

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-256454

(P2013-256454A)

(43) 公開日 平成25年12月26日(2013.12.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06 ZNA	4B024
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B065
C12N 5/0784 (2010.01)	C12N 5/00 2O2M	4C084
C12N 5/0783 (2010.01)	C12N 5/00 2O2L	4C087
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-132288 (P2012-132288)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(22) 出願日	平成24年6月11日 (2012.6.11)	(74) 代理人	110000176 一色国際特許業務法人
		(72) 発明者	塚本 信夫 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内
		(72) 発明者	松下 麻衣子 東京都港区芝公園1丁目5番30号 慶應義塾大学芝共立キャンパス内
		(72) 発明者	服部 豊 東京都港区芝公園1丁目5番30号 慶應義塾大学芝共立キャンパス内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 がん免疫療法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 がん免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激されたT細胞、これらのペプチドや細胞を利用した組成物、医薬組成物、医薬、及び抗腫瘍薬、及びがん免疫療法に使用するためのペプチドの同定方法、およびスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 D Y G M I D E S I (配列番号1) からなるペプチドを用いて、目的の組成物、抗原提示細胞、T細胞、抗腫瘍薬の作製。前記D Y G M I D E S I (配列番号1) において、1～数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドに対し、がん免疫療法への適用可否の検定法、または、目的とするペプチドのスクリーニング法。

【選択図】 なし

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチド。
- 【請求項 2】
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチドを提示した抗原提示細胞。
- 【請求項 3】
樹状細胞であることを特徴とする請求項 2 の抗原提示細胞。
- 【請求項 4】
請求項 2 または 3 に記載の抗原提示細胞によって誘導され、C X o r f 4 8 を発現する細胞を認識する T 細胞。 10
- 【請求項 5】
細胞障害性 T 細胞であることを特徴とする請求項 4 の T 細胞。
- 【請求項 6】
C X o r f 4 8 を発現する細胞が腫瘍細胞であることを特徴とする請求項 4 の T 細胞。
- 【請求項 7】
前記腫瘍細胞が、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫であることを特徴とする請求項 6 の T 細胞。
- 【請求項 8】
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチド、請求項 2 または 3 に記載の抗原提示細胞、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の T 細胞を含有する組成物。 20
- 【請求項 9】
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチド、請求項 2 または 3 に記載の抗原提示細胞、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の T 細胞を含有する医薬組成物。
- 【請求項 10】
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチド、請求項 2 または 3 に記載の抗原提示細胞、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の T 細胞を含有する抗腫瘍薬。
- 【請求項 11】
悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫に対する抗腫瘍薬であることを特徴とする請求項 10 に記載の抗腫瘍薬。
- 【請求項 12】 30
がん免疫療法に使用するためのペプチドの同定方法であって、
D Y G M I D E S I (配列番号 1) において、1 ~ 数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドが、がん免疫療法に使用できるかどうかを検定する工程を含む、同定方法。
- 【請求項 13】
がん免疫療法に使用するためのペプチドのスクリーニング方法であって、
D Y G M I D E S I (配列番号 1) からなるペプチドに対し、アミノ酸変異を導入し、変異ペプチドを作製する工程と、
前記変異ペプチドが、がん免疫療法に使用できるかどうか、検定する工程と、
を含むスクリーニング方法。 40
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
本発明は、がん免疫療法に関する。
- 【背景技術】
- 【0002】
近年、腫瘍免疫学において、免疫細胞による腫瘍抗原認識機構がかなり解明されてきた。それによると、まず、抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cells ; D C) は、細胞内で、腫瘍が発現するタンパク質を分解する際に生じた 8 ~ 10 個のアミノ酸からなる抗原ペプチドを、主要組織適合性抗原複合体 (major histocompatibility complex ; M H

C、ヒトでは、human leukocyte antigen ; H L A) と共に細胞表面に提示する。細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte ; C T L) は、樹状細胞表面の H L A クラス I に結合した抗原ペプチドを認識し、活性化・増殖し、腫瘍内に侵入し、抗原ペプチドが由来するタンパク質を有する腫瘍細胞に対し細胞障害を生じる (例えば、非特許文献 1 参照) 。

【 0 0 0 3 】

この腫瘍抗原認識機構を利用し、正常組織に発現しないか極めて発現が低いがんが発現している分子を標的とした免疫治療や分子標的治療が開発されてきた。このような治療方法は、例えばがん患者体内でがん細胞が原発巣に限局していない場合でもがん細胞を攻撃できるため、外科的治療、化学的治療、放射線治療といった標準治療では腫瘍の治療が困難な場合に、特に有効な手段として期待されている。

10

【 0 0 0 4 】

具体的には、腫瘍特異的タンパク質由来の抗原ペプチドを細胞表面に提示する樹状細胞を *in vitro* で作製し、増殖させ、腫瘍患者に投与したり、その樹状細胞によって教育された細胞障害性 T 細胞を投与したりすることにより、腫瘍患者の体内で腫瘍免疫を誘導する。あるいは、腫瘍特異的タンパク質を腫瘍患者に投与し、患者の体内で、腫瘍免疫機構の全過程を誘導させるのである (例えば、非特許文献 2 ~ 7 参照) 。これらの手法は、がん免疫療法として知られている。

【 0 0 0 5 】

このがん免疫療法に用いることができるペプチドは、腫瘍特異的抗原由来であることが好ましいが、腫瘍に発現し、正常組織では、精巣以外には発現が観察されない癌精巣抗原 (Cancer-Testis antigen ; C T 抗原) 由来でもよい (例えば、非特許文献 8 参照) 。精巣では、H L A が発現していないため、C T 抗原に対する細胞傷害性 T 細胞や抗体による攻撃を受けることが無いからである。

20

【 0 0 0 6 】

一方、最近、腫瘍組織は均一ではなく、抗がん剤や放射線に抵抗性の高いがん細胞集団が存在することが明らかにされ、治療後の再発の原因とされている。特に、腫瘍形成能力が高い一群の細胞集団が存在し、がん幹細胞として知られている。例えば、乳がん細胞株や大腸がん細胞株において、色素 Hoechst 33342 を排出する能力が高い *side population* は、がん幹細胞としての機能を有していることが報告されている (例えば、非特許文献 9 参照) 。このような抗がん剤や放射線に抵抗性の腫瘍細胞に発現が高い C T 抗原を標的とした免疫治療や分子標的治療が開発できれば、放射線などによる治療後の腫瘍再発の可能性を低下させ、より奏効率の高い治療法になることが期待される。

30

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 *Arch . Surg .* (1 9 9 0) 1 2 6 : 2 0 0 - 2 0 5

【 非特許文献 2 】 *Science* (1 9 9 1) 2 5 4 : 1 6 4 3 - 1 6 4 7

【 非特許文献 3 】 *J . Exp . Med .* (1 9 9 6) 1 8 3 : 1 1 8 5 - 1 1 9 2

【 非特許文献 4 】 *J . Immunol .* (1 9 9 9) 1 6 3 : 4 9 9 4 - 5 0 0 4

【 非特許文献 5 】 *Proc . Natl . Acad . Sci . USA* (1 9 9 5) 9 2 : 4 3 2 - 4 3 6

40

【 非特許文献 6 】 *Science* (1 9 9 5) 2 6 9 : 1 2 8 1 - 1 2 8 4

【 非特許文献 7 】 *J . Exp . Med .* (1 9 9 7) 1 8 6 : 7 8 5 - 7 9 3

【 非特許文献 8 】 *Mol . Oncol .* (2 0 1 1) 5 : 1 6 4 - 1 8 2

【 非特許文献 9 】 *Cancer Res .* (2 0 0 8) 6 8 : 2 4 1 9 - 2 4 2 6

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、がん免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激された T 細胞、こ

