

(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  
2011年10月6日(06.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2011/122611 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 7/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)  
A61P 1/04 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)  
A61P 1/18 (2006.01) C12N 5/0784 (2010.01)  
A61P 17/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/057777
- (22) 国際出願日: 2011年3月29日(29.03.2011)
- (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 2010-078625 2010年3月30日(30.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45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): 工藤 千恵 (KUDO, Chie) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人(ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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: CANCER VACCINE

(54) 発明の名称: がんワクチン

(57) Abstract: A cancer vaccine which can be used for the prevention and treatment of cancer. Disclosed are: a peptide which can efficiently induce an immune response to cancer and which comprises SEQ ID No. 1 (KMHIRSHTL) or SEQ ID No. 2 (RTF SRMSLL); an antigen presenting cell which displays the peptide on the cell surface thereof; a T cell which is induced by the antigen presenting cell; a cancer vaccine which contains the peptide, an expression vector which expresses said peptide, and an antigen presenting cell which displays the peptide or a T cell which is induced by the antigen presenting cell. Further disclosed is a cancer treatment and prevention method using the cancer vaccine.

(57) 要約: 本発明は、がんの予防および治療に用いるがんワクチンを提供することを目的とする。配列番号1 (KMHIRSHTL) または配列番号2 (RTF SRMSLL) からなるがん免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって誘導されたT細胞、および、これらのペプチドを発現する発現ベクター、これらのペプチドを提示した抗原提示細胞、またはその抗原提示細胞によって誘導されたT細胞を含有するがんワクチン、そして、そのがんワクチンを用いたがんの治療・予防方法を提供することができる。



WO 2011/122611 A1

## 明 細 書

発明の名称：がんワクチン

### 技術分野

[0001] 本発明は、がんの予防および治療に用いるがんワクチンに関する。

### 背景技術

[0002] 近年、がん免疫学において、免疫細胞によるがん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 または DC）は、細胞内で、がん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 または MHC；ヒトでは、human leukocyte antigen または HLA）と共に細胞表面に提示する。細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte または CTL）は、樹状細胞表面のHLA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がん細胞に対し細胞傷害を生じる（例えば、Arch. Surg.（1990）126：200－205参照）。

[0003] この機構を利用して、がんの治療方法としてがんワクチンが開発されてきた。例えば、がん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、がん患者に投与したり、その樹状細胞によって教育された細胞傷害性T細胞を投与したりすることにより、がん患者の体内でがん免疫を誘導させる。あるいは、がん特異的タンパク質をがん患者に投与し、患者の体内で、がん免疫機構の全過程を誘導させるのである（例えば、Science（1991）254：1643－1647、J. Exp. Med.（1996）183：1185－1192、J. Immunol.（1999）163：4994－5004、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1995）92：432－436、Science（1995）269：1281－1284、J. Exp. Med

（1997）186：785－793参照）。

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、がん免疫を効率的に誘導することのできるがん特異的タンパク質は、一部のがんにおいて、ほんの少数の例が知られているだけである。

[0005] そこで、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、およびこれらのペプチドや細胞を利用したがんワクチン、及びそれらを用いたがん患者の治療方法を提供することを目的としてなされた。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明に係るペプチドは、KMHIRSHTL（配列番号1）またはRTRFSRMSLL（配列番号2）の配列からなる。これらのペプチドを提示した抗原提示細胞、およびこの抗原提示細胞によって誘導され、snail抗原を発現するがん細胞を認識するT細胞も、本発明の技術範囲に属する。このT細胞は、細胞傷害性T細胞であることが好ましい。また、snail抗原を発現するがん細胞は、膵臓癌細胞、メラノーマ細胞、白血病細胞、または大腸癌細胞であることが好ましい。

[0007] 本発明に係るがんワクチンは、配列番号1または配列番号2からなるペプチドのいずれかまたは両方のペプチド、配列番号1または2のペプチドを発現する発現ベクター、配列番号1または2の配列からなるペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、あるいは、上記T細胞のうち、少なくとも1つを含有することを特徴とする。

