

(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  
2012年11月22日(22.11.2012)



(10) 国際公開番号  
WO 2012/157736 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/062749
- (22) 国際出願日: 2012年5月18日(18.05.2012)
- (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 2011-112210 2011年5月19日(19.05.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 栗原祥(KURIHARA, Akira), 岡野文義(OKANO, Fumiyoshi).
- (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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), ユーロパ (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, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告(条約第21条(3))  
— 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))

(54) Title: IMMUNITY INDUCTION AGENT

(54) 発明の名称: 免疫誘導剤

(57) Abstract: Provided is a novel immunity induction agent useful as a cancer treatment and/or prevention agent or the like. The immunity induction agent contains, as an active ingredient: at least one polypeptide having immunity induction activity and selected from polypeptides (a), (b), and (c), namely, (a) a polypeptide comprising at least seven successive amino acids in the amino acid sequence indicated by sequence numbers 4, 2, 22, or 24 in the sequence table, (b) a polypeptide comprising at least seven amino acids and having a sequence identity of at least 90% with respect to polypeptide (a), and (c) a polypeptide containing polypeptide (a) or (b) as a partial sequence; or a recombinant vector that can express the polypeptide in vivo and contains a polynucleotide that codes for the polypeptide.

(57) 要約: 癌の治療及び/又は予防剤等として有用な新規な免疫誘導剤を提供する。以下の(a)、(b)及び(c)、すなわち(a)配列表の配列番号4、2、22、24に示されるアミノ酸配列中の連続する7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド、(b)前記(a)のポリペプチドと90%以上の配列同一性を有し、かつ7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド、及び(c)前記(a)又は(b)のポリペプチドを部分配列として含むポリペプチドのポリペプチド類から選択されかつ免疫誘導活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み生体内で該ポリペプチドを発現可能な組換えベクター、を有効成分として含有する免疫誘導剤。



WO 2012/157736 A1

## 明 細 書

発明の名称：免疫誘導剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、癌の治療及び／又は予防剤等として有用な新規な免疫誘導剤に関する。

### 背景技術

[0002] 癌は全死亡原因の第一位を占める疾患であり、現在行われている治療は手術療法を主体に放射線療法と化学療法を組み合わせたものである。近年の新しい手術法の開発や新たな抗癌剤の発見にも関わらず、一部の癌を除いて、癌の治療成績はあまり向上していないのが現状である。近年、分子生物学や癌免疫学の進歩で癌に反応する細胞障害性T細胞により認識される癌抗原や癌抗原をコードする遺伝子が同定されてき、抗原特異性免疫療法への期待が高まっている。

[0003] 免疫療法においては、副作用を軽減するため、その抗原として認識されるペプチド又はタンパクは、正常細胞にはほとんど存在せず、癌細胞に特異的に存在していることが必要とされる。1991年、ベルギーLudwig研究所のBoonらは自己癌細胞株と癌反応性T細胞を用いたcDNA発現クローニング法によりCD8陽性T細胞が認識するヒトメラノーマ抗原MAGE1を単離した（非特許文献1）。その後、癌患者の生体内で自己の癌に反応して産生される抗体が認識する腫瘍抗原を遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する、SEREX（serological identifications of antigens by recombinant expression cloning）法が報告され（特許文献1、非特許文献2）、この方法により、いくつかの癌抗原が単離されている。さらに、その一部をターゲットにして癌免疫療法の臨床試験が開始されている。

[0004] 一方、ヒトと同様、イヌやネコにも乳腺腫瘍、扁平上皮癌など多数の腫瘍

が知られており、イヌやネコの疾病統計でも上位にランクされている。しかしながらイヌやネコの癌に対する有効な治療薬、予防薬及び診断薬は現在のところ存在しない。大部分のイヌやネコの腫瘍は、進行して腫瘍が大きくなってから飼い主が気付くケースがほとんどで、来院して外科的手術により切除したり、人体薬（抗癌剤など）を投与しても、すでに手遅れで処置後まもなく死亡することが多い。このような現状の中で、イヌやネコに有効な癌の治療薬及び予防薬が入手可能になれば、イヌの癌に対する用途が開かれると期待される。

- [0005] ステアロイルC<sub>9</sub>Aデサチュラーゼ1（SCD1）は飽和脂肪酸のC<sub>9</sub>—C<sub>10</sub>位に二重結合を導入する。該酵素に対する好ましい基質は、パルミトイル—C<sub>9</sub>A（16:0）およびステアロイル—C<sub>9</sub>A（18:0）であり、それぞれパルミトレオイル—C<sub>9</sub>A（16:1）およびオレオイル—C<sub>9</sub>A（18:1）に変換される。次いで、得られた一不飽和脂肪酸は、インビボにおける、リン脂質、トリグリセリドおよびコレステリルエステルの調製に用いられうる。また、SCD1は肝臓癌、食道癌、大腸癌など様々な癌で発現が上昇しており、siRNAや低分子阻害化合物によりSCD1の機能を阻害すると、細胞の増殖が抑制されたり、アポトーシスが誘導されることが報告されている（非特許文献3, 4, 5）。しかし、SCD1タンパク質が癌細胞に対する免疫誘導活性を有し、それによって該タンパク質が癌の治療や予防に有用であるという報告はない。

### 先行技術文献

### 特許文献

- [0006] 特許文献1：米国特許第5698396号

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Bruggen P. et al., Science, 254:1643-1647(1991)  
非特許文献2：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11810-11813(1995)  
非特許文献3：Scaglia N. et al., PLoS One 4: e6812(2009)  
非特許文献4：Morgan-Lappe SE. et al., Cancer Res 67: 4390-4398(2007)

非特許文献5 : Scaglia N. et al., Biochim Biophys Acta 1687: 141-151 (2005)

非特許文献6 : Ariyama H. et al., J Biol Chem (2010)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、癌の治療及び／又は予防剤等として有用な新規なポリペプチドを見出し、該ポリペプチドの免疫誘導剤への使用を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、イヌ精巢由来cDNAライブラリーと担癌犬の血清を用いたSEREX法により、担癌生体由来の血清中に存在する抗体と結合するタンパク質をコードするcDNAを取得し、そのcDNAを基にして、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するイヌステアロイルC<sub>6</sub>Aデサチュラーゼ1（以下、SCD1と記載する）のポリペプチドを作製した。また、取得した遺伝子のヒト及びマウス相同性遺伝子を基にして、配列番号4及び6で示されるアミノ酸配列を有するヒト及びマウスSCD1を作製した。そしてこれらSCD1ポリペプチドが乳癌、脳腫瘍、大腸癌、肛門周囲腺癌、肥満細胞腫、神経芽腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌又は白血病の組織又は細胞に特異的に発現していることを見出した。さらにまた、これらSCD1を生体に投与することによって、生体内にSCD1に対する免疫細胞を誘導することができること、及びSCD1を発現する生体内の腫瘍を退縮させることができることを見出した。さらにまた、SCD1のポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを発現可能な組換えベクターが、SCD1を発現する癌に対し生体内で抗腫瘍効果を誘導することを見出した。

[0010] さらにまた、SCD1のポリペプチドが、抗原提示細胞により提示されて、該ペプチドに特異的な細胞障害性T細胞を活性化及び増殖させる能力（免疫誘導活性）を有すること、このため、該ポリペプチドが癌の治療及び／又

は予防に有用であり、また、該ポリペプチドと接触した抗原提示細胞や、該抗原提示細胞と接触したT細胞が癌の治療及び／又は予防に有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0011] 従って、本発明は、以下の特徴を有する。

(1)以下の(a)ないし(c)のいずれかのポリペプチド類から選択され、かつ免疫誘導活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、生体内で該ポリペプチドを発現可能な組換えベクター、を有効成分として含有する免疫誘導剤。

(a)配列表の配列番号4、2、22、24に記載のアミノ酸配列中の連続する7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド。

(b)前記(a)のポリペプチドと85%以上の配列同一性を有し、かつ7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド。

(c)前記(a)又は(b)のポリペプチドを部分配列として含むポリペプチド。

(2)前記免疫誘導活性を有するポリペプチドが配列表の配列番号4、2、22、24に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、(1)に記載の免疫誘導剤。

(3)抗原提示細胞の処理剤である、(1)又は(2)に記載の免疫誘導剤。

(4)癌の治療及び／又は予防剤である、(1)又は(2)に記載の免疫誘導剤。

(5)前記癌がSCD1を発現する癌である、(4)に記載の免疫誘導剤。

(6)前記癌が乳癌、脳腫瘍、大腸癌、肛門周囲腺癌、肥満細胞腫、神経芽腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌又は白血病である、(4)又は(5)に記載の免疫誘導剤。

(7)免疫増強剤をさらに含む(1)～(6)のいずれかに記載の免疫誘導剤。

(8)前記免疫増強剤が、フロイントの不完全アジュバント、モンタニド、ポリICおよびその誘導体、CpGオリゴヌクレオチド、インターロイキン12、インターロイキン18、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\omega$ 、インターフェロン $\gamma$ 並びにFlt3リガンドから成る群より選ばれる少なくとも一つである、(7)に記載の免疫誘導剤。

## 発明の効果

[0012] 本発明により、癌の治療及び／又は予防等に有用な新規な免疫誘導剤が提供される。後述の実施例において具体的に示されるように、本発明で用いられるポリペプチドを生体に投与すると、生体内において免疫細胞を誘導することができ、さらに、既に生じている癌を縮小もしくは退縮させることができる。従って、該ポリペプチドは癌の治療や予防に有用である。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]同定したSCD1遺伝子の、イヌ正常組織及び腫瘍組織あるいは癌細胞株での発現パターンを示す図である。参照番号1；イヌSCD1遺伝子のイヌの各組織及び細胞株での発現パターン、参照番号2；イヌGAPDH遺伝子のイヌの各組織及び細胞株での発現パターン。