50

これらのペプチドや細胞を利用した組成物、医薬組成物、医薬、及び抗腫瘍薬、これらのペプチドや抗原提示細胞を利用したがんワクチン、及びがん免疫療法に使用するためのペプチドの同定方法やスクリーニング方法を提供することを目的となされた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

悪性黒色腫や白血病で高頻度に高い発現が認められるCXorf48は、染色体Xq26.3に存在し、肝細胞がん、大腸がん、胃がん、非小細胞肺癌に発現するCT抗原BJ-HCC-20として同定された(Biochem.Cell.Biol.(2004) 82:577-582)。本発明者は、これまでに同定されている多数のCT抗原のうち、CXorf48のアミノ酸配列の一部であるDYGMIDESI(配列番号1)を用いることにより、HLA-A*2402陽性でCXorf48を発現している悪性黒色腫細胞株や白血病細胞株を傷害する細胞傷害性T細胞が誘導できることを見出し、本発明の完成に至った。

10

【0010】

本発明の一実施態様は、DYGMIDESI(配列番号1)からなるペプチドである。

本発明の他の一実施態様は、DYGMIDESI(配列番号1)からなるペプチドを提示した抗原提示細胞である。抗原提示細胞は、樹状細胞であってもよい。

【0011】

本発明のさらなる他の一実施態様は、前記抗原提示細胞によって誘導され、CXorf48を発現する細胞を認識するT細胞である。T細胞は、細胞障害性T細胞であってもよい。また、CXorf48を発現する細胞が腫瘍細胞であってもよい。前記腫瘍細胞が、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫であってもよい。

20

【0012】

本発明のさらなる他の一実施態様は、DYGMIDESI(配列番号1)からなるペプチド、または前記いずれかの抗原提示細胞、または前記いずれかのT細胞を含有する組成物、医薬組成物、医薬、抗腫瘍薬である。なお、当該ペプチドまたは当該抗原提示細胞を含有するがんワクチンとしてもよい。これらの医薬組成物、医薬または抗腫瘍薬は、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫に対するものであってもよい。

【0013】

本発明のさらなる他の一実施態様は、がん免疫療法に使用するためのペプチドの同定方法であって、DYGMIDESI(配列番号1)において、1~数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドが、がん免疫療法に使用できるかどうかを検定する工程を含む。

30

【0014】

本発明のさらなる他の一実施態様は、がん免疫療法に使用するためのペプチドのスクリーニング方法であって、DYGMIDESI(配列番号1)からなるペプチドに対し、アミノ酸変異を導入し、変異ペプチドを作製する工程と、前記変異ペプチドが、がん免疫療法に使用できるかどうか、検定する工程と、を含む。

【発明の効果】

【0015】

本発明によって、がん免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激されたT細胞、これらのペプチドや細胞を利用した組成物、医薬組成物、医薬、及び抗腫瘍薬、これらのペプチドや抗原提示細胞を利用したがんワクチン、及びがん免疫療法に使用するためのペプチドの同定方法やスクリーニング方法が提供できるようになった。

40

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】本発明の一実施例において、正常組織及びメラノーマ細胞株におけるCXorf48遺伝子の発現を調べた結果を示す図である。

【図2A】本発明の一実施例において、固形腫瘍細胞株におけるCXorf48遺伝子の

50

発現を調べた結果を示す図である。

【図2B】本発明の一実施例において、造血器腫瘍細胞株におけるC X o r f 4 8 遺伝子の発現を調べた結果を示す図である。

【図3】本発明の一実施例において、慢性骨髄性白血病患者(C M L 1 ~ 2 0)及び健康人のリンパ球におけるC X o r f 4 8 遺伝子の発現を調べた結果を示す図である。

【図4】本発明の一実施例において、多発性骨髄腫細胞株(K U 8 1 2 及びK M S 3 4)のがん幹細胞分画(KU812(CML)CD34+CD38-、KMS34(Multiple myeloma)CD138-)におけるC X o r f 4 8 遺伝子の発現を調べた結果を示す図である。

【図5】本発明の一実施例において、配列番号1からなるペプチドによって誘導されたC T Lをeffector細胞とし、配列番号1からなるペプチドを添加したC 1 R - A 2 4 細胞をtarget細胞とした、⁵¹Cr細胞傷害試験の結果を示す図である。

【図6】本発明の一実施例において、配列番号1からなるペプチドによって誘導されたC T Lをeffector細胞とし、メラノーマ患者由来のメラノーマ細胞(H L A - A 2 4 0 2 陽性、C X o r f 4 8 陽性)をtarget細胞とした、⁵¹Cr細胞傷害試験の結果を示す図である。

【図7】本発明の一実施例において、配列番号1からなるペプチドによって誘導されたC T Lによって誘起されたI F N- 分泌を、Enzyme-Linked Immunospot法によって測定した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、M. R. Green & J. Sambrook (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (4th edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2012); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

【0018】

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

【0019】

== がん免疫を効率的に誘導できるペプチド ==

現在、抗腫瘍薬として、腫瘍特異的がん抗原、がん抗原提示細胞、またはがん抗原反応性細胞障害性T細胞を腫瘍患者に投与する方法が開発されている。そのうち、腫瘍特異的がん抗原、またはがん抗原提示細胞を含有する抗腫瘍薬は、がんワクチンとして知られている。

【0020】

D Y G M I D E S I (配列番号1)からなるペプチドを合成し、抗原提示細胞である樹状細胞表面に投与すると、H L A クラスI分子であるH L A - A * 2 4 0 2 に結合し、細胞表面に提示され、細胞障害性T細胞に認識されることで特異的な細胞障害性T細胞を効率よく誘導できる。また、このペプチドの刺激により樹立された細胞障害性T細胞は、C X o r f 4 8 を発現している腫瘍細胞を効率よく認識する。従って、配列番号1のペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、及びその抗原提示細胞の刺激によって樹立された細胞障害性T細胞は、H L A - A * 2 4 0 2 陽性でC X o r f 4 8 を発現している腫瘍細胞に対する抗腫瘍薬として有用である。

【0021】

なお、日本人のHLAクラスIのタイプは、HLA-A*02とHLA-A*24が多く、これらで日本人全体の約80%をカバーする。なお、日本人に多い遺伝子型として、HLA-A*24に対してはA*2402が挙げられ、本明細書では、細胞の遺伝子型としてA*2402と記載した場合、そのアレルを少なくとも一つ有することを意味するものとする。

【0022】

= = 抗腫瘍薬の投与方法 = =

本発明の組成物、医薬組成物、医薬、及び抗腫瘍薬は、配列番号1からなるペプチド、配列番号1からなるペプチドを提示した抗原提示細胞、または配列番号1からなるペプチドを提示した抗原提示細胞の刺激によって樹立されたT細胞を含有してもよい。