[0008] また、本発明に係る、配列番号1または配列番号2からなるペプチドのいずれかまたは両方のペプチドを含むがんワクチンは、これらのペプチド以外のがん抗原ペプチドを含有していてもよい。

[0009] さらに、本発明に係るがんワクチンは、snailタンパク質を発現するがん細胞に対するがんワクチンであることが好ましい。

[0010] 本発明に係るがんの治療・予防方法は、ヒトおよびヒト以外の脊椎動物に対し、本発明に係るがんワクチンを用いることを特徴とする。

[0011] ここで、本明細書で「がん」という用語は、上皮細胞由来の癌、非上皮細胞由来の腫瘍、血液のがんなどの新生物（neoplasm）を意味するものであり、がんの由来は問わない。

[0012] また、本明細書では、アクセッション番号NM\_005985（配列番号3）の遺伝子をヒト*snail*遺伝子と称し、動物種の限定なく*snail*遺伝子と記載されている場合は、ヒト遺伝子に限らず、他の動物種ホモログやオースログも含むものとする。そして、アクセッション番号NP\_005976（配列番号4）のタンパク質をヒト*snail*タンパク質と称し、動物種の限定なく*snail*タンパク質と記載されている場合は、ヒトタンパク質に限らず、他の動物種ホモログやオースログも含むものとする。

[0013] ==クロスリファレンス==

本出願は、2010年3月30日付で出願した日本国特許出願2010-78625に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の一実施例において、健常人の正常組織における*snail*遺伝子の発現（A）、および、大腸癌患者の癌組織と同患者の正常組織における*snail*遺伝子の発現（B）を示す図である。

[図2]本発明の一実施例において、ヒト膵臓癌細胞株、ヒトメラノーマ細胞株、ヒト白血病細胞株、ヒト大腸癌細胞株における*snail*遺伝子の発現を示す図である。

[図3]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球を*snail* 1、2、3およびHERV-H env、NY-ESO-1の各ペプチドで刺激培養して得られたCTLを、0.1、1、あるいは10 μg/mlの各ペプチドの存在下でHLA-A24陽性抗原提示細胞と共培養したときの、CTLによるガンマ・インターフェロン産生量を測定した結果を

示すグラフである。

[図4]本発明の一実施例において、HLA-A24陽性健常人末梢血単核球をsnail 3あるいはNY-ESO-1で刺激培養して得られたCTLに、snailを発現する腫瘍細胞を接触させたときの腫瘍特異的傷害率を測定した結果を示すグラフである。

[図5]本発明の一実施例において、HLA-A02陽性健常人末梢血単核球をsnail 1、2、3およびHERV-Henv、NY-ESO-1の各ペプチドで刺激培養して得られたCTLを、10 $\mu$ g/mlの各ペプチドの存在下でHLA-A02陽性抗原提示細胞と共培養したときの、CTLによるガンマ・インターフェロン産生量を測定した結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

- [0015] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。ただし、本発明は下記実施例に限定されない。
- [0016] 実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); 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.等の標準的なプロトコール集に記載の方法、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ールを用いる。
- [0017] 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な実施例等は、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ならびに範囲内で、本明細書の記

載に基づき、様々な修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0018] ==がんワクチン==

s n a i lタンパク質の有するアミノ酸配列の一部である配列番号1または2からなるペプチドを抗原提示細胞である樹状細胞に添加したとき、HLAクラスI分子に結合することにより、細胞表面に提示され、細胞傷害性T細胞に認識されることで、s n a i lを認識する細胞傷害性T細胞を誘導できる。また、各ペプチドの刺激により樹立された細胞傷害性T細胞がs n a i lタンパク質を発現するがん細胞を効率よく認識することから、配列番号1および2の両方又はいずれか一つのペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、および、抗原提示細胞によって誘導され、s n a i l抗原を発現しているがん細胞を認識する細胞傷害性T細胞は、がんワクチンとして、がんの治療・予防に利用することができる。