[図2]同定したSCD1遺伝子の、ヒト正常組織及び腫瘍組織あるいは癌細胞株での発現パターンを示す図である。参照番号3；ヒトSCD1遺伝子のヒトの各組織及び細胞株での発現パターン、参照番号4；ヒトGAPDH遺伝子のヒトの各組織及び細胞株での発現パターン。

[図3]同定したSCD1遺伝子の、マウス正常組織及び腫瘍組織あるいは癌細胞株での発現パターンを示す図である。参照番号5；マウスSCD1遺伝子のマウスの各組織及び細胞株での発現パターン、参照番号6；マウスGAPDH遺伝子のマウスの各組織及び細胞株での発現パターンを示す。

## 発明を実施するための形態

[0014] 本発明の免疫誘導剤に有効成分として含まれるポリペプチドとしては、以下のものが挙げられる。なお、本発明において、「ポリペプチド」とは、複数のアミノ酸がペプチド結合することによって形成される分子をいい、構成するアミノ酸数が多いポリペプチド分子のみならず、アミノ酸数が少ない低分子量の分子（オリゴペプチド）や、全長タンパク質も包含され、本発明では配列番号4、2、22、24に示すアミノ酸配列を有するSCD1の全長タンパク質も包含される。

[0015] (a)配列表の配列番号4、2、22、24に示されるアミノ酸配列を有する

ポリペプチド中の連続する7個以上のアミノ酸から成り、免疫誘導活性を有するポリペプチド

(b)(a)のポリペプチドと85%以上の配列同一性を有し、7個以上のアミノ酸から成る、免疫誘導活性を有するポリペプチド

(c)(a)又は(b)のポリペプチドを部分配列として含み、免疫誘導活性を有するポリペプチド。

[0016] なお、本発明において、「アミノ酸配列を有する」とは、アミノ酸残基がそのような順序で配列しているという意味である。従って、例えば、「配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、配列番号2に示されるMet Pro Ala His・・・(中略)・・・Tyr Lys Ser Glyのアミノ酸配列を持つ、360アミノ酸残基のサイズのポリペプチドを意味する。また、例えば、「配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」を「配列番号2のポリペプチド」と略記することがある。「塩基配列を有する」という表現についても同様である。この場合、「有する」という用語は、「からなる」という表現で置き換えてもよい。

[0017] ここで、「免疫誘導活性」とは、生体内でインターフェロン等のサイトカインを分泌する免疫細胞を誘導する能力を意味する。

[0018] 上記ポリペプチドが免疫誘導活性を有するか否かは、例えば公知のエリスポットアッセイ等を用いて確認することができる。具体的には、例えば後述の実施例に記載されるように、免疫誘導活性を評価すべきポリペプチドを投与した生体から末梢血単核球等の細胞を得て、該細胞を該ポリペプチドと共存培養し、該細胞からのサイトカイン産生量を、特異抗体を用いて測定することにより、該細胞中の免疫細胞数を測定することができるので、これにより免疫誘導活性を評価することができる。

[0019] また、後述の実施例に記載されるように、上記(a)～(c)の組換えポリペプチドを担癌生体に投与すると、その免疫誘導活性により腫瘍を退縮させることもできる。よって、上記免疫誘導活性は、癌細胞の増殖を抑制し又は癌組織(腫瘍)を縮小若しくは消滅させる能力(以下、「抗腫瘍活性」という)

として評価することもできる。ポリペプチドの抗腫瘍活性は、例えば後述の実施例に具体的に記載されるように、実際に該ポリペプチドを担癌生体に投与して腫瘍が縮小等されるか否かを調べることによって確認することができる。

[0020] あるいは、該ポリペプチドで刺激したT細胞（すなわち、該ポリペプチドを提示する抗原提示細胞と接触させたT細胞）が、生体外で腫瘍細胞に対して細胞障害活性を示すか否かを調べることによって、ポリペプチドの抗腫瘍活性を評価することもできる。T細胞と抗原提示細胞との接触は、後述するように、両者を液体培地中で共存培養することにより行なうことができる。細胞障害活性の測定は、例えばInt. J. Cancer, 58:p317, 1994に記載された<sup>51</sup>Cr リリースアッセイと呼ばれる公知の方法により行なうことができる。上記ポリペプチドを癌の治療及び／又は予防用途に用いる場合には、特に限定されないが、抗腫瘍活性を指標として免疫誘導活性を評価することが好ましい。

[0021] 本発明が開示する配列表の配列番号2、4、22、24にそれぞれ示されるアミノ酸配列は、イヌ精巢由来cDNAライブラリーと担癌犬の血清を用いたSEREX法により、担癌犬由来の血清中に特異的に存在する抗体と結合するポリペプチド及びそのヒト、ウシ、ウマ相同因子として単離された、SCD1のアミノ酸配列である（実施例1参照）。イヌSCD1のヒト相同因子であるヒトSCD1では、配列同一性が塩基配列89%、アミノ酸配列90%であり、ウシ相同因子であるウシSCD1では配列同一性は塩基配列88%、アミノ酸配列87%、ウマ相同因子であるウマSCD1では配列同一性は塩基配列90%、アミノ酸配列87%である。

[0022] 上記(a)のポリペプチドは、配列番号2、4、22、24で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド中の連続する7個以上、好ましくは連続する8、9又は10個以上のアミノ酸から成るポリペプチドであって、免疫誘導活性を有するものである。より好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号4で示されるアミノ酸配列と配列同一性が85%以上であるアミノ酸配列からな

るポリペプチドであり、特に好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号 2、4、22、24 で示されるアミノ酸配列を有する。なお、この分野で公知の通り、約 7 アミノ酸残基以上のポリペプチドであれば抗原性及び免疫原性を発揮できる。従って、配列番号 2、4、22、24 のアミノ酸配列中の連続する 7 アミノ酸残基以上のポリペプチドであれば、免疫誘導活性を有し得るので、本発明の免疫誘導剤の調製に用いることができる。

[0023] また、癌抗原ポリペプチドを投与することによる免疫誘導の原理として、ポリペプチドが抗原提示細胞に取り込まれ、その後該細胞内でペプチダーゼによる分解を受けてより小さな断片となり、該細胞の表面上に提示され、それを細胞障害性 T 細胞等が認識し、その抗原を提示している細胞を選択的に殺していくということが知られている。抗原提示細胞の表面上に提示されるポリペプチドのサイズは比較的小さく、アミノ酸数で 7～30 程度である。従って、抗原提示細胞上に提示させるという観点からは、上記(a)のポリペプチドとしては、配列番号 2、4、22、24 で示されるアミノ酸配列中の連続する 7～30 程度であることが好ましい態様のひとつであり、より好ましくは 8～30 もしくは 9～30 程度のアミノ酸から成るものであれば十分である。これら比較的小さなサイズのポリペプチドは、抗原提示細胞内に取り込まれることなく、直接抗原提示細胞上の細胞表面に提示される場合もある。

[0024] また、抗原提示細胞に取り込まれたポリペプチドは、該細胞内のペプチダーゼによりランダムな位置で切断を受けて、種々のポリペプチド断片が生じ、これらのポリペプチド断片が抗原提示細胞表面上に提示されるので、配列番号 2、4、22、24 の全長領域のように大きなサイズのポリペプチドを投与すれば、抗原提示細胞内での分解によって、抗原提示細胞を介する免疫誘導に有効なポリペプチド断片が必然的に生じる。従って、抗原提示細胞を介する免疫誘導にとっても、サイズの大きなポリペプチドを好ましく用いることができ、アミノ酸数を 30 以上、さらに好ましくは 100 以上、さらに好ましくは 200 以上、さらに好ましくは 250 以上、さらに好ましくは配

列番号 2、4、22、24 の全長領域のポリペプチドとしてもよい。

[0025] 上記(b)のポリペプチドは、上記(a)のポリペプチドのうちの少数の（好ましくは、1個もしくは数個の）アミノ酸残基が置換し、欠失し及び／又は挿入されたポリペプチドであって、元の配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上又は99.5%以上の配列同一性を有し、かつ、免疫誘導活性を有するポリペプチドである。一般に、タンパク質抗原において、該タンパク質のアミノ酸配列のうち少数のアミノ酸残基が置換され、欠失され又は挿入された場合であっても、元のタンパク質とほぼ同じ抗原性を有している場合があることは当業者において広く知られている。従って、上記(b)のポリペプチドも免疫誘導活性を発揮し得るので、本発明の免疫誘導剤の調製に用いることができる。また、上記(b)のポリペプチドは、配列番号2、4、22、24で示されるアミノ酸配列のうち、1個ないし数個のアミノ酸残基が置換し、欠失し及び／又は挿入されたポリペプチドであることも好ましい。本明細書中の「数個」とは、2～10の整数、好ましくは2～6の整数、さらに好ましくは2～4の整数を表す。

[0026] ここで、アミノ酸配列又は塩基配列の「配列同一性」とは、比較すべき2つのアミノ酸配列（又は塩基配列）のアミノ酸残基（又は塩基）ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列（又は塩基配列）を整列させ、一致したアミノ酸残基数（又は一致した塩基数）を全アミノ酸残基数（又は全塩基数）で除したものを百分率で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTALW等の周知のプログラムを用いて行なうことができる。ギャップが挿入される場合、上記全アミノ酸残基数は、1つのギャップを1つのアミノ酸残基として数えた残基数となる。このようにして数えた全アミノ酸残基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、配列同一性（%）は、長い方の配列の全アミノ酸残基数で、一致したアミノ酸残基数を除いて算出される。

