Leu - Pro - Gly - Tyr - Ile (配列番号 15) の合成

[参考例 10] と同様に Fmoc - Ile - Wang resin (100 - 200 mesh) を開始レジンとして用い、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Gly - OH、Fmoc - Pro - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Ala - OH、Fmoc - Ser (tBu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Phe - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH +] 1193.4 に対し、実測値 1196.8 を得た。

[参考例 12] Arg - Phe - Leu - Ala - Glu - Leu - Ala - Tyr - Asp - Leu (配列番号 16) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc - Leu - Wang resin を用い、Fmoc - Asp (Otbu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Ala - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Glu (Otbu) - OH、Fmoc - Ala - OH、Fmoc - Leu - OH、Fmoc - Phe - OH、Fmoc - Arg (Pbf) - OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH -] 1183.5 に対し、実測値 1186.7 を得た。

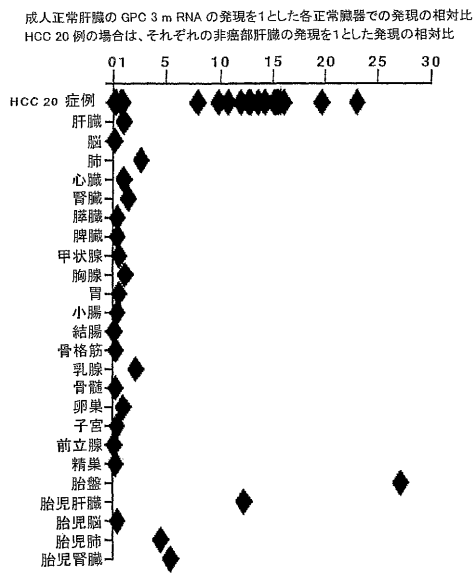
【産業上の利用の可能性】

本発明者等は、癌胎児性タンパク質である GPC3 由来の 12 種のペプチドを、HLA - A24 + HCC 患者の免疫療法の標的候補として同定した。HCC 患者における GPC3 の過剰発現に関わらず、成人の正常臓器においては、胎盤を除き、GPC3 の発現は顕著に低く、GPC3 が HCC の免疫療法の理想的な標的であり得ることが判明した。また、本発明の方法は、HCC に罹患しているか否かを診断するために非常に有用な方法であることが示された。本発明者等は更に HLA - A24 拘束性であり、かつ HCC 反応性の CTL を調製することができる GPC3 由来のペプチドを同定した。HLA - A24 アレルは日本人全体の 60 % が保有し、その 95 % の遺伝子型は A*2402 である。コーカサス人では 20 %、アフリカ人では 12 % である (Tokunaga, K. ら, Immunogenetics 46, 199 - 205 (1997); Imanishi, I. ら, Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference (Tsuji, K. ら編) 1065 - 1220 (Oxford University Press, Oxford, 1992))。これらの結果から、GPC3 は、世界中の多くの HCC 患者に対する特異的な免疫治療または癌診断及び予防における用途に対して非常に有用であることが明らかとなった。