[0019] ==がんワクチンの投与方法==

現在、がんワクチンとして、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傷害性T細胞をがん患者に投与方法が開発されている。s n a i lタンパク質の部分ペプチドを用いたがんワクチンの、治療または予防対象となるがんは、s n a i lタンパク質を発現しているがんであれば特に限定されず、神経腫、腎癌、肝癌、膵臓癌、肉腫、大腸癌、メラノーマ、肺癌、食道癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫など、固形がんでも血液のがんでも構わないが、膵臓癌、メラノーマ、白血病、大腸癌であることが好ましい。

[0020] 本発明に係るがんワクチンによるがんの治療・予防の対象は、このようながんに罹患している脊椎動物であれば制限されず、ヒトであってもヒト以外であってもよい。

[0021] なお、以下に説明するがんワクチンは、それぞれ単独で投与しても、共投与しても、あるいは、ここに記載した以外のがんワクチンと共投与してもよい。

[0022] [ペプチドを含有するがんワクチン]

本発明のがんワクチンは、配列番号 1 および 2 のペプチドの両方またはいずれか一つを含有してもよい。この場合、あらかじめ患者の H L A 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 H L A クラス I タイプが A 2 4 である場合に、配列番号 1 および 2 のペプチドの両方又はいずれか一つを投与することが好ましい。一方、H L A クラス I タイプが A 0 2 である場合には、配列番号 1 のペプチドを投与することが好ましい。このがんワクチンは、配列番号 1 および配列番号 2 のペプチド以外に、治療対象であるがん細胞の発現している他種のがん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 D N A を組み込んだ発現ベクターなどを用い、D N A ワクチンとして投与してもよい。

[0023] 投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されることはない。

[0024] ここで、配列番号 1 および 2 のペプチドの取得方法は特に制限されず、ペプチドを発現する細胞から単離・精製されたペプチドであっても、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、または周知の方法で化学合成したペプチドであってもよい。

[0025] [抗原提示細胞を含有するがんワクチン]

配列番号 1 または 2 からなるペプチドを提示した抗原提示細胞も、がんワクチン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、B 7 や 4 - 1 B B L 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。

[0026] 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A24またはA02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、このPBMCはCD14陽性またはCD11c陽性であることが好ましい。PBMCの単離方法は特に制限されず、単離したいPBMC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PBMC全体（PBMC分画）を単離でき、抗体結合磁気ビーズ分離法等によりCD14陽性PBMCやCD11c陽性PBMCを単離できる。単離したPBMCを、GM-CSFとIL-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HLAクラスIタイプがA24である場合には、配列番号1または2のペプチドを添加する。一方、HLAクラスIタイプがA02である場合には、配列番号1のペプチドを添加する。こうして得られた樹状細胞は、配列1または2のペプチドを提示した抗原提示細胞であり、これを、がん罹患する個体に投与する。

[0027] 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。

[0028] [T細胞を含有するがんワクチン]

また、配列番号1または2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細胞もまた、がんワクチンとして使用できる。このT細胞は、配列番号1または2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、CD8陽性細胞障害性T細胞（CTL）またはCD4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。このようにして樹立されたT細胞をがん罹患する個体



に投与してもよい。

[0029] 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、PBMC分画から単離されたCD8陽性細胞やCD4陽性細胞であってもよいが、CTLの誘導効率を考慮すると、PBMC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CD8陽性細胞やCD4陽性細胞であることが好ましい。例えば、PBMC分画の細胞を配列1または2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、PBMC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PBMCに含まれるCD8陽性T細胞を刺激し、CTLに分化誘導する。こうして、添加したペプチドを認識するCTLを得ることができる。この際、培養時間はCTLが得られる範囲で当業者が適宜設定できるが、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。

[0030] このようにして得られたCTLは、単離した後、そのままがんワクチンとして使用してもよいが、IL-2等のインターロイキン、抗原提示細胞、および配列1または2からなるペプチドの存在下でさらに培養した後ががんワクチンとして使用してもよい。この操作によって、CTLの細胞傷害性を高めることができる。