[0027] なお、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸 (Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸 (Phe, Tyr, Trp) のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、これらの間での置換であればポリペプチドの性質が変化しないことが多いことが知られている。従って、本発明の上記(a)のポリペプチド中のアミノ酸残基を置換する場合には、これらの各グループの間で置換することにより、免疫誘導活性を維持できる可能性が高くなるため、好ましい。

[0028] 上記(c)のポリペプチドは、上記(a)又は(b)のポリペプチドを部分配列として含み、免疫誘導活性を有するポリペプチドである。すなわち、(a)又は(b)のポリペプチドの一端又は両端に他のアミノ酸又はポリペプチドが付加されたものであって、免疫誘導活性を有するポリペプチドである。このようなポリペプチドも、本発明の免疫誘導剤の調製に用いることができる

上記したポリペプチドは、例えば、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法に従って合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。また、公知の遺伝子工学的手法を用いて、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、該ポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、該宿主細胞中でポリペプチドを生産させることにより、目的とするポリペプチドを得ることができる。

[0029] 上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法や市販の核酸合成機を用いた常法により、容易に調製することができる。例えば、配列番号1の塩基配列を有するDNAは、イヌ染色体DNA又はcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号1に記載した塩基配列を増幅できるように設計した一対のプライマーを用いてPCRを行うことに

より調製することができる。配列番号3の塩基配列を有するDNAであれば、上記鑄型としてヒト染色体DNA又はcDNAライブラリーを使用することで同様に調製できる。PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、94℃で30秒間（変性）、55℃で30秒～1分間（アニーリング）、72℃で2分間（伸長）からなる反応行程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができるが、これに限定されない。また、本明細書中の配列表の配列番号1、3に示される塩基配列及びアミノ酸配列の情報に基づいて、適当なプローブやプライマーを調製し、それを用いてイヌやヒトなどのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、所望のDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、配列番号2、4のタンパク質を発現している細胞、器官又は組織から作製することが好ましい。上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、ならびに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラバイオロジー等に記載された方法に準じて行うことができる。このようにして得られたDNAから、上記(a)のポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。また、各アミノ酸をコードするコドンは公知であるから、特定のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの塩基配列は容易に特定することができる。従って、上記した(b)又は(c)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列も容易に特定することができるので、そのようなポリヌクレオチドも、市販の核酸合成機を用いて常法により容易に合成することができる。

[0030] 上記宿主細胞としては、上記ポリペプチドを発現可能な細胞であればいかなるものであってもよく、原核細胞の例としては大腸菌など、真核細胞の例としてはサル腎臓細胞COS1、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO等の哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0031] 宿主細胞として原核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、原核細胞中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターを用いる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescriptII、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで原核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを原核宿主細胞中で発現させることができる。この際、該ポリペプチドを、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。

[0032] 宿主細胞として真核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いる。そのような発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2などが例示できる。上記と同様に、上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで真核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを真核宿主細胞中で発現させることができる。発現ベクターとしてpIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1等を用いた場合には、Hisタグ、FLAGタグ、mycタグHAタグ、GFPなど各種タグを付加した融合タンパク質として、上記ポリペプチドを発現させることができる。

[0033] 発現ベクターの宿主細胞への導入は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の周知の方法を用いることができる。

[0034] 宿主細胞から目的のポリペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば尿素などの変性剤や界面活性剤

による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒分別沈殿法、透析、遠心分離、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 以上の方法によって得られるポリペプチドには、上述した通り、他の任意のタンパク質との融合タンパク質の形態にあるものも含まれる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) やHisタグとの融合タンパク質などが例示できる。このような融合タンパク質の形態のポリペプチドも、上記した(c)のポリペプチドとして本発明の範囲に含まれる。さらに、形質転換細胞で発現されたポリペプチドは、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける場合がある。このような翻訳後修飾されたポリペプチドも、免疫誘導活性を有する限り、本発明の範囲に含まれる。この様な翻訳修飾としては、N末端メチオニンの脱離、N末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリスチル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

[0036] 後述の実施例に具体的に記載される通り、上記した免疫誘導活性を有するポリペプチドを担癌生体に投与すると、既に生じている腫瘍を退縮させることができる。従って、本発明の免疫誘導剤は、癌の治療及び／又は予防剤として用いることができる。また、上記した免疫誘導活性を有するポリペプチドは、免疫誘導による癌の治療及び／又は予防方法に用いることができる。

[0037] ここで、「腫瘍」及び「癌」という用語は、悪性新生物を意味し、互換的に使用される。

[0038] この場合、対象となる癌としては、SCD1を発現している癌であれば特に限定されないが、好ましくは乳癌、脳腫瘍、大腸癌、肛門周囲腺癌、肥満細胞腫、神経芽腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌又は白血病である。

[0039] また、対象となる動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは霊長類、ペット動物、家畜類、競技用動物を含む哺乳動物であり、特に好

ましくはヒト、イヌ又はネコである。

[0040] 本発明の免疫誘導剤の生体への投与経路は、経口投与でも非経口投与でもよいが、筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与等の非経口投与が好ましい。癌の治療目的で該免疫誘導剤を用いる場合には、抗癌作用を高めるため、後述の実施例に記載するように、治療対象となる腫瘍の近傍の所属リンパ節に投与することもできる。投与量は、免疫誘導するのに有効な量であればよく、例えば癌の治療及び／又は予防に用いるのであれば、癌の治療及び／又は予防に有効な量であればよい。癌の治療及び／又は予防に有効な量は、腫瘍の大きさや症状等に応じて適宜選択されるが、通常、対象動物に対し1日当りの有効量として0.0001~1000 $\mu$ g、好ましくは0.001~1000 $\mu$ gであり、1回又は数回に分けて投与することができる。好ましくは、数回に分け、数日ないし数月おきに投与する。後述の実施例に具体的に示されるとおり、本発明の免疫誘導剤は、既に形成されている腫瘍を退縮させることができる。従って、発生初期の少数の癌細胞にも抗癌作用を発揮し得るので、癌の発症前や癌の治療後に用いれば、癌の発症や再発を防止することができる。すなわち、本発明の免疫誘導剤は、癌の治療と予防の双方に有用である。

[0041] 本発明の免疫誘導剤は、ポリペプチドのみから成っていてもよいし、各投与形態に適した、薬理的に許容される担体、希釈剤、賦形剤等の添加剤を適宜混合させて製剤することもできる。製剤方法及び使用可能な添加剤は、医薬製剤の分野において周知であり、いずれの方法及び添加剤をも用いることができる。添加剤の具体例としては、生理緩衝液のような希釈剤；砂糖、乳糖、コーンスターチ、リン酸カルシウム、ソルビトール、グリシン等のような賦形剤；シロップ、ゼラチン、アラビアゴム、ソルビトール、ポリビニルクロリド、トラガント等のような結合剤；ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、タルク、シリカ等の滑沢剤等が挙げられるが、これらに限定されない。製剤形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口剤、吸入剤、注射剤、座剤、液剤などの非経口剤など

を挙げることができる。これらの製剤は一般的に知られている製法によって作ることができる。

[0042] 本発明の免疫誘導剤は、生体内での免疫学的応答を強化することができる免疫増強剤と組み合わせて用いることができる。免疫増強剤は、本発明の免疫誘導剤に含まれていてもよいし、別個の組成物として本発明の免疫誘導剤と併用して患者に投与してもよい。

[0043] 上記免疫増強剤としては、例えばアジュバントを挙げることができる。アジュバントは、抗原の貯蔵所（細胞外又はマクロファージ内）を提供し、マクロファージを活性化し、かつ特定組のリンパ球を刺激することにより、免疫学的応答を強化し得るので、抗癌作用を高めることができる。従って、特に、本発明の免疫誘導剤を癌の治療及び／又は予防に用いる場合、免疫誘導剤は、有効成分たる上記ポリペプチドに加えてさらにアジュバントを含むことが好ましい。多数の種類のアジュバントが当業界で周知であり、いずれのアジュバントでも用いることができる。アジュバントの具体例としては、MPL (SmithKline Beecham)、サルモネラ属の *Salmonella minnesota Re 595* リポ多糖類の精製及び酸加水分解後に得られる同類物；QS21 (SmithKline Beecham)、*Quillja saponaria* 抽出物から精製される純QA-21サポニン；PCT出願WO96/33739 (SmithKline Beecham) に記載されたDQS21；QS-7、QS-17、QS-18及びQS-L1 (ソ (So)、外10名、「モレキュلز・アンド・セル (Molecules and cells)」、1997年、第7巻、p. 178-186)；フロイントの不完全アジュバント；フロイントの完全アジュバント；ビタミンE；モンタニド；ミョウバン；CpGオリゴヌクレオチド (例えば、クレイグ (Kreig)、外7名、「ネイチャー (Nature)」、第374巻、p. 546-549) を参照)；ポリIC及びその誘導体 (ポリICLC等) ならびにスクアレン及び／又はトコフェロールのような生分解性油から調製される種々の油中水エマルションが挙げられ

る。中でも、フロイントの不完全アジュバント、モンタニド、ポリIC及びその誘導体並びにCpGオリゴヌクレオチドが好ましい。上記アジュバントとポリペプチドの混合比は、典型的には約1:10~10:1、好ましくは約1:5~5:1、より好ましくは約1:1である。ただし、アジュバントは上記例示に限定されず、当業界で公知の上記以外のアジュバントも本発明の免疫誘導剤を投与する際に用いられ得る（例えば、ゴッディング（Goding）著、「モノクローナル・アンチボディーズ：プリンシプル・アンド・プラクティス（Monoclonal Antibodies: Principles and Practice）」、第2版、1986年を参照）。ポリペプチド及びアジュバントの混合物又はエマルジョンの調製方法は、予防接種の当業者には周知である。