10

【0023】

本発明においては、腫瘍特異的がん抗原としてCXorf48の部分ペプチドを用いているので、治療及び予防の対象となる腫瘍は、CXorf48が発現している腫瘍であれば何でもよく、例えば、肝細胞がん、大腸がん、胃がん、非小細胞肺がん、乳がん、悪性黒色腫、神経膠芽腫、肺がん、膵臓がん、膀胱がん、前立腺がん、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫が挙げられるが、特に発現している患者の頻度が非常に高い悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫が好ましい。主な治療及び予防の対象は、こうした腫瘍を有するヒト患者であるが、腫瘍を有するヒト以外の脊椎動物でもかまわない。

【0024】

20

[ペプチド]

本発明の抗腫瘍薬は、配列番号1からなるペプチドを含有してもよい。この場合、あらかじめ患者のHLAクラスIのタイプを調べるのが好ましい。ここでは、患者のHLAクラスIタイプがA*2402である場合に、配列番号1からなるペプチドを投与することが好ましい。この抗腫瘍薬は、配列番号1からなるペプチド以外に、治療対象である腫瘍細胞が発現している他種の腫瘍抗原ペプチドを含有していてもよい。また、投与する際には、免疫誘導能を高めるアジュバンドなどと共にペプチドを投与してもよい。また、投与されるペプチドは、生体内で分解されにくくするような修飾が施されていてもよい。さらには、ペプチドそのものではなく、これらのペプチドをコードするDNAを組み込んだ発現ベクターなどを用い、DNAワクチンとして投与してもよい。

30

【0025】

投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されることはない。

【0026】

ここで、配列番号1からなるペプチドの取得方法は特に制限されず、遺伝子組み換え技術を用いて製造された組換えペプチドであっても、周知の方法で化学合成したペプチドであってもよい。

【0027】

[抗原提示細胞]

配列番号1からなるペプチドを提示した抗原提示細胞も、抗腫瘍薬として使用することができる。ここで、細胞表面に提示されているペプチドは、無修飾であっても、糖やリン酸などで修飾されてもよく、生体内で分解されにくくするような修飾が施されていてもよい。抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、B7や4-1BBLなどのT細胞刺激因子などを遺伝子導入等で強制的に発現させた腫瘍細胞（偽抗原提示細胞）等が例示できるが、抗原提示能の高さなどを考慮すると、樹状細胞が好ましい。以下、樹状細胞の単離方法の一例を記載するが、他の細胞も公知の方法で容易に取得できる。

40

【0028】

まず、脊椎動物個体の末梢血から単核球（以下、PBMCとも称する）を単離し、HLAクラスIタイプを調べてA*2402であることを確認する。このPBMCは、治療対象となる個体自身から分離することが好ましいが、他の個体から単離してもよい。また、

50

このP B M CはC D 1 4 陽性またはC D 1 1 c 陽性であることが好ましい。P B M Cの単離方法は特に制限されず、単離したいP B M Cの種類によって当業者が適宜決定できる。例えば、フィコール遠心分離法等によりP B M C全体(P B M C分画)を単離でき、抗体結合磁気ビーズ分離法等によりC D 1 4 陽性P B M CやC D 1 1 c 陽性P B M Cを単離できる。単離したP B M Cを、G M - C S FとI L - 4を添加した培地で5 ~ 7日間培養することにより、樹状細胞前駆細胞に分化誘導することができる。このようにして分化誘導した樹状細胞前駆細胞のH L AクラスIタイプがA * 2 4 0 2である場合には、配列番号1からなるペプチドを添加する。こうして得られた樹状細胞は、配列番号1からなるペプチドを提示した抗原提示細胞であり、これを、がん罹患した個体に投与してもよい。

【0029】

投与部位は、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されない。ただし、生理的な樹状細胞の抗原提示を含む生理的な抗がん免疫反応が、がん組織内並びに樹状細胞投与部位の所属リンパ節近傍で行われることを考慮すると、がん組織内またはリンパ節内への直接投与が好ましい。

【0030】

[がん抗原反応性細胞障害性T細胞]

本発明のがん抗原反応性細胞障害性T細胞は、C X o r f 4 8を発現する細胞を認識するT細胞であって、例えば、配列番号1からなるペプチドを提示した抗原提示細胞と共に、血清の存在下でナイーブT細胞を共培養し、C D 8 陽性細胞障害性T細胞(C T L)またはC D 4 陽性のヘルパーT細胞などへと分化させることによって得られる。

【0031】

なお、ナイーブT細胞の由来は特に限定されず、例えば、脊椎動物の末梢血由来であってもよい。用いるナイーブT細胞は、P B M C分画から単離されたC D 8 陽性細胞やC D 4 陽性細胞であってもよいが、C T Lの誘導効率を考慮すると、P B M C分画から単離されておらず、他種の細胞や成分と混在した状態のC D 8 陽性細胞やC D 4 陽性細胞であることが好ましい。例えば、P B M C分画の細胞を配列1からなるペプチドと血清が添加された培地で培養すると、P B M Cが樹状細胞前駆細胞に分化し、樹状細胞前駆細胞はさらにペプチドと結合することで樹状細胞へと分化し、このペプチドを提示する抗原提示細胞になる。この抗原提示細胞がP B M Cに含まれるC D 8 陽性T細胞を刺激し、C T Lに分化誘導する。こうして、添加したペプチドを認識するC T Lを得ることができる。この際、培養時間はC T Lが得られる範囲で当業者が適宜設定できるが、例えば、37 において4 ~ 10日間であることが好ましく、6日間であることがより好ましい。

【0032】

このようにして得られたT細胞は、単離した後、そのまま使用してもよいが、I L - 2等のインターロイキン、抗原提示細胞、および配列1からなるペプチドの存在下でさらに培養した後に使用してもよい。この操作によって、T細胞の細胞傷害性を高めることができる。

【0033】

投与部位は、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腫瘍内投与などが例示でき、特に限定されないが、細胞傷害性T細胞の場合、抗原を発現する細胞を直接攻撃できるため、腫瘍内投与が好ましい。

【0034】

== がん免疫療法に使用するためのペプチドのスクリーニング方法 ==

配列番号1からなるペプチドを基礎として、がん免疫療法に使用するための新たなペプチドを同定することができる。

【0035】

まず、配列番号1からなるペプチドに対し、1 ~ 数個のアミノ酸変異を導入した配列を設計する。アミノ酸変異の種類は特に限定されず、欠失、置換、挿入、及びそれらの組み合わせのいずれであっても構わない。アミノ酸変異の数は、特に限定されず、1 ~ 5個、1 ~ 4個、1 ~ 3個、1 ~ 2個、のいずれであっても良いが、設計した変異ペプチドは8

10

20

30

40

50

～ 10 個のアミノ酸からなることが好ましく、9 個のアミノ酸からなることが最も好ましい。すなわち、最終的にそのような数のアミノ酸からなる配列になるように、導入する変異を決め、変異ペプチドを設計する。

【0036】

そして、その様に設計した変異ペプチドを、実際に合成する。合成方法は、配列番号 1 からなるペプチドについて上述したものと、同様の方法を用いることができる。

【0037】

次に、合成した変異ペプチドが、がん免疫療法に使用できるかどうかを検定する。検定方法は特に限定されないが、当業者がその結果を見て、がんワクチンなどの抗腫瘍薬の製造に利用できるかどうか判断できるものであれば良い。例えば、変異ペプチドまたは変異ペプチドを提示させた樹状細胞が誘導した CTL が、変異ペプチドあるいは CXorf48 またはその一部を発現したり提示している細胞に対し、IFN- γ を分泌する活性があるかどうか調べたり、細胞障害活性があるかどうかを調べたりすればよい。そして、抗腫瘍薬の製造に利用できると判断できた変異ペプチドは、次の段階、例えば臨床試験などに移すことができる。