[0031] 投与部位は、内皮投与、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。

## 実施例

[0032] [実施例1] snail遺伝子の発現

本実施例では、snail遺伝子が正常組織にほとんど発現していないが、がん細胞株およびがん組織では発現が高いことを示す。

[0033] ==RT-PCRによる遺伝子発現解析法==

RNeasy kit (Qiagen 社)を用いて、健常人正常組織、大腸癌患者の

癌組織と肉眼的に判定して得られた大腸正常部位、および種々のヒト腫瘍細胞株（膵臓癌、メラノーマ、白血病、大腸癌）（図1、2参照）からRNAを抽出し、AMVで逆転写してcDNAを得た。次に、下記のプライマーを用いてiCycler（Biorad社）で遺伝子を増幅し、電気泳動にて遺伝子発現を検出した。なお、内部標準として、GAPDH遺伝子の発現を用いた。

S n a i l用プライマー：

Forward 5'-CAGATGAGGACAGTGGGAAAGG -3'（配列番号5）

Reverse 5'-ACTCTTGGTGCTTGTGGAGCAG -3'（配列番号6）

G A P D H用プライマー：

Forward 5'-GTCAACGGATTTGGTCGTATT -3'（配列番号7）

Reverse 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT -3'（配列番号8）

[0034] 図1Aに示すように、健常人正常組織においては、胎盤（Placenta）、精巣（Testis）メラニン細胞（Melanocyte）、および大腸（colon）で弱いs n a i l遺伝子の発現が検出できたが、脳（Brain）、心臓（Heart）、腎臓（Kidney）、脾臓（Spleen）、肝臓（Liver）、膵臓（Pancreas）、胸腺（Thymus）、骨格筋（Muscle）、骨髄（Bone marrow）、末梢血単核球（PBMC）では発現が検出できなかった。

[0035] また、進行度の異なる大腸癌患者から採取した大腸癌の癌組織（Tu）および、同患者の大腸の正常組織（目視で判断）（N）におけるs n a i l遺伝子発現を図1Bに示す。世界中で汎用されている「米国対がん合同委員会（AJCC）」で規定されているがん病期診断基準に基づいて分類された、ステージI、ステージII B、ステージIII Bの全ての進行度の大腸癌組織において、正常組織に比較して高いs n a i l遺伝子発現が検出された。

[0036] さらに、図2に示すように、膵臓癌、メラノーマ、白血病、および大腸癌の各細胞株においては、それぞれ正常膵臓組織、メラニン細胞、末梢血単核球、および大腸組織と比較してs n a i l遺伝子発現が低かった。

[0037] このように、s n a i l遺伝子はがん組織特異的に発現している。従って

、snai1 遺伝子の発現をがんの診断に利用できるのと同時に、snai1 をがん抗原として標的とした治療法は、各種臓器に対する副作用が少なく、広範ながん種の患者に対して適用できる。

[0038] [実施例2] HLA-A24陽性健常人PBMCを用いたCTLの誘導

本実施例では、snai1 1及びsnai1 3ペプチドを用いることにより、健常人のHLA-A24陽性PBMCから、各ペプチドを認識して活性化するCTLの誘導が可能であることを示す。

[0039] まず、HLA-A24陽性健常人(A、B)から、以下のようにPBMCを分離した。まず、採取した末梢血に1/10量の4%クエン酸ナトリウムを加え、Ficoll-Paque (Amersham 社)に重層して遠心した(1500rpm、20分、室温)。PBMCが含まれる中間層をPBMC分画として分離した。2.5×10<sup>7</sup>個のPBMCを、20mlの10%ウシ胎児血清(FCS)含有RPMI1640培地(Invitrogen社製)に浮遊させ、下記snai1 1~3の各ペプチド10μg/mlを加えて、37℃、5%CO<sub>2</sub>環境下で6日間刺激培養した。この刺激培養により、各抗原ペプチドに反応するCTLが分化する。Myltenyi社の抗体結合MACS磁気ビーズ法によって、そのCTLを分離した。