[0044] また、上記免疫増強剤としては、上記アジュバント以外にも、対象の免疫応答を刺激する因子を用いることもできる。例えば、リンパ球や抗原提示細胞を刺激する特性を有する各種サイトカインを免疫増強剤として本発明の免疫誘導剤と組み合わせて用いることができる。そのような免疫学的応答を増強可能な多数のサイトカインが当業者に公知であり、その例としては、ワクチンの防御作用を強化することが示されているインターロイキン-12（IL-12）、GM-CSF、IL-18、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\omega$ 、インターフェロン $\gamma$ 及びFlt3リガンドが挙げられるが、これらに限定されない。このような因子も上記免疫増強剤として用いることができ、本発明の免疫誘導剤に含ませて又は別個の組成物として本発明の免疫誘導剤と併用して患者に投与することができる。

[0045] また、上記ポリペプチドと抗原提示細胞とをインビトロで接触させることにより、該ポリペプチドを抗原提示細胞に提示させることができる。すなわち、上記した(a)ないし(c)のポリペプチドは、抗原提示細胞の処理剤として利用し得る。ここで、抗原提示細胞としては、MHCクラスI分子を保有する樹状細胞又はB細胞を好ましく用いることができる。種々のMHCクラスI分子が同定されており、周知である。ヒトにおけるMHC分子はHLAと

呼ぶ。HLAクラスI分子としては、HLA-A、HLA-B、HLA-Cを挙げることができ、より具体的には、HLA-A1、HLA-A0201、HLA-A0204、HLA-A0205、HLA-A0206、HLA-A0207、HLA-A11、HLA-A24、HLA-A31、HLA-A6801、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B2705、HLA-B37、HLA-Cw0401、HLA-Cw0602などを挙げることができる。

[0046] MHCクラスI分子を保有する樹状細胞又はB細胞は、周知の方法により末梢血から調製することができる。例えば、骨髄、臍帯血あるいは患者末梢血から、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）とIL-3（あるいはIL-4）を用いて樹状細胞を誘導し、その培養系に腫瘍関連ペプチドを加えることにより、腫瘍特異的な樹状細胞を誘導することができる。

[0047] この樹状細胞を有効量投与することで、癌の治療に望ましい応答を誘導できる。用いる細胞は、健康人から提供された骨髄や臍帯血、患者本人の骨髄や末梢血等を用いることができるが、患者本来の自家細胞を使う場合は、安全性が高く、重篤な副作用を回避することも期待できる。末梢血又は骨髄は新鮮試料、低温保存試料及び凍結保存試料のいずれでもよい。末梢血は、全血を培養してもよいし、白血球成分だけを分離して培養してもよいが、後者の方が効率的で好ましい。さらに白血球成分の中でも単核球を分離してもよい。また、骨髄や臍帯血を起源とする場合には、骨髄を構成する細胞全体を培養してもよいし、これから単核球を分離して培養してもよい。末梢血やその白血球成分、骨髄細胞には、樹状細胞の起源となる単核球、造血幹細胞又は未成熟樹状細胞やCD4陽性細胞等が含まれている。用いられるサイトカインは、安全性と生理活性が確認された特性のものであれば、天然型、あるいは遺伝子組み換え型等、その生産手法については問わないが、好ましくは医療用に用いられる品質が確保された標品が必要最低量で用いられる。添加するサイトカインの濃度は、樹状細胞が誘導される濃度であれば特に限定さ

れず、通常サイトカインの合計濃度で10~1000 ng/mL程度が好ましく、より好ましくは20~500 ng/mL程度である。培養は、白血球の培養に通常用いられている周知の培地を用いて行うことができる。培養温度は白血球の増殖が可能であれば特に限定されないが、ヒトの体温である37°C程度が最も好ましい。また、培養中の気体環境は白血球の増殖が可能であれば特に限定されないが、5% CO<sub>2</sub>を通気することが好ましい。さらに培養期間は、必要数の細胞が誘導される期間であれば特に限定されないが、通常3日~2週間の間で行われる。細胞の分離や培養に供される機器は、適宜適当なものを用いることができるが、医療用に安全性が確認され、かつ操作が安定して簡便であることが好ましい。特に細胞培養装置については、シャーレ、フラスコ、ボトル等の一般的容器に拘わらず、積層型容器や多段式容器、ローラーボトル、スピナー式ボトル、バッグ式培養器、中空糸カラム等も用いることができる。

[0048] 上記ポリペプチドと抗原提示細胞とをインビトロで接触させる方法自体は、周知の方法により行なうことができる。例えば、抗原提示細胞を、上記ポリペプチドを含む培養液中で培養することにより行なうことができる。培地中のペプチド濃度は、特に限定されないが、通常1~100 μg/mL程度、好ましくは5~20 μg/mL程度である。培養時の細胞密度は特に限定されないが、通常10<sup>3</sup>~10<sup>7</sup>細胞/mL程度、好ましくは5×10<sup>4</sup>~5×10<sup>6</sup>細胞/mL程度である。培養は、常法に従い、37°C、5% CO<sub>2</sub>雰囲気中に行なうことが好ましい。なお、抗原提示細胞が表面上に提示できるペプチドの長さは、通常、最大で30アミノ酸残基程度である。従って、特に限定されないが、抗原提示細胞とポリペプチドをインビトロで接触させる場合、該ポリペプチドをおよそ30アミノ酸残基以下の長さに調製してもよい。

[0049] 上記したポリペプチドの共存下において抗原提示細胞を培養することにより、ペプチドが抗原提示細胞のMHC分子に取り込まれ、抗原提示細胞の表面に提示される。従って、上記ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドとM

H C分子の複合体を含む、単離抗原提示細胞を調製することができる。このような抗原提示細胞は、生体内又はインビトロにおいて、T細胞に対して該ポリペプチドを提示し、該ポリペプチドに特異的な細胞障害性T細胞を誘導し、増殖させることができる。

[0050] 上記のようにして調製される、上記ポリペプチドとMHC分子の複合体を含む抗原提示細胞を、T細胞とインビトロで接触させることにより、該ポリペプチドに特異的な細胞障害性T細胞を誘導し、増殖させることができる。これは、上記抗原提示細胞とT細胞とを液体培地中で共存培養することにより行なうことができる。例えば、抗原提示細胞を液体培地に懸濁して、マイクロプレートのウェル等の容器に入れ、これにT細胞を添加して培養することにより行なうことができる。共存培養時の抗原提示細胞とT細胞の混合比率は、特に限定されないが、通常、細胞数の比率で1：1～1：100程度、好ましくは1：5～1：20程度である。また、液体培地中に懸濁する抗原提示細胞の密度は、特に限定されないが、通常、100～1000万細胞/ml程度、好ましくは10000～100万細胞/ml程度である。共存培養は、常法に従い、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気中に行なうことが好ましい。培養時間は、特に限定されないが、通常、2日～3週間、好ましくは4日～2週間程度である。また、共存培養は、IL-2、IL-6、IL-7及びIL-12のようなインターロイキンの1種又は複数の存在下で行なうことが好ましい。この場合、IL-2及びIL-7の濃度は、通常5～20U/ml程度、IL-6の濃度は通常500～2000U/ml程度、IL-12の濃度は通常5～20ng/ml程度であるが、これらに限定されるものではない。上記の共存培養は、新鮮な抗原提示細胞を追加して1回ないし数回繰り返してもよい。例えば、共存培養後の培養上清を捨て、新鮮な抗原提示細胞の懸濁液を添加してさらに共存培養を行なうという操作を、1回ないし数回繰り返してもよい。各共存培養の条件は、上記と同様でよい。

[0051] 上記の共存培養により、該ポリペプチドに特異的な細胞障害性T細胞が誘導され、増殖される。従って、上記ポリペプチドを用いて、該ポリペプチド

とMHC分子の複合体を選択的に結合する、単離T細胞を調製することができる。

[0052] 後述の実施例に記載される通り、SCD1遺伝子は、乳癌細胞、乳癌組織、脳腫瘍細胞、脳腫瘍組織、大腸癌細胞、大腸癌組織、肛門周囲腺癌組織、肛門周囲腺癌細胞、肥満細胞腫組織、肥満細胞腫細胞、神経芽腫細胞、腎臓癌細胞、腎臓癌組織、肝臓癌細胞、肝臓癌組織、肺癌細胞、肺癌組織、前立腺癌細胞、前立腺癌組織及び白血病細胞に特異的に発現している。従って、これらの癌種においては、SCD1が正常細胞よりも有意に多く存在していると考えられる。したがって、癌細胞内に存在するSCD1のポリペプチドの一部が癌細胞表面上のMHC分子に提示されるよう、上記のようにして調製した細胞障害性T細胞が生体内に投与されると、これを目印として細胞障害性T細胞が癌細胞を障害することができる。また、SCD1のポリペプチドの一部を提示する抗原提示細胞は、生体内においても該ポリペプチドに特異的な細胞障害性T細胞を誘導し、増殖させることができるので、該抗原提示細胞を生体内に投与することによっても、癌細胞を障害することができる。すなわち、上記ポリペプチドを用いて調製された上記細胞障害性T細胞や上記抗原提示細胞もまた、本発明の免疫誘導剤と同様に、癌の治療及び／又は予防剤として有用である。

[0053] 上記した単離抗原提示細胞や単離T細胞を生体に投与する場合には、これらの細胞を異物として攻撃する生体内での免疫応答を回避するために、治療を受ける患者から採取した抗原提示細胞又はT細胞を、上記のように上記(a)ないし(c)のポリペプチドを用いて調製したものであることが好ましい。