10

【0038】

この方法を応用して、がん免疫療法に使用するためのペプチドのスクリーニングを行うこともできる。即ち、複数の変異ペプチドを含むペプチドライブラリーにおいて、各変異ペプチドに対し、ここで述べたように、抗腫瘍薬の製造に利用できるかどうか検定することにより、ペプチドライブラリーの中から、がん免疫療法に使用するための変異ペプチドを同定することができる。

20

【実施例】

【0039】

[1] CXorf48 遺伝子の発現

本実施例では、CXorf48 遺伝子が、正常組織では、精巣以外で発現していないが、様々ながん細胞株およびがん組織では発現が高いことを示す。

【0040】

[1-1] まず、試料として、メラノサイトを含む正常組織、及びメラノーマ細胞株 8 検体を用い、Isogen (ニッポンジーン社) を用いて mRNA を抽出し、GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega社) を用いて cDNA を合成し、TakaraTaq polymerase (Takara Bio社) を用いて PCR を行った。図 1 に、得られた増幅産物のシグナルを示す。なお、PCR のプライマーは、全てのアイソフォームが検出できる、以下のものを用いた。

30

【0041】

Forward : 5' -GTTGTGCCTCGCCATCTTTATG-3' (配列番号 2)

Reverse : 5' -TGCACTGGGGTGATAGAAATCG-3' (配列番号 3)

図 1 に示されるように、正常組織においては、CXorf48 遺伝子は精巣においてのみ発現が観察され、メラノーマ細胞では、高頻度で、高レベルの発現が観察された。

【0042】

[1-2] 次に、試料として、固形腫瘍細胞株 13 検体、造血器腫瘍細胞株 (多発性骨髄腫細胞株を含む) 15 検体を用い、同様にして、RT-PCR を行った。今回は、増幅産物を電気泳動して得られたシグナルを、imageJ を用いて定量し、ヒトメラノーマ細胞株である 501A を基準として CXorf48 遺伝子の発現量を比較した。図 2 に、各試料において得られたシグナルと、発現量の相対値を示す。

40

【0043】

図 2 A に示されるように、CXorf48 遺伝子は、様々な種類の腫瘍 (アストログリオーマ、グリオブラストーマ、肺がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、腎がん) において、発現していた。また、図 2 B に示されるように、様々な種類の造血器腫瘍 (慢性骨髄性白血病、パーキットリンパ腫、組織球性リンパ腫、多発性骨髄腫) において、発現していた。

50

【0044】

このように、CXorf48遺伝子は、正常組織では、精巣以外で発現していないが、様々ながん細胞株および腫瘍組織で、高レベルで発現している。従って、CXorf48遺伝子をターゲットとすることで、広範な種類の腫瘍を治療することができる。

【0045】

[1-3]次に、試料として、慢性骨髄性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia; CML)患者検体20検体、健康人リンパ球5検体を用い、同様に、RT-PCRを行った。図3に、得られた増幅産物のシグナルを示す。

【0046】

図3に示されるように、CML患者においても、高頻度(20例中17例)でCXorf48遺伝子の発現が検出された。

10

【0047】

このように、CXorf48遺伝子は、CML患者においても、高頻度で、高レベルで発現している。従って、CXorf48遺伝子は、CML患者に対するがん免疫療法のためのターゲット遺伝子として有効である。

【0048】

[1-4]さらに、試料として、慢性骨髄性白血病(CML)細胞株(KU812)、または多発性骨髄腫(Multiple myeloma)細胞株(KMS34)において、それぞれ、抗CD34抗体(Miltenyi Biotec社130-081-002)と抗CD38抗体(Miltenyi Biotec社130-092-219)、または抗CD138抗体(Miltenyi Biotec社130-081-301)を用い、FACSを用いたソーティングにより、がん幹細胞分画、すなわちCD34陽性CD38陰性KU812細胞分画及びCD138陰性KMS34細胞分画を採取した(CMLのがん幹細胞分画については、Blood(1996)88(5):1796-1804を参照のこと。また、多発性骨髄腫のがん幹細胞分画については、Cancer Letters(2009)277:1-7を参照のこと。なお、これらの文献を本明細書に援用する。)。そして、同様に、RT-PCRを行い、CXorf48遺伝子の発現量を比較した。図4に、各試料において得られたシグナルと、発現量の相対値を示す。

20

【0049】

図4に示されるように、CD34陽性CD38陰性KU812細胞分画、及びCD138陰性KMS34細胞分画で得られたがん幹細胞においても、CXorf48遺伝子の発現が検出できた。従って、CXorf48遺伝子は、CML患者に対するがん免疫療法のターゲット遺伝子として、非常に有効である。

30

【0050】

[2]HLA-A*2402陽性健康人PBMCを用いたCTLの誘導

まず、HLA-A*2402陽性健康人から末梢血をヘパリン採血し、その末梢血に等量のPBS(Phosphate Buffered Salines;Sigma-Aldrich社)を加え、Lymphoprep(Nycomed社)に重層して遠心し(2000rpm、30分、室温)、PBMCが含まれる中間層をPBMC分画として分離した。得られたPBMCに対し、MACS法を用い、CD14陽性細胞を単離した。この細胞を、IL-4(最終濃度100ng/ml)及びGM-CSF(最終濃度100ng/ml)を添加した10%AB型ヒト血清添加AIM-V培地(GIBCO社)で、37℃、5%CO₂環境下で(以下、全ての培養は同環境条件で行った)5日間培養した後、TNF-α(最終濃度20ng/ml)を培地に添加し、さらに2日間培養した。

40

【0051】

得られた樹状細胞に対し配列番号1からなるペプチド50μg/mlを加えて室温で3時間反応させ、X線照射(50Gy)したものとPBMCに対してMACS(Magnetic Cell Sorting)法を用いて単離されたCD8陽性細胞を1:20の割合で混合し、IL-7(最終濃度10ng/ml)を添加した培地で7日間刺激培養した。なお、培養途中(1日目及び4日目)で、培地にIL-2(最終濃度20u/ml)を添加した。

【0052】

50

得られた細胞に対し、P B M C に phytohaemagglutinin (SIGMA社) を 96 時間加えて作成した P H A b 1 a s t に 配列番号 1 からなるペプチド 50 μ g / m l を加えて X 線照射 (100 Gy) した細胞を 2 : 1 で混合し、さらに、7 日間刺激培養した。なお、培養途中 (1 日目及び 4 日目) で、培地に I L - 2 (最終濃度 20 u / m l) を添加した。

【0053】

得られた細胞に対し、再度、前回と同じ方法で配列番号 1 からなるペプチド 50 μ g / m l をパルスした P H A b 1 a s t を 2 : 1 の割合で混合し、さらに、7 日間刺激培養して、目的の C T L を得た。

【0054】

[3] ^{51}Cr 細胞傷害試験

[2] で得られた C T L (effector 細胞) を、10% A B ヒト血清添加 A I M - V を用いて、アイソトープ (^{51}Cr) で標識した標的細胞 (target 細胞) 1 X 10³ 細胞 / ウェルと様々な比率 (E/T 比; effector/target ratio 0.3 : 1 ~ 30 : 1) で混合し、4 時間培養後、上清を回収し、上清中の放射線量を測定した。