[0040] なお、HERV-H envペプチド(配列番号10)およびNY-ESO-1ペプチド(配列番号11)を、陽性対照として用いた。HERV-H envペプチドとNY-ESO-1ペプチドは、HLA-A24陽性抗原提示細胞に提示されてCD8陽性T細胞からCTLを誘導すること、および、そのCTLはHERV-H envペプチド、NY-ESO-1ペプチドを認識してガンマ・インターフェロンを産生することが既に知られている。

snai1 1: KMHIRSHTL (配列番号1)

snai1 2: KAFSRPWLL (配列番号9)

snai1 3: RTFSRMSLL (配列番号2)

HERV-H env: SYLHHTINL (配列番号10)

NY-ESO-1: LLMWITQCF (配列番号11)

- [0041] 刺激培養により得られたCTL  $1 \times 10^6$ 個を、IL-2 (100 U/ml、Peprtech 社) およびCTLの分化誘導に用いたのと同じのペプチド (0.1、1、または10  $\mu$ g/ml) の存在下で、10% FCS含有RPMI 1640培地中で抗原提示細胞と共培養することにより、CTLをペプチドで刺激した。抗原提示細胞は、CTLの分化誘導に用いたのと同じの健康人から得たPBMC (全細胞) を、10  $\mu$ g/mlのマイトマイシンCを添加した10 mlの10% FCS含有RPMI 1640培地で2時間浮遊培養 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) して不活性化し、RPMI 1640培地で洗浄することにより調製した。各ペプチドを提示した抗原提示細胞がHLA-A24拘束的にCTLを刺激すると、CTLはガンマ・インターフェロンを産生する。培養上清中に含まれるガンマ・インターフェロン値をヒトCytometric Bead Arrayキット (BD Biosciences 社) を用いて測定し、CTLが抗原提示細胞に提示されたペプチドを認識できるかどうか調べた。
- [0042] 図3に、0.1~10  $\mu$ g/mlの各濃度のペプチドを添加してCTLと抗原提示細胞とを共培養した場合の、健康人AおよびBのCTLによるガンマ・インターフェロン産生量を示す。なお、健康人Aのグラフにおいて最左点は、いずれのペプチドも添加しない無添加群であり、健康人Bのグラフにおいて最左点は、10  $\mu$ g/mlの陰性対照ペプチド (KSPWFTTL、マウスレトロウイルス抗原 p15e ペプチド、配列番号12) を添加した陰性対照群である。無添加群および陰性対照群では、ガンマ・インターフェロンは100~500 pg/ml程度しか産生されなかった。一方、snail 1ペプチド、snail 3ペプチド、陽性対照であるHERV-HenvペプチドおよびNY-ESO-1ペプチドで刺激した群では、ペプチド濃度の上昇に伴ってガンマ・インターフェロン産生量が有意に増加した ( $p < 0.01$ 、t検定)。
- [0043] 図3に示すように、ガンマ・インターフェロンの産生量は、ペプチド濃度が10  $\mu$ g/mlの場合に最高値を示した。健康人AまたはBにおけるガンマ・インターフェロン産生量は、snail 1ペプチドあるいはsnail

3ペプチドを10  $\mu$ g/ml添加した群では、無添加群あるいは陰性対照と比較して有意に高く ( $p < 0.01$ , t検定)、陽性対照であるHERV-HenvペプチドおよびNY-ESO-1ペプチドと比較して同程度、あるいは、より高いことが明らかである。

[0044] このように、健常人のHLA-A24陽性PMBCを用いてsnail1ペプチド(配列番号1)またはsnail3ペプチド(配列番号2)を細胞表面に提示した抗原提示細胞が得られる。また、この抗原提示細胞でCD8陽性T細胞を刺激することで、HLA-A24陽性抗原提示細胞に提示された各ペプチドを認識するCTLが分化誘導される。

[0045] [実施例3] snail3認識CTLの腫瘍細胞傷害活性

本実施例では、snail3ペプチドを用いてPMBCを刺激培養することにより得られたCTLが、HLA依存的にsnail抗原陽性の腫瘍細胞に対する傷害活性を有することを示す。