[0054] 抗原提示細胞又は単離T細胞を有効成分として含む癌の治療及び／又は予防剤の投与経路は、静脈内投与や動脈内投与のような非経口投与が好ましい。また、投与量は、症状や投与目的等に応じて適宜選択されるが、通常1個～10兆個、好ましくは100万個～10億個であり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。製剤は、例えば、細胞を生理緩衝食塩水に懸濁したもの等であってよく、他の抗癌剤やサイトカイン等と併用すること

もできる。また、製剤分野において周知の1又は2以上の添加剤を添加することもできる。

[0055] また、上記(a)ないし(c)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象動物の体内で発現させることによっても、該生体内で抗体生産や細胞障害性T細胞を誘導することができ、ポリペプチドを投与するのと同等の効果が得られる。すなわち、本発明の免疫誘導剤は、上記した(a)ないし(c)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、生体内で該ポリペプチドを発現可能な組換えベクターを有効成分として含むものであってもよい。後述の実施例に示されるように、このような抗原ポリペプチドを発現可能な組換えベクターは、遺伝子ワクチンとも呼ばれる。

[0056] 遺伝子ワクチンを製造するために用いるベクターは、対象動物細胞内（好ましくは哺乳動物細胞内）で発現可能なベクターであれば特に限定されず、プラスミドベクターでもウイルスベクターでもよく、遺伝子ワクチンの分野で公知のいかなるベクターを用いてもよい。なお、上記ポリペプチドをコードするDNAやRNA等のポリヌクレオチドは、上述した通り、常法により容易に調製することができる。また、ベクターへの該ポリヌクレオチドの組み込みは、当業者に周知の方法を用いて行なうことができる。

[0057] 遺伝子ワクチンの投与経路は、好ましくは筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与等の非経口投与経路であり、投与量は、抗原の種類等に応じて適宜選択することができるが、通常、体重1kg当たり、遺伝子ワクチンの重量で0.1 $\mu$ g～100mg程度、好ましくは1 $\mu$ g～10mg程度である。

[0058] ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス等のRNAウイルス又はDNAウイルスに、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込み、これを対象動物に感染させる方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等

を用いた方法が特に好ましい。

- [0059] その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。
- [0060] 本発明で用いられる上記ポリペプチドをコードする遺伝子を実際に医薬として作用させるには、遺伝子を直接体内に導入する *in vivo* 方法、及び対象動物からある種の細胞を採取し体外で遺伝子を該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo* 方法があるが（日経サイエンス，1994年4月，p20-45、月刊薬事，1994年，第36巻，第1号，p. 23-48、実験医学増刊，1994年，第12巻，第15号、及びこれらの引用文献等）、*in vivo* 方法がより好ましい。
- [0061] *in vivo* 方法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することが出来る。*in vivo* 方法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には、有効成分である本発明の上記ペプチドをコードするDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、該DNAを含有するリポソーム又は膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。
- [0062] なお、本発明において、「配列番号1に示される塩基配列」と言った場合には、配列番号1に実際に示されている塩基配列の他、これと相補的な配列も包含する。従って、「配列番号1に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド」と言った場合には、配列番号1に実際に示されている塩基配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、その相補的な塩基配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、及びこれらから成る二本鎖ポリヌクレオチドが包含される。本発明で用いられるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製する場

合には、適宜いずれかの塩基配列を選択することとなるが、当業者であれば容易にその選択をすることができる。

## 実施例

[0063] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。

[0064] 実施例1：SEREX法による新規癌抗原タンパクの取得

### (1) cDNAライブラリーの作製

犬の精巢から酸-グアニジウム-フェノール-クロロホルム法 (Acid guanidium-Phenol-Chloroform法) により全RNAを抽出し、Oligotex-dT30 mRNA purification Kit (宝酒造株式会社製) を用いてキット添付のプロトコールに従ってポリA RNAを精製した。

[0065] この得られたmRNA (5  $\mu$ g) を用いてcDNAファージライブラリーを合成した。cDNAファージライブラリーの作製にはcDNA Synthesis kit, Zap-cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (STRATAGENE社製) を用い、キット添付のプロトコールに従ってライブラリーを作製した。作製したcDNAファージライブラリーのサイズは $1 \times 10^6$  pfu/mlであった。

[0066] (2) 血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング

上記作製したcDNAファージライブラリーを用いて、イムノスクリーニングを行った。具体的には $\Phi 90 \times 15$  mmのNZYアガロースプレートに2340クローンとなるように宿主大腸菌 (XL1-Blue MRF') に感染させ、42°C、3~4時間培養し、溶菌斑 (プラーク) を作らせ、IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトシド) を浸透させたニトロセルロースメンブレン (Hybond C Extra:GE Healthcare Bio-Science社製) でプレートを37°Cで4時間覆うことによりタンパク質を誘導・発現させ、メンブレンにタンパク質を転写した。その後メンブレンを回収し0.5%脱脂粉乳を含むTBS (10mM Tr

is-HCl、150mM NaCl pH7.5) に浸し4℃で一晩振盪することによって非特異反応を抑制した。このフィルターを500倍希釈した患犬血清と室温で2～3時間反応させた。

[0067] 上記患犬血清としては、肛門近位腫瘍の患犬より採取した血清を用いた。これらの血清は-80℃で保存し、使用直前に前処理を行った。血清の前処理方法は、以下の方法による。すなわち、外来遺伝子を挿入していないλ ZAP Expressファージを宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させた後、NZYプレート培地上で37℃、一晩培養した。次で0.5M NaClを含む0.2M NaHCO<sub>3</sub> pH8.3のバッファーをプレートに加え、4℃で15時間静置後、上清を大腸菌/ファージ抽出液として回収した。次に、回収した大腸菌/ファージ抽出液をNHS-カラム(GE Healthcare Bio-Science社製)に通液して、大腸菌・ファージ由来のタンパク質を固定化した。このタンパク固定化カラムに患犬血清を通液・反応させ、大腸菌及びファージに吸着する抗体を血清から取り除いた。カラムを素通りした血清画分は、0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて500倍希釈し、これをイムノスクリーニング材料とした。

[0068] かかる処理血清と上記融合タンパク質をブロットしたメンブレンをTBS-T(0.05% Tween20/TBS)にて4回洗浄を行った後、二次抗体として0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて5000倍希釈を行ったヤギ抗イヌIgG( Goat anti Dog IgG-h+I HRP conjugated: BETHYL Laboratories社製)を、室温1時間反応させ、NBT/BCIP反応液(Roche社製)を用いた酵素発色反応により検出し、発色反応陽性部位に一致するコロニーをΦ90×15mmのNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液(100mM NaCl、10mM MgClSO<sub>4</sub>、50mM Tris-HCl、0.01%ゼラチン pH7.5)500μlに溶解させた。発色反応陽性コロニーが単一化するまで上記と同様の方法で、二次、三次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgGと反応する9110個のファージクローンをスクリ

ーニングして、1個の陽性クローンを単離した。

[0069] (3) 単離抗原遺伝子の配列同一性検索

上記方法により単離した1個の陽性クローンを塩基配列解析に供するため、ファージベクターからプラスミドベクターに転換する操作を行った。具体的には宿主大腸菌 (X L 1 - B l u e M R F') を吸光度  $OD_{600}$  が 1.0 となるよう調製した溶液 200  $\mu$ l と、精製したファージ溶液 100  $\mu$ l さらに E x A s s i s t h e l p e r p h a g e (S T R A T A G E N E 社製) 1  $\mu$ l を混合した後 37°C で 15 分間反応後、LB 培地を 3 ml 添加し 37°C で 2.5 ~ 3 時間培養を行い、直ちに 70°C の水浴にて 20 分間保温した後、4°C、1000  $\times$  g、15 分間遠心を行い、上清をファージミド溶液として回収した。次いでファージミド宿主大腸菌 (S O L R) を吸光度  $OD_{600}$  が 1.0 となるよう調製した溶液 200  $\mu$ l と、精製したファージ溶液 10  $\mu$ l を混合した後 37°C で 15 分間反応させ、50  $\mu$ l をアンピシリン (終濃度 50  $\mu$ g / ml) 含有 LB 寒天培地に播き 37°C 一晚培養した。トランスフォームした S O L R のシングルコロニーを採取し、アンピシリン (終濃度 50  $\mu$ g / ml) 含有 LB 培地 37°C にて培養後、Q I A G E N p l a s m i d M i n i p r e p K i t (キアゲン社製) を使って目的のインサートを持つプラスミド DNA を精製した。

[0070] 精製したプラスミドは、配列番号 7 に記載の T 3 プライマーと配列番号 8 に記載の T 7 プライマーを用いて、プライマーウォーキング法によるインサート全長配列の解析を行った。このシーケンス解析により配列番号 1 に記載の遺伝子配列を取得した。この遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を用いて、配列同一性検索プログラム B L A S T サーチ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を行い既知遺伝子との配列同一性検索を行った結果、得られた遺伝子は S C D 1 遺伝子であることが判明した。イヌ S C D 1 のヒト相同因子であるヒト S C D 1 では、配列同一性が塩基配列 89%、アミノ酸配列 90% であり、マウス相同因子であるマウス S C D 1 では、配列同一性が塩基配列 84%、アミノ酸配列 84% であった。ヒト S C D 1 の塩基配列を配列