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。

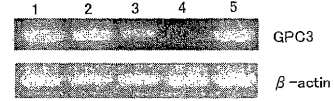
【図1】

図1



【図2】

図2



【図3】

図3

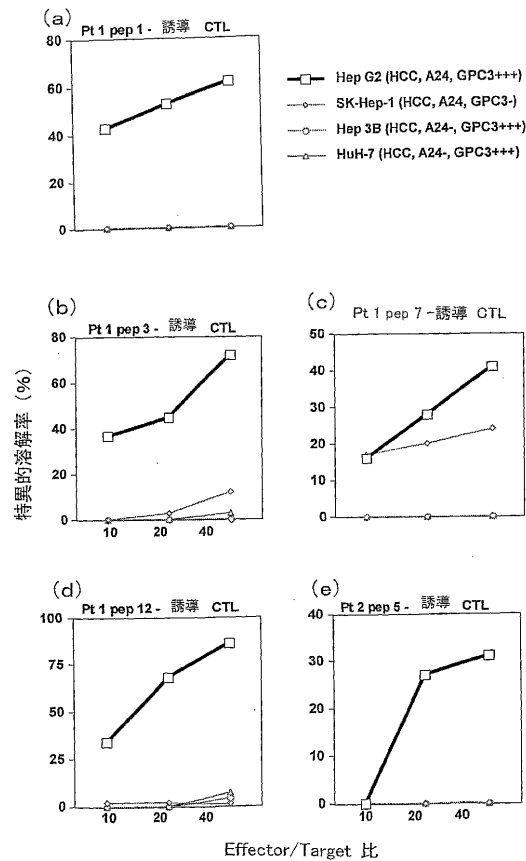
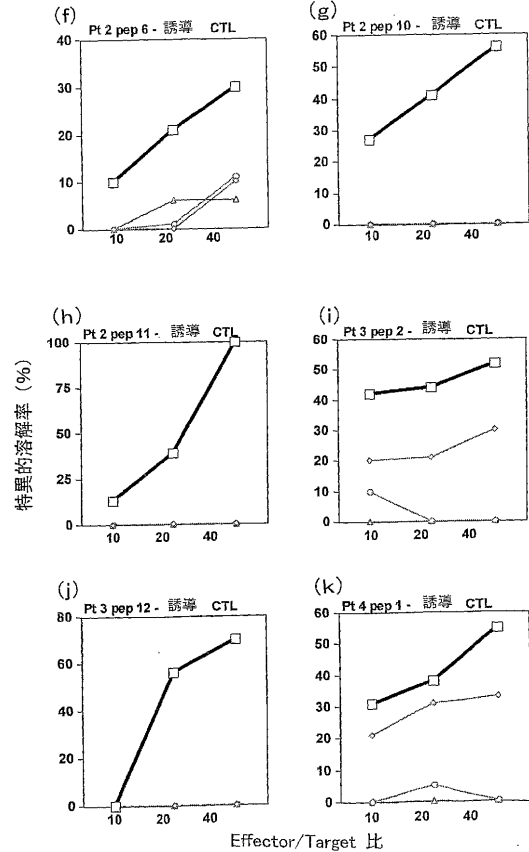
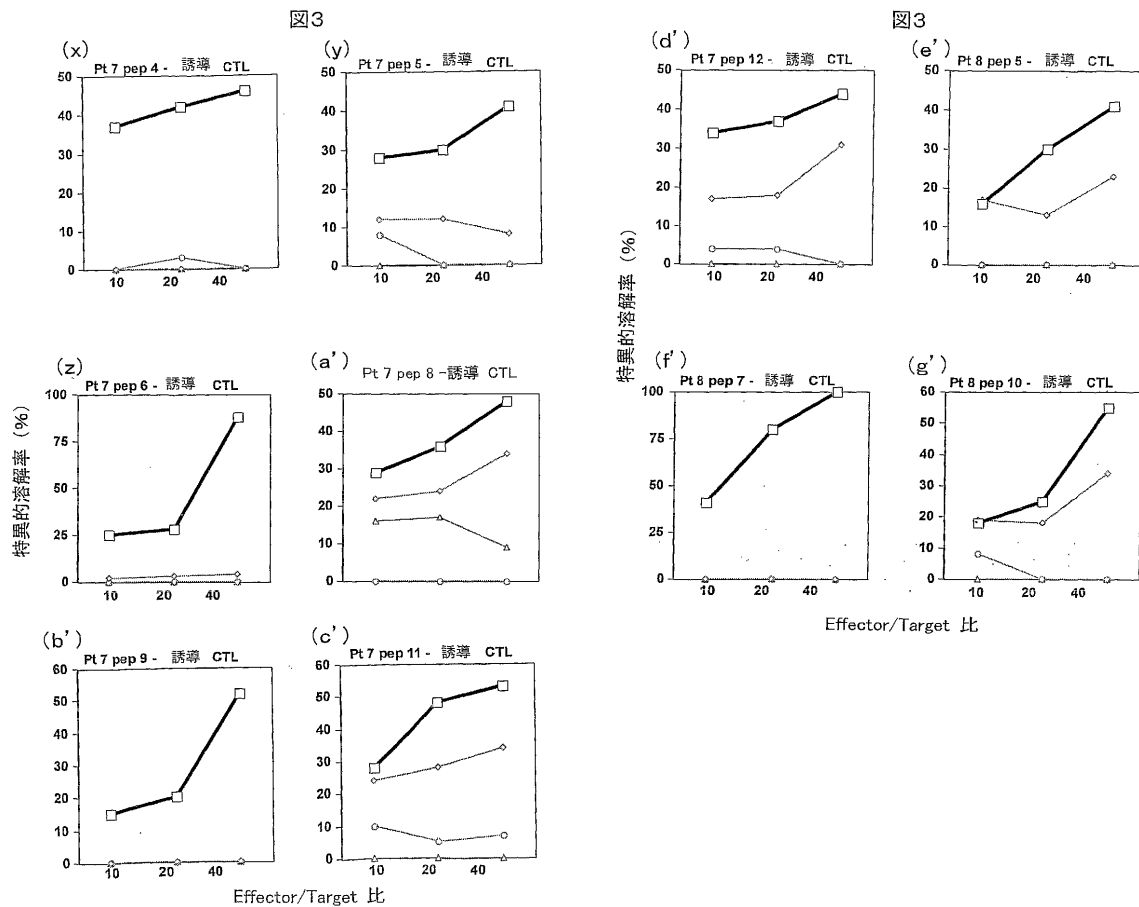
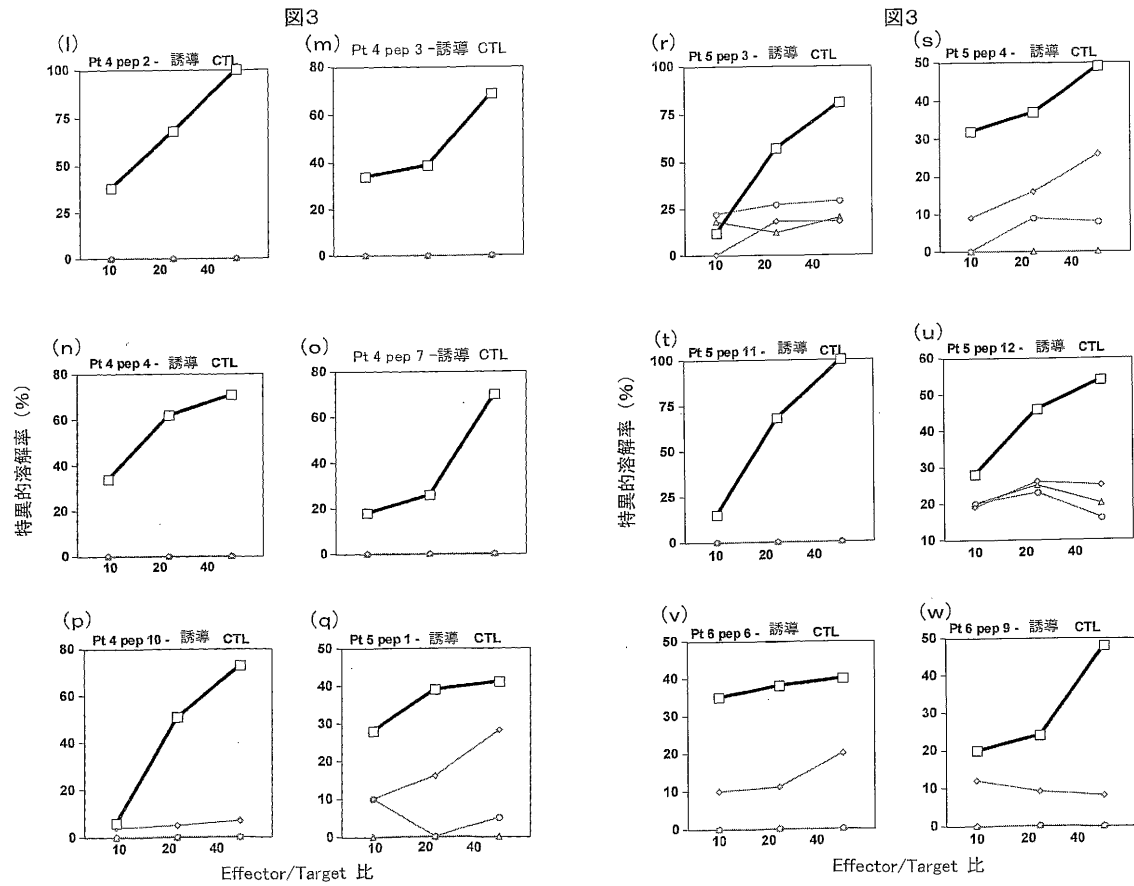