[0046] HLA-A24陽性健常人の血液から採取したPBMCをsnail3ペプチドで刺激培養して調製したCTL(実施例2参照、snail3認識CTL)と、標的細胞としてのヒト大腸癌細胞株COLO320(HLA-A24陽性、snail陽性、NY-ESO-1陽性)とを、CTL:COLO320=6.25:1、12.5:1、25:1、あるいは50:1の割合で混合し、10%FCS含有RPMI1640培養液中で6時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。Immunocyto Cytotoxicity Detection Kit(MBL社)を用いて殺傷された腫瘍細胞を検出し、添付プロトコールに準じて腫瘍特異的傷害率を算出した。なお、本実施例では、陽性対照として、snail3ペプチドの代わりにNY-ESO-1ペプチドを用いてPMBCの刺激培養を行った。

[0047] 図4に示すように、snail3認識CTLによる腫瘍特異的傷害率は、陽性対照であるNY-ESO-1認識CTLと同程度であった。また、その腫瘍特異的傷害率は、CTLの混合率が増えるに従い増加した。このように、snail3ペプチドを用いてPMBCを刺激培養することにより得られ

たCTLは、snailを発現する腫瘍細胞に対して傷害活性を示す（図4 A、B、白丸のグラフ参照）。

[0048] また、snail 3認識CTLによる、腫瘍細胞上のsnail抗原の認識はHLA依存的であることを示すため、抗HLA抗体（HLA中和抗体、BioLegend社、最終濃度10 $\mu$ g/ml）の存在下で、snail 3認識CTLとCOLO320細胞との共培養を行った。

[0049] 図4に示すように、抗HLA抗体非添加の場合（図4 A、B、白丸のグラフ参照）に比較し、抗HLA抗体を添加した群では、snail 3認識CTLによる腫瘍特異的傷害率が顕著に低下した（図4 A、B、黒丸のグラフ参照）。この結果は、snail 3認識CTLによる腫瘍特異的傷害は、HLA依存的に腫瘍細胞上のsnail抗原を認識していることを示している。

[0050] これらの結果は、健常人のHLA-A24陽性のPBMCをsnail 3ペプチドを用いて刺激することにより、snail抗原陽性の標的細胞に対する細胞傷害性を有するCTLが誘導されること、さらに、このCTLによる標的細胞のsnail抗原認識はHLA依存的であることを示している。

[0051] [実施例4] HLA-A02陽性健常人PBMCを用いたCTLの分化誘導

本実施例では、snail 1ペプチドを用いて分化誘導されたCTLは、HLA-A02依存的にsnail 1ペプチドを提示している細胞を認識することができることを示す。

[0052] まず、実施例2に記載の方法に従って、HLA-A02陽性健常人（D、E）から採血してPBMCを分離し、snail 1ペプチドを用いて一次刺激培養を行った。本実施例では、陽性対照としてHERV-H envペプチドを用い、陰性対照としてNY-ESO-1ペプチドを用いた。なお、HERV-H envペプチドは、HLA-A02陽性抗原提示細胞に提示されてCD8陽性T細胞からCTLを誘導し、そのCTLがHERV-H envペプチドを認識してガンマ・インターフェロンを産生することが既に知られている。また、NY-ESO-1ペプチドはHLA-A02陽性抗原提示細胞に結合せず、CTLの誘導が生じないことが知られている。このようにして

得られたCTLを、実施例2と同様に調製したHLA-A02陽性抗原提示細胞およびIL-2の存在下で、各ペプチド(10 $\mu$ g/ml)を含む10%FCS含有RPMI1640培地中で24時間刺激した。ペプチドを提示した抗原提示細胞がHLA-A02拘束的にCTLを刺激すると、CTLはガンマ・インターフェロンを産生する。培養上清に含まれるガンマ・インターフェロン値をヒトCytometric Bead Arrayキット(BD Biosciences社)を用いて測定し、CTLがペプチドを提示した抗原提示細胞を認識できるかどうか調べた。