番号3、アミノ酸配列を配列番号4に、マウスSCD1の塩基配列を配列番号5、アミノ酸配列を配列番号6に示す。

[0071] (4) 各組織での発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しイヌ、ヒト及びマウスの正常組織及び各種細胞株における発現をRT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 法により調べた。逆転写反応は以下の通り行なった。すなわち、各組織50~100mg及び各細胞株5~10×10<sup>6</sup>個の細胞からTRIZOL試薬 (invitrogen社製) を用いて添付のプロトコールに従い全RNAを抽出した。この全RNAを用いてSuperscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen社製) により添付のプロトコールに従いcDNAを合成した。ヒト正常組織 (脳、海馬、精巣、結腸、胎盤) のcDNAは、ジーンプールcDNA (invitrogen社製)、QUICK-Clone cDNA (クロンテック社製) 及びLarge-Insert cDNA Library (クロンテック社製) を用いた。PCR反応は、取得した遺伝子特異的なプライマー (イヌプライマーは配列番号9及び10、ヒトプライマーは配列番号11及び12、マウスプライマーは配列番号13及び14に記載) を用いて以下の通り行なった。すなわち、逆転写反応により調製したサンプル0.25µl、上記プライマーを各2µM、0.2mMの各dNTP、0.65UのExTaqポリメラーゼ (宝酒造社製) となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を25µlとし、Thermal Cycler (BIO RAD社製) を用いて、94°C-30秒、55°C-30秒、72°C-1分のサイクルを30回繰り返して行なった。比較対照のため、GAPDH特異的なプライマー (イヌ及びヒトGAPDHプライマーは配列番号15及び16、マウスGAPDHプライマーは配列番号17及び18に記載) も同時に用いた。その結果、図1に示すように、イヌSCD1遺伝子は、健全なイヌ組織ではほとんどの組織で発現が見られず、一方イヌ腫瘍組織では強い発現が見られた。ヒト及びマウスSCD1遺伝

子の発現も、イヌSCD1遺伝子と同様、ヒト及びマウス正常組織ではほとんど発現が確認できず、癌細胞では大部分の細胞株で発現が検出された（図2、3）。

[0072] (5) 各組織での定量的発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しヒトの正常組織における発現を定量的RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 法により調べた。ヒト正常組織及び癌組織のcDNAは、Tissue scan Real Time cancer survey Panel I (ORIGENE社製) を用いた。また定量RT-PCRはBIO RAD社製社製のCFX96 Real Time System-C1000 Thermal Cyclerを用いて実施した。PCR反応は、取得した遺伝子特異的なプライマー（配列番号11及び12に記載）を用いて以下の通り行った。すなわち、cDNAサンプル5  $\mu$ l、上記プライマーを各2  $\mu$ M、2X SYBR Premix Ex Taq IIポリメラーゼ（宝酒造株式会社製）の各試薬と添付バッファーを加え全量を20  $\mu$ lとし、94°C-30秒、55°C-30秒、72°C-1分のサイクルを30回繰り返して行った。その結果、SCD1遺伝子は、乳癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、肺癌においてそれぞれの正常組織と比較してすべて4倍以上発現が高かった。本結果は、ヒトSCD1を標的とした抗腫瘍剤が、正常組織での副作用を全く心配すること無く、薬剤の薬効と副作用の大きな乖離を期待させるものであった。

[0073] 実施例2：SCD1の生体内での癌抗原性の解析

(1) 生体内でSCD1を発現する組換えベクターの作製

配列番号5の塩基配列を基に、以下の方法にて、生体内でSCD1を発現する組換えベクターを作製した。PCRは、実施例1において発現の見られたマウス癌細胞株N2a (ATCCより購入) より調製した。cDNAを1  $\mu$ l、Hind III及びXba I制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー（配列番号19及び20に記載）を各0.4  $\mu$ M、0.2 mM dNT

P、1.25UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ（宝酒造株式会社製）となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 $\mu$ lとし、Thermal Cycler（BIO RAD社製）を用いて、98 $^{\circ}$ C-10秒、55 $^{\circ}$ C-15秒、72 $^{\circ}$ C-4分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号5のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて約1000bpのDNA断片を精製した。

[0074] 精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt（Invitrogen社製）にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドをHindIII及びXbaI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、HindIII、XbaI制限酵素で処理した哺乳類発現ベクターpcDNA3.1（Invitrogen社製）に挿入した。このベクターの使用により哺乳類の細胞内でSCD1タンパクが産生される。

[0075] 上記で作製したプラスミドDNA100 $\mu$ gに50 $\mu$ gの金粒子（Bio Rad社製）、スペルミジン100 $\mu$ l（SIGMA社製）、1M CaCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ l（SIGMA社製）を添加し、ボルテックスによって攪拌し10分室温で静置した（以後金-DNA粒子と記載する）。3000rpmで1分遠心した後、上清を捨て100%エタノール（WAKO社製）によって3回洗浄した。金-DNA粒子に100%エタノール6mlを加えボルテックスによって十分に攪拌した後、金-DNA粒子をTefzel Tubing（Bio Rad社製）に流し込み、壁面に沈殿させた。金-DNA粒子が付着したTefzel Tubingのエタノールを風乾し、遺伝子銃に適した長さにカットした。

[0076] (2) DNAワクチン法によるSCD1の抗腫瘍効果

10匹のA/Jマウス(7週齢、雄、日本SLC社から購入)及びBalb/cマウス(7週齢、雄、日本SLC社から購入)に対して、上記で作製したチューブを遺伝子銃に固定し、純ヘリウムガスを用いて400psiの圧力で、剃毛したマウスの腹腔にDNAワクチンを7日ごとに計3回、経皮投与した後に(プラスミドDNA接種量は $2\mu\text{g}/\text{匹}$ になる)マウス神経芽腫細胞株N2a細胞、大腸癌細胞株CT26を各々 $1\times 10^6$ 個移植して抗腫瘍効果を評価した(予防モデル)。なお、コントロールとして、SCD1遺伝子が挿入されていないプラスミドDNAを各モデルで10匹ずつ投与した。

[0077] 抗腫瘍効果は、腫瘍の大きさ(長径 $\times$ 短径<sup>2</sup>/2)及び生存マウスの割合で評価した。本検討の結果、神経芽腫細胞株を用いた予防モデルにおいて、43日後には、コントロール群及びSCD1プラスミド投与群で、それぞれ、 $2966\text{mm}^3$ 、 $759\text{mm}^3$ となり、SCD1プラスミド投与群では腫瘍の顕著な退縮が観察された。また、生存の経過を観察した結果、神経芽腫細胞株を用いた予防モデルにおいて、コントロール群では投与後74日で全例死亡したのに対し、SCD1プラスミド投与群では、60%のマウスが生存していた。以上の結果から、SCD1プラスミド投与群はコントロール群に比べて有意な抗腫瘍効果が認められた。同様に、大腸癌細胞株を用いた予防モデルにおいても、33日後には、コントロール群及びSCD1プラスミド投与群で、それぞれ、 $2518\text{mm}^3$ 、 $604\text{mm}^3$ となり、SCD1プラスミド投与群では腫瘍の顕著な退縮が観察された。また、生存の経過を観察した結果、コントロール群では投与後54日で全例死亡したのに対し、SCD1プラスミド投与群では、50%のマウスが生存していた。以上の結果から、SCD1プラスミド投与群はコントロール群に比べて有意な抗腫瘍効果が認められた。

[0078] 実施例3：ヒト組換えSCD1タンパク質の作製及び免疫誘導能の評価

(1) ヒト組換えSCD1タンパク質の作製

配列番号3の遺伝子を基に、以下の方法にてヒトSCD1の組換えタンパク質を作製した。PCRは、実施例1で作製した各種組織・細胞cDNAよりRT-PCR法による発現が確認できたcDNAを1 $\mu$ l、EcoRI及びXhoI制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー（配列番号25及び26に記載）を各0.4 $\mu$ M, 0.2mM dNTP, 1.25UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ（宝酒造社製）となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 $\mu$ lとし、Thermal Cycler（BIO RAD社製）を用いて、98 $^{\circ}$ C-10秒、55 $^{\circ}$ C-15秒、72 $^{\circ}$ C-4分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号4のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて約1000bpのDNA断片を精製した。

[0079] 精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt（Invitrogen社製）にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドをEcoRI及びXhoI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、EcoRI、XhoI制限酵素で処理した大腸菌用発現ベクターpET30a（Novagen社製）に挿入した。このベクターの使用によりHisタグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌BL21（DE3）に形質転換し、1mM IPTGによる発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

[0080] (2)組換えSCD1タンパク質の精製

上記で得られた、配列番号4を発現する組換え大腸菌を100 $\mu$ g/mlアンピシリン含有LB培地にて600nmでの吸光度が0.7付近になるまで37 $^{\circ}$ Cで培養後、イソプロピル- $\beta$ -D-1-チオガラクトピラノシド

終濃度が1 mMとなるよう添加し、さらに37°Cで4時間培養した。その後4800 rpmで10分間遠心し集菌した。この菌体ペレットをリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁し、さらに4800 rpmで10分間遠心し菌体の洗浄を行った。

[0081] この菌体を50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、氷上にて超音波破碎を行った。大腸菌超音波破碎液を6000 rpmで20分間遠心分離し、得られた上清を可溶性画分、沈殿物を不溶性画分とした。

[0082] 不溶性画分を50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて懸濁し6000 rpmで15分間遠心した。本操作を2回繰り返す、脱プロテアーゼ操作を行った。

[0083] この残渣を6 M グアニジン塩酸塩、0.15 M 塩化ナトリウム含有50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、4°Cで20時間静置しタンパク質を変性させた。この変性操作後、6000 rpmで30分間遠心して得られた可溶性画分を、定法に従って調製したニッケルキレートカラム (担体: Chelating Sepharose (商標) Fast Flow (GE Health Care社)、カラム容量5 mL、平衡化緩衝液: 6 M グアニジン塩酸塩、0.15 M 塩化ナトリウム含有50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に添加し、さらに4°Cで一晩静置しニッケルキレート化した担体への吸着を行った。このカラム担体を1500 rpmで5分間遠心して上清を回収し、カラム担体についてはリン酸緩衝化生理食塩水で懸濁後、カラムに再充填した。