【0055】

まず、標的細胞として、配列番号 1 からなるペプチド 5 μ g / m l を室温で 1 時間添加した C 1 R - A 2 4 細胞を用い、コントロールとして、等量の D M S O を添加した C 1 R - A 2 4 細胞、H I V ペプチド (RYLRDQQLL : 配列番号 4)、K 5 6 2 細胞 (H L A - A * 2 4 0 2 陰性、C X o r f 4 8 陽性) を用いた。

【0056】

得られた放射線量から、下式に従って、細胞傷害割合 (Cytotoxicity) を算出し、グラフにプロットした。

【0057】

Cytotoxicity (%) = (Experimental ^{51}Cr release (cpm) - Spontaneous ^{51}Cr release (cpm)) X 100 / (Maximum ^{51}Cr release (cpm) - Spontaneous ^{51}Cr release (cpm))
Maximum ^{51}Cr release ; 標的細胞に Triton X を加えて 100% 傷害した場合の ^{51}Cr 放出
Spontaneous ^{51}Cr release ; 標的細胞に medium のみを加えた場合の ^{51}Cr 放出

図 5 に示されるように、配列番号 1 からなるペプチドを添加した C 1 R - A 2 4 細胞を標的細胞として用いた場合にのみ、特異的に細胞障害活性が検出された。このように、配列番号 1 からなるペプチドによって誘導された C T L は、H L A - A * 2 4 0 2 拘束性に抗原特異的な細胞障害活性を有する。

【0058】

次に、標的細胞として、メラノーマ患者由来のメラノーマ細胞 (H L A - A * 2 4 0 2 陽性、C X o r f 4 8 陽性) を用いた。コントロールとしては、5 2 6 m e 1 細胞 (H L A - A * 2 4 0 2 陰性、C X o r f 4 8 陽性) を用いた。同様に、細胞傷害割合を算出し、グラフにプロットした。

【0059】

図 6 に示されるように、生体由来である H L A - A * 2 4 0 2 陽性メラノーマ細胞に対しても、細胞障害活性が検出された。このように、配列番号 1 からなるペプチドによって誘導された C T L は、腫瘍細胞に対する抗腫瘍薬として有効である。

【0060】

[4] ELISpot 法 (Enzyme-Linked Immunospot 法)

抗ヒト I F N - 抗体 (Mabtech社) を P B S で 15 倍希釈した溶液を 1 ウェルあたり 100 μ l 加え、4 で一晩コーティングした 96 穴プラスチックプレートを用い、1 ウェル当たり、各細胞 5 . 0 x 10⁴ 個で C T L と標的細胞を A I M - V 培地中で 1 : 1 で混合した。37、5% C O₂ 環境下で 24 時間培養後、細胞を洗浄し、アルカリフォスファターゼで標識した抗ヒト I F N - 抗体 (Mabtech社) を反応させた。これに発色基質として B C I P (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase) (BIORAD社) および N B T (nitroblue tetrazolium) (BIORAD社) を加えて発色させ、T 細胞が産生した I F N - をスポットとして検出した。そして、E L I S p o t アナライザーにて各ウェルのスポッ

10

20

30

40

50

ト数を測定し、グラフ化した。

【0061】

標的細胞としては、配列番号1からなるペプチドを添加したC1R-A24細胞及びKMS21(HLA-A*2402陽性、CXorf48陽性)を用い、コントロールとして、培地のみ、DMSO添加C1R-A24細胞、HIVペプチドを添加したC1R-A24細胞、K562細胞(HLA-A*2402陰性、CXorf48陽性)を用いた。

【0062】

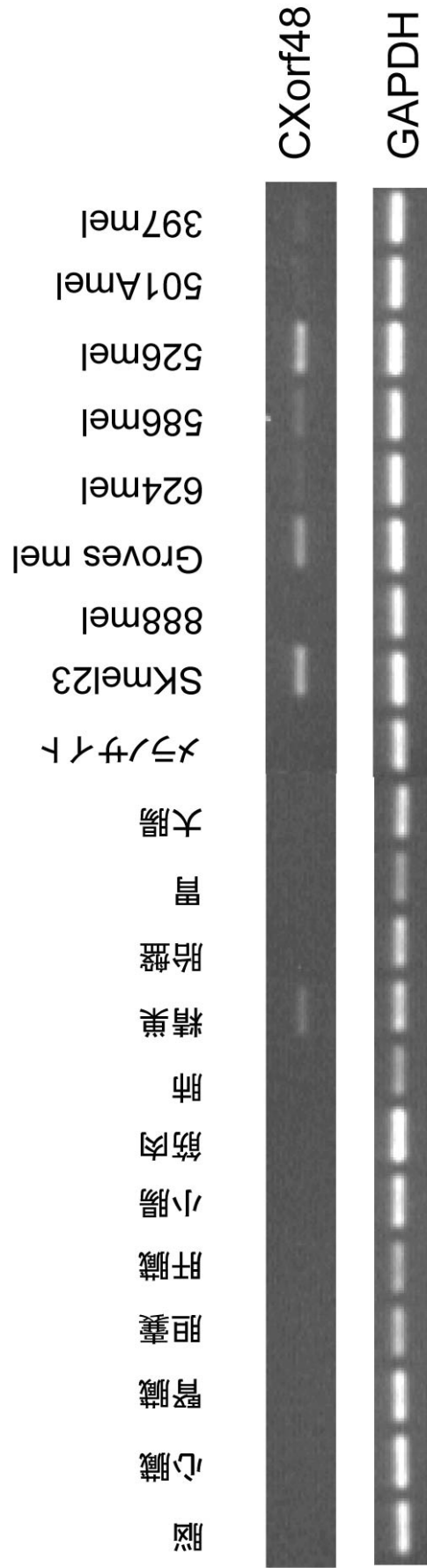
図7に示されるように、配列番号1からなるペプチドを添加したC1R-A24細胞及びKMS21からは、それぞれDMSO添加C1R-A24細胞及びDMSO添加C1R-A24細胞に比べ、有意に多量のIFN- γ が分泌された。