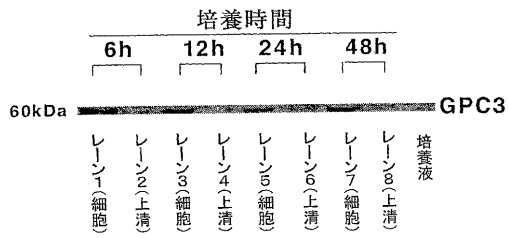
図3





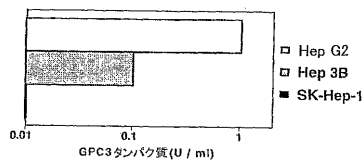
【図 4】

図 4



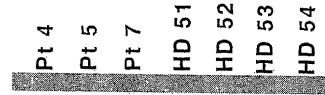
【図 5】

図 5



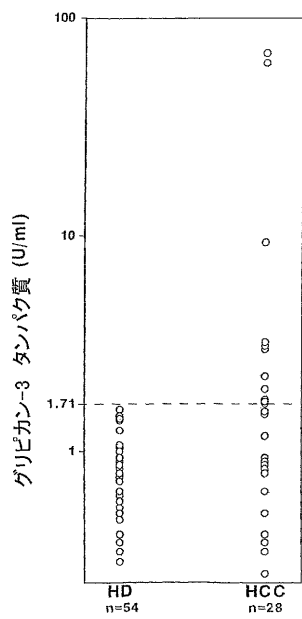
【図 6】

図 6



【図 7】

図 7



【配列表】

0004406607000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02
G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/574 A

(72)発明者 中村 祐輔
東京都港区白金台 4 - 6 - 1 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター ゲノムシーケ
ンス解析分野内

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 Gut, vol.48(4), p.558-564 (2001)
Nature Genet, vol.12(3), p.241-247 (1996)
Int J Cancer, vol.80(1), p.92-97 (1999)
Biochem Biophys Res Commun, vol.306(19, p.16-25 (2003 Jun)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C07K 5/06 ~ 14/82
C12N 15/00 ~ 15/90
PubMed