[0084] カラム未吸着画分をカラム容量の10倍量の0.5 M 塩化ナトリウム含有0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) にて洗浄操作を行った後、直ちに、0.5 M 塩化ナトリウム含有0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0) にて溶出を行い精製画分とし、以降この精製画分を投与試験用の材料とした。なお、各溶出画分中の目的タンパク質は、定法に従って行ったクマシー染色によって確認した。

[0085] 上記方法によって得られた精製標品を反応用緩衝液 (50 mM Tris

-HCl, 100mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> (pH8.0)) に置換した後、FactorXa Cleavage Capture Kit (Novagen社製) を用いて添付プロトコールに従ってFactorXaプロテアーゼによるHisタグの切断及び目的タンパク質の精製を行った。次に、上記方法によって得られた精製標品12mlを、限外ろ過NANOSEP 10K OMEGA (PALL社製) を用いて、生理用リン酸緩衝液 (日水製薬社製) 置換した後、HTタフリンアクロディスク0.22μm (PALL社製) にて無菌ろ過を行い、これを実験に用いた。

[0086] (3) ヒト組換えSCD1タンパク質反応性のCD8陽性細胞障害性T細胞の誘導

健康人から末梢血を分離し、Lymphocyte separation medium (OrganonpTeknika, Durham, NC) に重層して1,500rpmで室温で20分間遠心分離した。末梢血単核球 (PBMC) を含有する画分を回収し、冷リン酸塩緩衝液中で3回 (又はそれ以上) 洗浄し、PBMCを得た。得られたPBMCをAIM-V培地 (Life Technologies, Inc., 米国ニューヨーク州Grand Island) 20mlに懸濁し、培養フラスコ (Falcon) 中に37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で2時間付着させた。非付着細胞はT細胞調製に用い、付着細胞は樹状細胞を調製するために用いた。

[0087] 一方、付着細胞をAIM-V培地中でIL-4 (1000U/ml) 及びGM-CSF (1000U/ml) の存在下で培養した。6日後に得られた非付着細胞集団を回収し、ヒト組換えSCD1タンパク質を10μg/mlの濃度で添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で4時間培養した。培養後、IL-4 (1000U/ml)、GM-CSF (1000U/ml)、IL-6 (1000U/ml、Genzyme, Cambridge, MA)、IL-1β (10ng/ml、Genzyme, Cambridge, MA) 及びTNF-α (10ng/ml、Genzyme, Cambridge, MA) を添加したAIM-V培地に交換してさらに2日間培養した後得られ

た非付着細胞集団を樹状細胞として用いた。

[0088] 調製した樹状細胞をAIM-V培地中に $1 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度で懸濁し、ヒト組換えSCD1タンパク質を再度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、96穴プレートを用いて $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で4時間培養した。培養後、X線照射( $3000 \text{rad}$ )し、AIM-V培地で洗浄し、 $10\%$ ヒトAB血清(Nabi, Miami, FL)、IL-6( $1000 \text{U}/\text{ml}$ )及びIL-12( $10 \text{ng}/\text{ml}$ 、Genzyme, Cambridge, MA)を含有するAIM-V培地で懸濁し、24穴プレート1穴当りにそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ添加した。さらに調製したT細胞集団を1穴当りそれぞれ $1 \times 10^6$ 細胞添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で培養した。7日後、それぞれの培養上清を捨て、上記と同様にヒト組換えSCD1タンパク質で処理後X線照射した樹状細胞を $10\%$ ヒトAB血清(Nabi, Miami, FL)、IL-7( $10 \text{U}/\text{ml}$ 、Genzyme, Cambridge, MA)及びIL-2( $10 \text{U}/\text{ml}$ 、Genzyme, Cambridge, MA)を含有するAIM-V培地で懸濁し(細胞密度： $1 \times 10^5$ 細胞/ml)、24穴プレート1穴当りにそれぞれ $1 \times 10^5$ 細胞ずつ添加し、さらに培養した。同様の操作を7日間おきに4~6回繰返した後に刺激されたT細胞を回収し、フローサイトメトリーによりCD8陽性T細胞の誘導を確認した。

[0089] なお、陰性コントロールとして本発明の範囲外の配列であるタンパク質(配列番号27)を使用した。

[0090] 次に、本ポリペプチドで刺激されたCD8陽性T細胞がSCD1を発現する腫瘍細胞を障害することができるかを検討した。

[0091] SCD1の発現が確認されたヒトグリオーマ細胞株U-87MG(ATCCより購入) $10^5$ 個を $50 \text{ml}$ 容量の遠心チューブに集め、 $100 \mu\text{Ci}$ のクロミウム51を加え $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。その後 $10\%$ ヒトAB血清を含むAIM-V培地で3回洗浄し、96穴V底プレート1穴あたり $10^3$ 個ずつ添加し、さらにこれに後 $10\%$ ヒトAB血清を含むAIM-

V培地で懸濁された $10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4$ 及び $1.25 \times 10^4$ 個のヒト組換えSCD1タンパク質で刺激されたCD8陽性T細胞をそれぞれ添加して、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で4時間培養した。培養後、障害を受けた腫瘍細胞から放出される培養上清中のクロミウム51の量をガンマカウンターを用いて測定することによって、ヒト組換えSCD1タンパク質で刺激されたCD8陽性T細胞の細胞障害活性を算出した。

[0092] その結果、ヒト組換えSCD1タンパク質で刺激されたCD8陽性T細胞がU-87MGに対する細胞障害活性を有することが判明した。一方、陰性コントロールタンパク質（配列番号27）を用いて誘導したCD8陽性T細胞は細胞障害活性を示さなかった。従って、本発明で用いられるヒト組換えSCD1タンパク質は腫瘍細胞を障害することができるCD8陽性細胞障害性T細胞を誘導する能力があることが明らかになった。

[0093] なお、細胞障害活性は、上記のように刺激誘導されたCD8陽性T細胞 $10^5$ 個とクロミウム51を取り込ませた $10^3$ 個の悪性脳腫瘍細胞株U-87MGとを混合して4時間培養し、培養後培地に放出されたクロミウム51の量を測定して、式1により算出したCD8陽性T細胞のT98Gに対する細胞障害活性を示す。

[0094] 式1：細胞障害活性（%）＝CD8陽性T細胞を加えた際のU-87MGからのクロミウム51遊離量（cpm） $\div$ 1N塩酸を加えた標的細胞からのクロミウム51遊離量（cpm） $\times 100$ 。

### 産業上の利用可能性

[0095] 本発明は、各種癌に対して抗腫瘍活性を発揮するポリペプチドを含む免疫誘導剤を提供するため、癌の治療及び／又は予防に有用である。

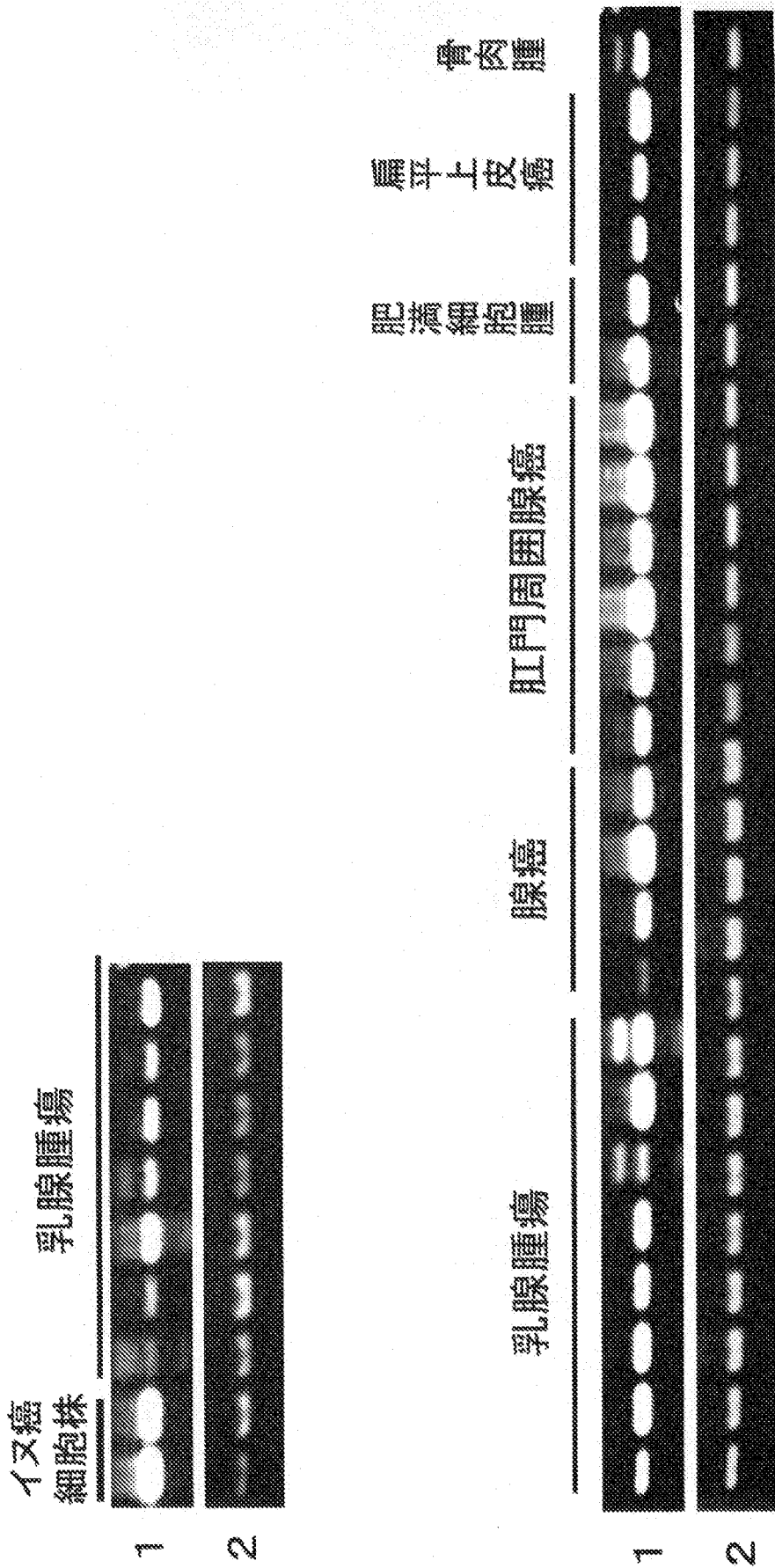
## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の(a)ないし(c)のいずれかのポリペプチドから選択され、かつ免疫誘導活性を有する少なくとも1つのポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、生体内で該ポリペプチドを発現可能な組換えベクター、を有効成分として含有する免疫誘導剤。
- (a)配列表の配列番号4、2、22、24に記載のアミノ酸配列中の連続する7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド。
- (b)前記(a)のポリペプチドと85%以上の配列同一性を有し、かつ7個以上のアミノ酸から成るポリペプチド。
- (c)前記(a)又は(b)のポリペプチドを部分配列として含むポリペプチド。
- [請求項2] 前記免疫誘導活性を有するポリペプチドが配列表の配列番号4、2、22、24に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項1に記載の免疫誘導剤。
- [請求項3] 抗原提示細胞の処理剤である、請求項1又は2に記載の免疫誘導剤。
- [請求項4] 癌の治療及び／又は予防剤である、請求項1又は2に記載の免疫誘導剤。
- [請求項5] 前記癌がSCD1を発現する癌である、請求項4に記載の免疫誘導剤。
- [請求項6] 前記癌が乳癌、脳腫瘍、大腸癌、肛門周囲腺癌、神経芽腫、肥満細胞腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、前立腺癌又は白血病である、請求項4又は5に記載の免疫誘導剤。
- [請求項7] 免疫増強剤をさらに含む、請求項1～6のいずれかに記載の免疫誘導剤。
- [請求項8] 前記免疫増強剤が、フロイントの不完全アジュバント、モンタニド、ポリICおよびその誘導体、CpGオリゴヌクレオチド、インター