10

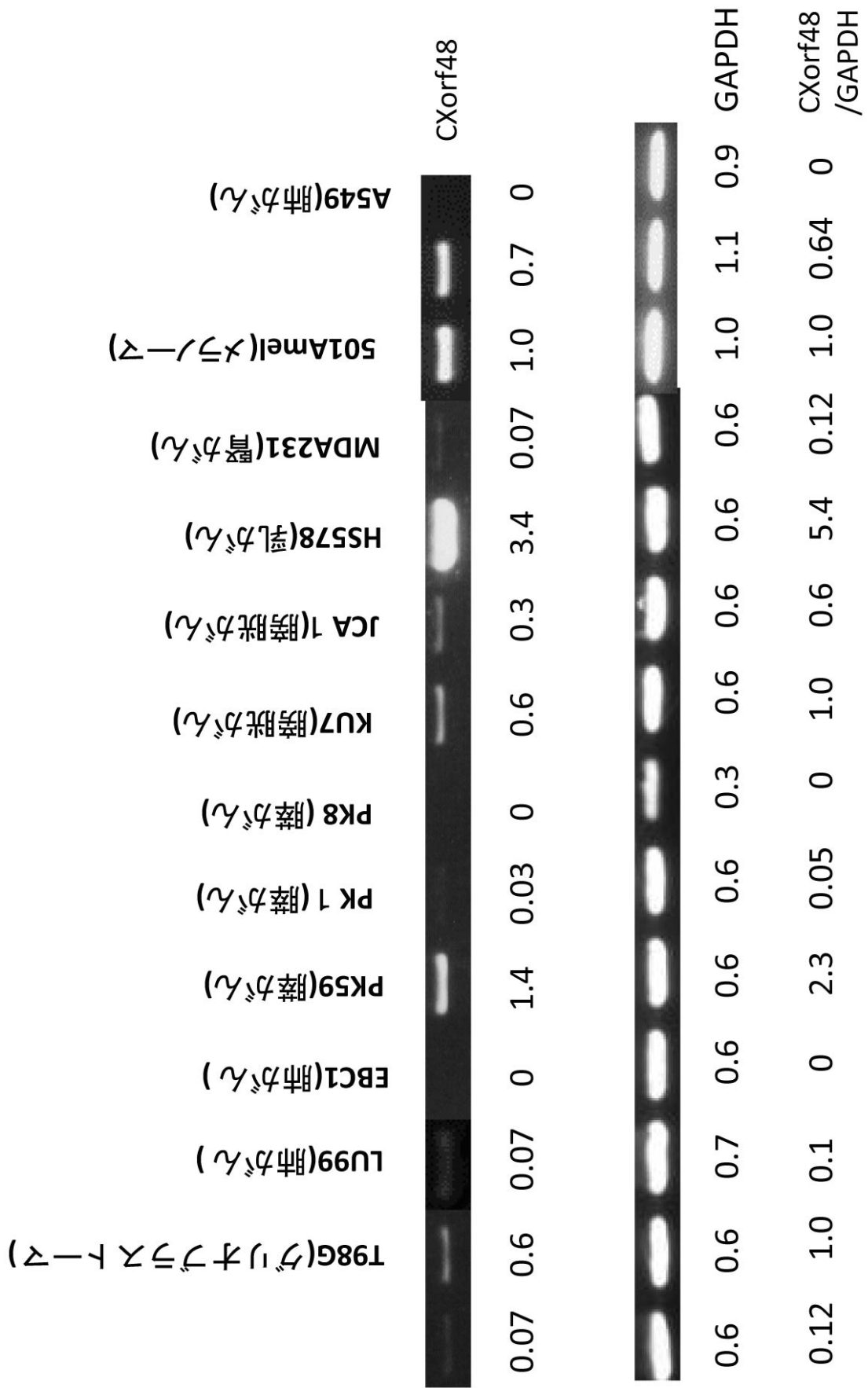
【0063】

このように、配列番号1からなるペプチドによって誘導されたCTLは、HLA-A*2402拘束性に抗原特異的なIFN- γ 分泌を生じる活性を有する。

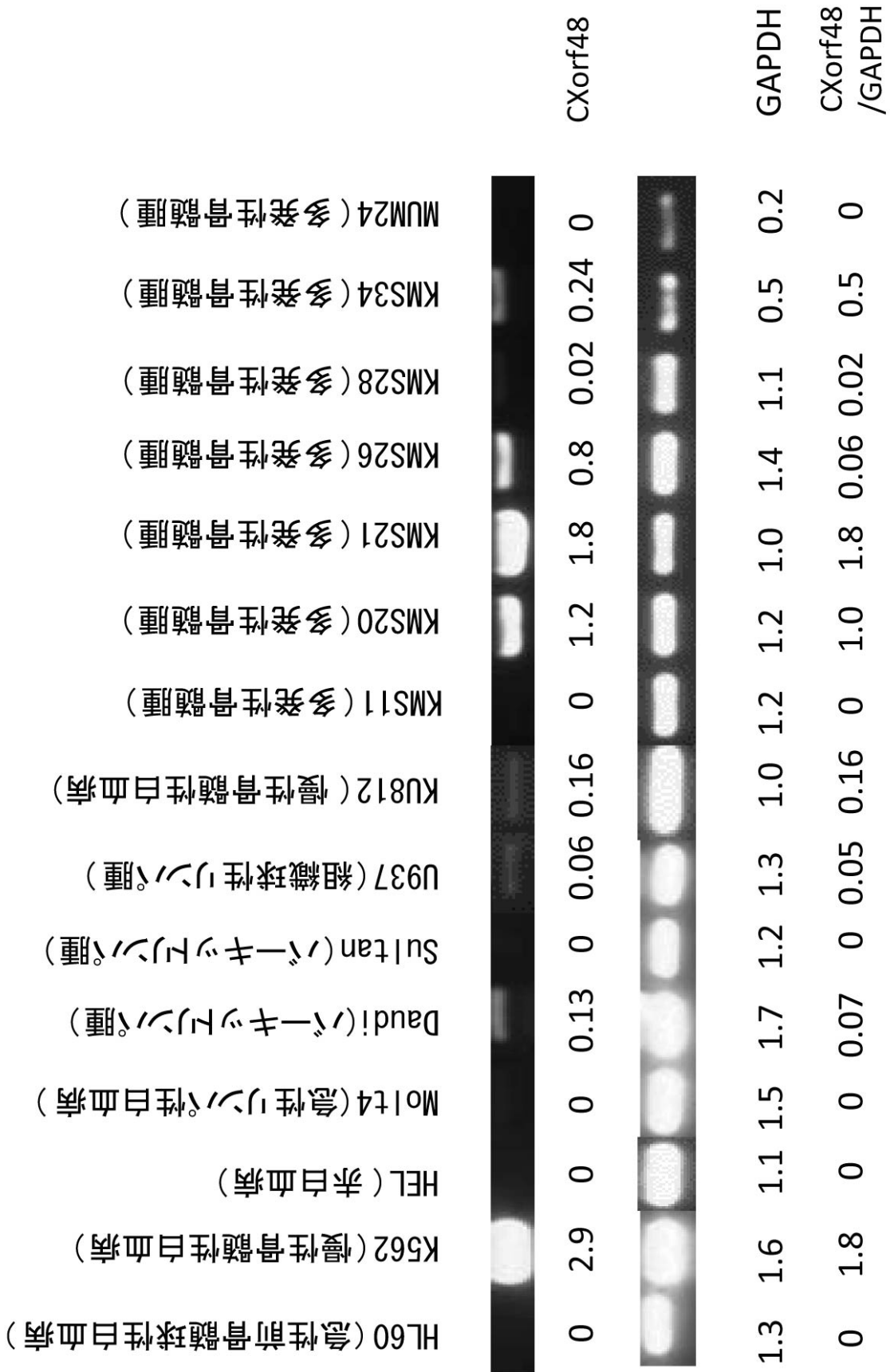
【図 1】



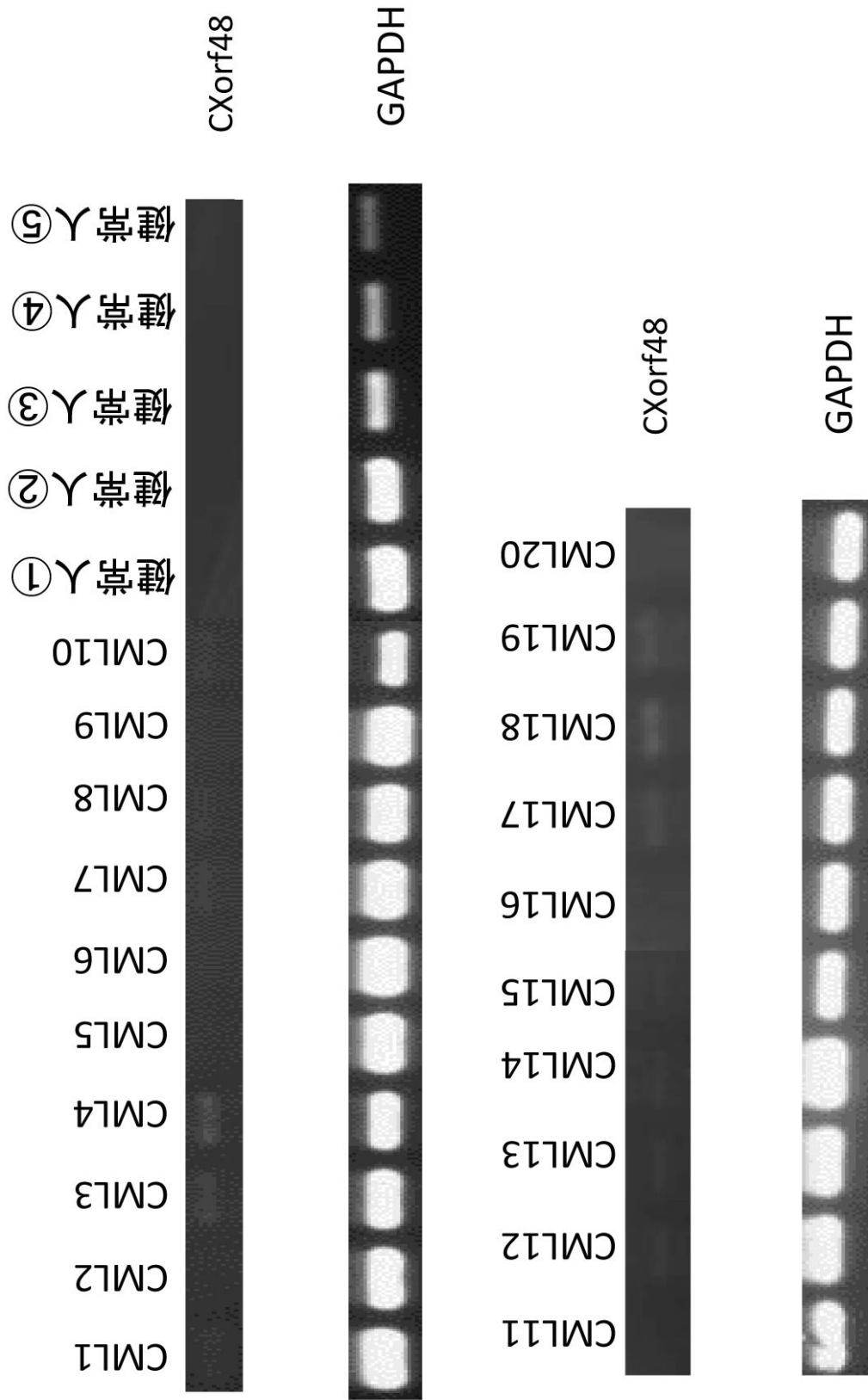
【 図 2 A 】



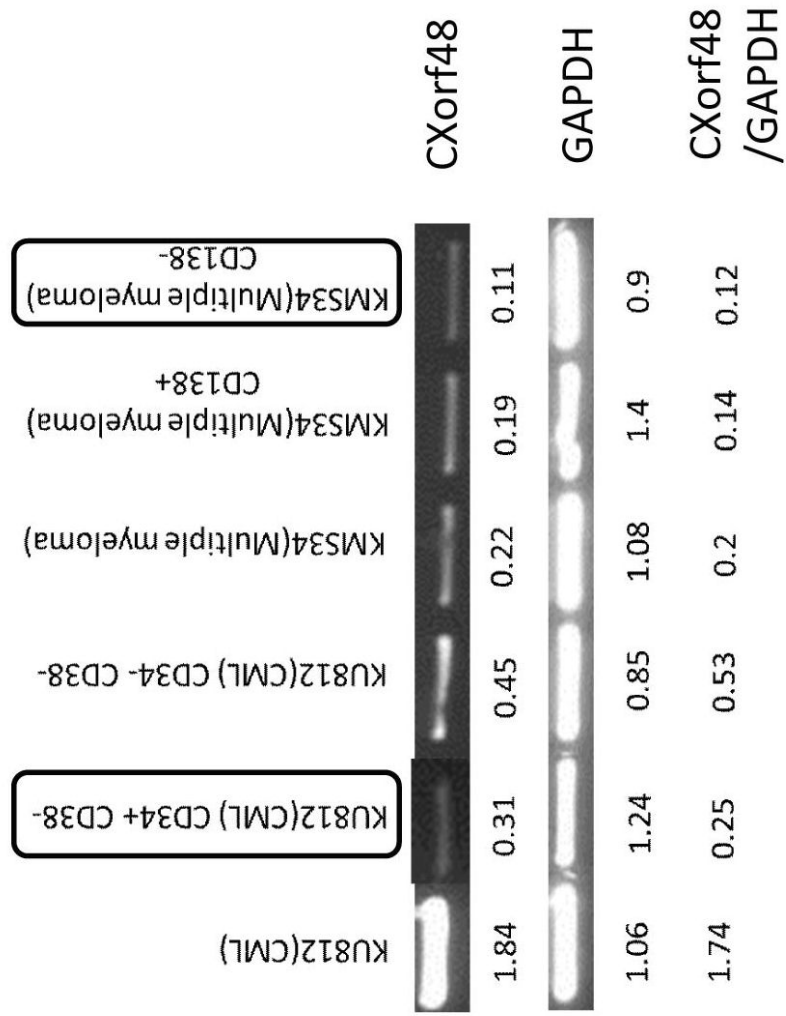
【 図 2 B 】



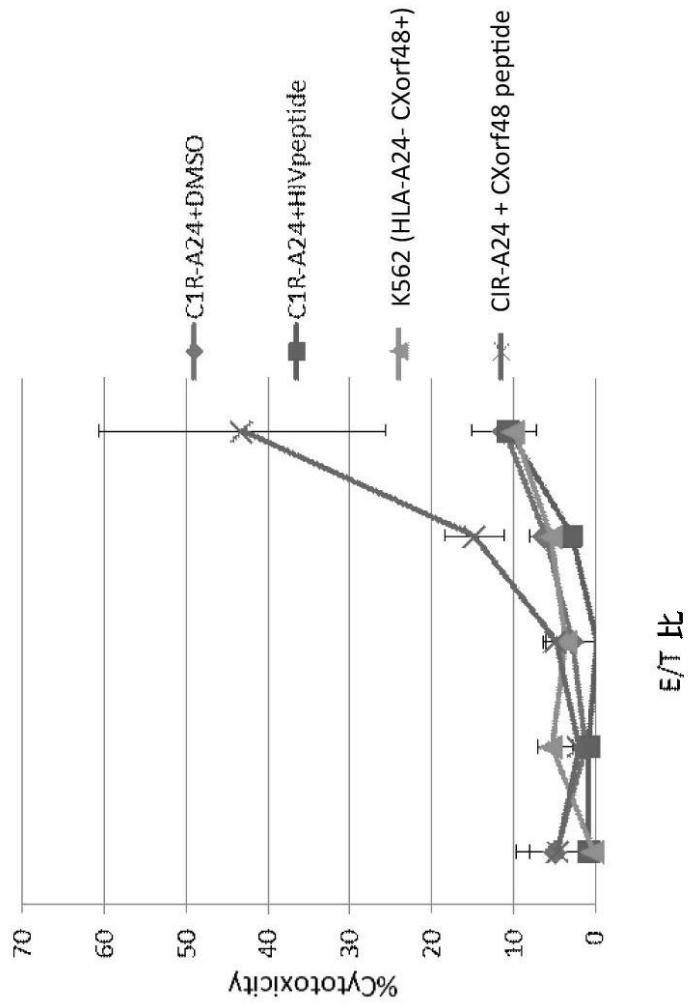
【 図 3 】