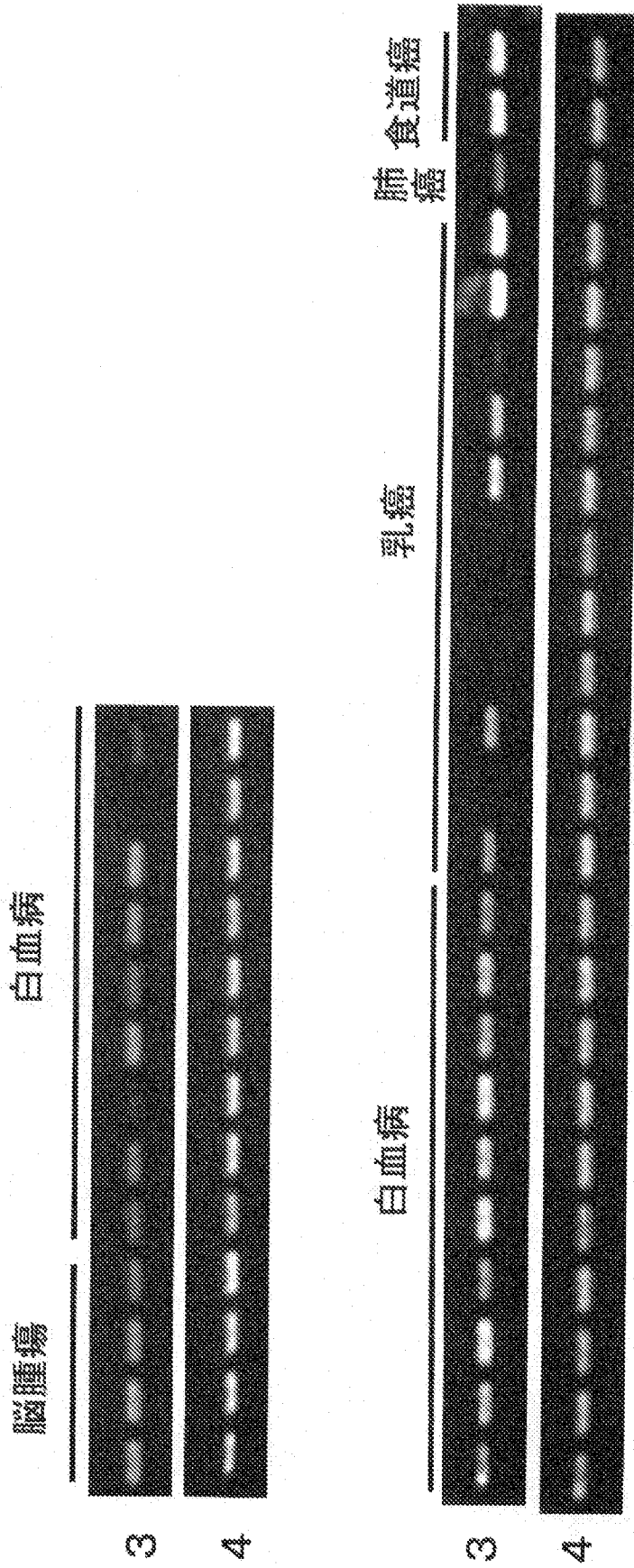
ロイキン12、インターロイキン18、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\omega$ 、インターフェロン $\gamma$ 並びにF1t3リガンドから成る群より選ばれる少なくとも一つである請求項7記載の免疫誘導剤。

【図1】

【図1】

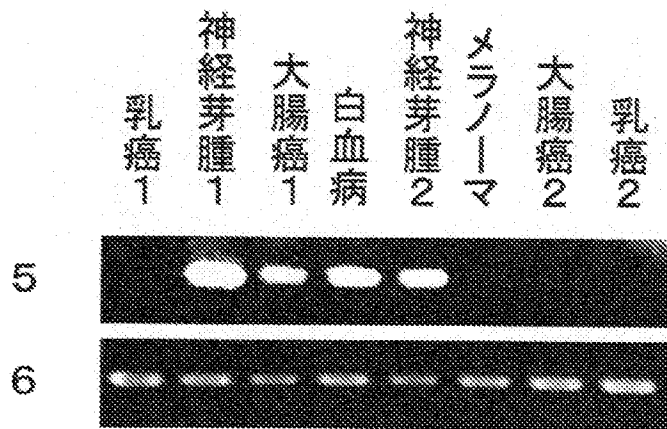


[圖2]



[図3]

【図3】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062749

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i,  
A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(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)

A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5698396 A (Ludwig Institute For Cancer Research), 16 December 1997 (16.12.1997), & WO 1996/040209 A1 & EP 831879 A1	1-8
A	WO 2002/074786 A2 (BAYER CORP.), 26 September 2002 (26.09.2002), (Family: none)	1-8
A	JP 2003-533965 A (Johnson & Johnson Consumer Companies, Inc.), 18 November 2003 (18.11.2003), & WO 2000/009754 A2 & EP 1105538 A2	1-8

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  
15 June, 2012 (15.06.12)

Date of mailing of the international search report  
26 June, 2012 (26.06.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062749

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAHIN, U. et al, Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, Vol.92, No.25, p.11810-3	1-8
A	MOORE, S. et al, Loss of stearyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma, International journal of cancer, 2005, Vol.114, No.4, p.563-71	1-8
A	MORGAN-LAPPE, S.E. et al, Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen, Cancer research, 2007, Vol.67, No.9, p.4390-8	1-8
A	BANSAL, S. et al, Silencing of stearyl-CoA desaturase inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma, American Journal of Gastroenterology, 2008, Vol.103, Suppl., p.S146	1-8
A	IGAL, R.A., Stearyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer, Carcinogenesis, 2010, Vol.31, No.9, p.1509-1515	1-8
A	ZHANG, H. et al, The Scd1 Gene Functions as a Tumor Suppressor In Leukemia Stem Cells, Blood, 2010, Vol.116, No.21, p.92	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(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 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012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) CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)		
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
A	US 5698396 A (Ludwig Institute For Cancer Research) 1997. 12. 16, & WO 1996/040209 A1 & EP 831879 A1	1-8
A	WO 2002/074786 A2 (BAYER CORPORATION) 2002. 09. 26, (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2003-533965 A (ジョンソン・アンド・ジョンソン・コンシュー マー・カンパニーズ・インコーポレイテッド) 2003. 11. 18, & WO 2000/009754 A2 & EP 1105538 A2	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 15. 06. 2012	国際調査報告の発送日 26. 06. 2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 荒巻 真介 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4764

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
A	SAHIN, U. et al, Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, Vol.92, No.25, p.11810-3	1-8
A	MOORE, S. et al, Loss of stearyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma, International journal of cancer, 2005, Vol.114, No.4, p.563-71	1-8
A	MORGAN-LAPPE, S.E. et al, Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen, Cancer research, 2007, Vol.67, No.9, p.4390-8	1-8
A	BANSAL, S. et al, Silencing of stearyl-CoA desaturase inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma, American Journal of Gastroenterology, 2008, Vol.103, Suppl., p.S146	1-8
A	IGAL, R.A., Stearyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer, Carcinogenesis, 2010, Vol.31, No.9, p.1509-1515	1-8
A	ZHANG, H. et al, The Scd1 Gene Functions as a Tumor Suppressor In Leukemia Stem Cells, Blood, 2010, Vol.116, No.21, p.92	1-8