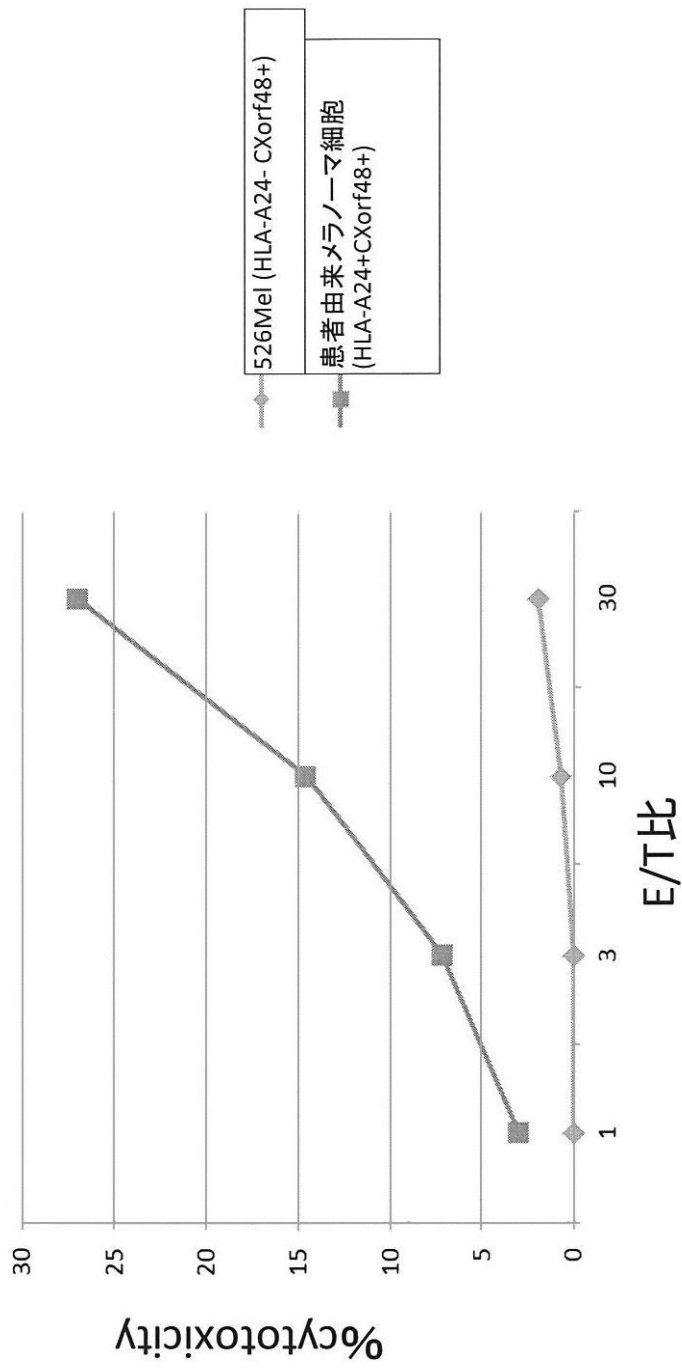
【 図 4 】



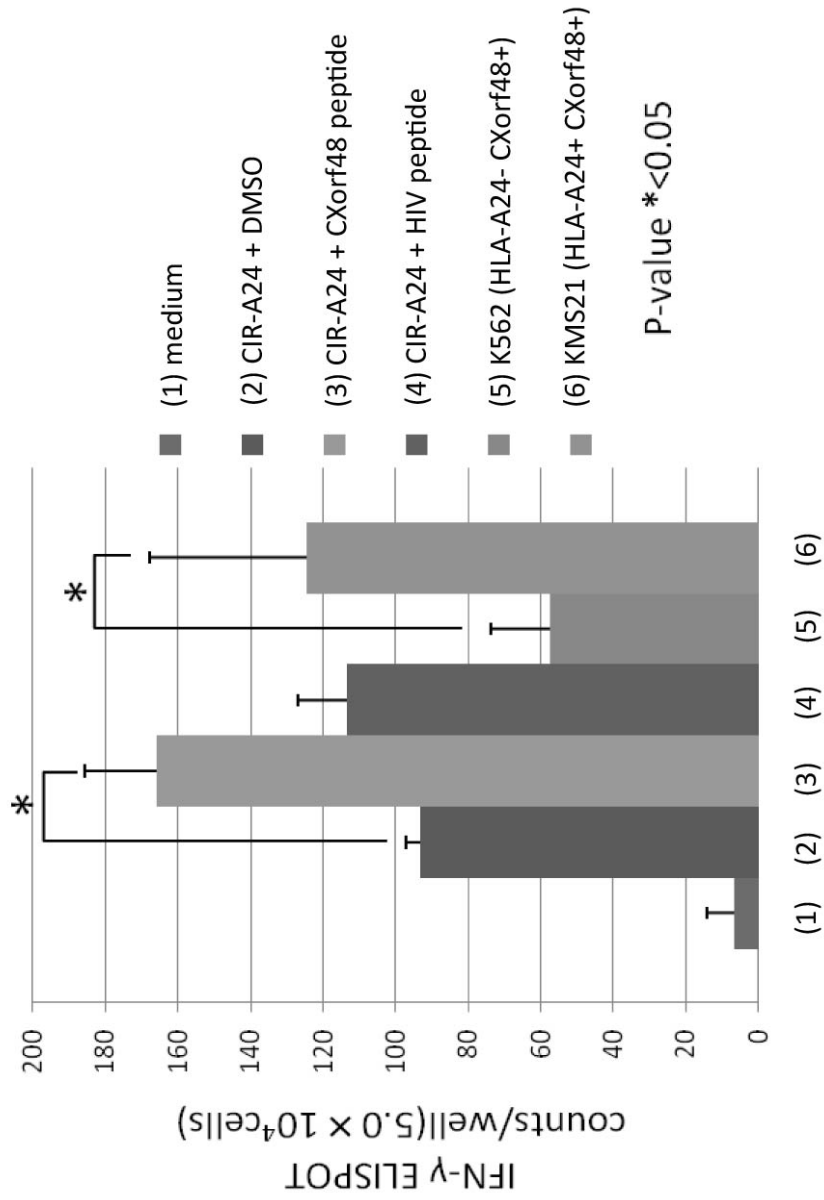
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2013256454000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	35/12 (2006.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/14 (2006.01)	A 6 1 K	35/14	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(72)発明者 河上 裕

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA36 CA20 HA12
 4B065 AA90X AA94X BA30 BC50 CA44 CA45
 4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA23 MA02 NA05 NA14 ZA891 ZB261
 ZB271
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 CA04 MA02 NA05 NA14 ZA89 ZB26
 ZB27
 4H045 AA11 BA09 BA15 CA41 DA86 EA29 EA31