[0053] 健常人D、EのPBMCから調製したCTLによるガンマ・インターフェロン産生量を図5に示す。健常人DおよびEにおいて、snail1ペプチドおよびHERV-Henvペプチド(陽性対照)で刺激した群では、陰性対照であるNY-ESO-1ペプチドで刺激した群よりも有意に高いガンマ・インターフェロン産生が見られた( $p < 0.01$ , t検定)。一方、snail2ペプチドあるいはsnail3ペプチドで刺激した群では、陰性対照よりもガンマ・インターフェロン産生量が低かった。

[0054] このように、snail1ペプチド(配列番号1)は、健常人のHLA-A02陽性PBMC由来の抗原提示細胞に提示され、CD8陽性T細胞から、ペプチドを認識するCTLを誘導する。さらに、このCTLは、HLA-A02陽性提示細胞上のsnail1ペプチドを認識することができる。

### 産業上の利用可能性

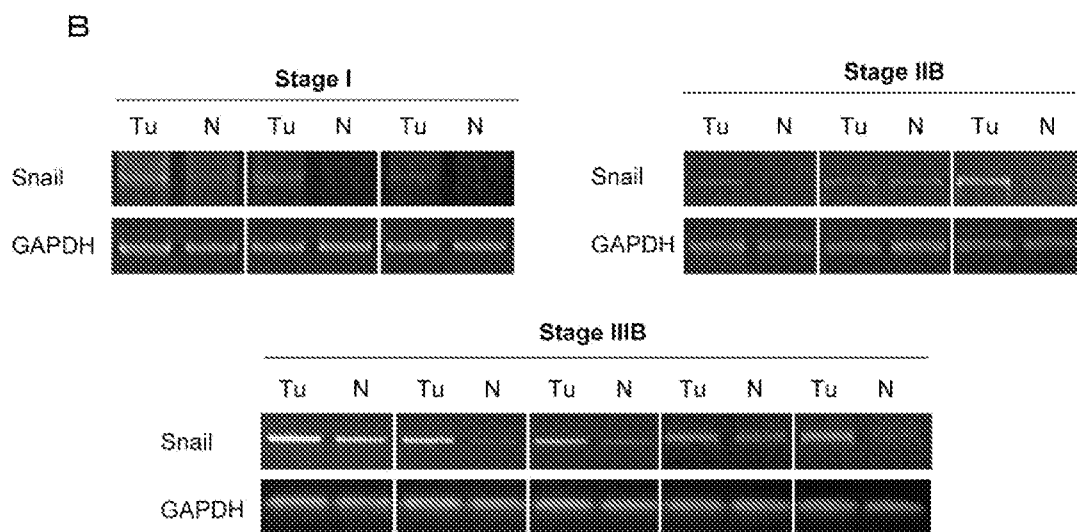
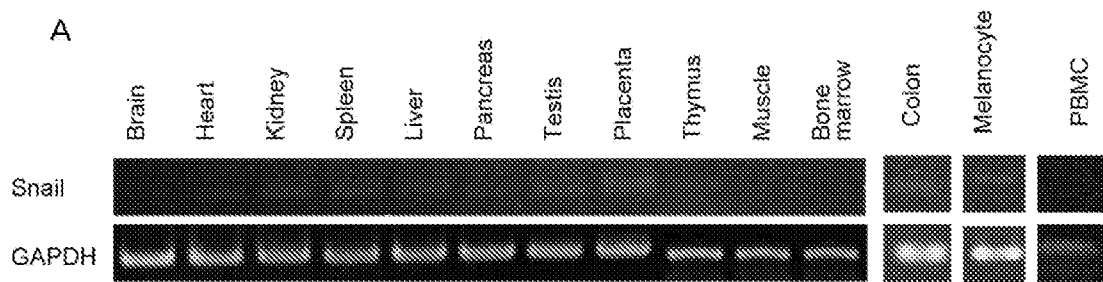
[0055] 本発明によって、がん免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって誘導されたT細胞、および、これらのペプチド、これらのペプチドを発現する発現ベクター、これらのペプチドを提示した抗原提示細胞、またはその抗原提示細胞によって誘導されたT細胞を含有するがんワクチン、そして、そのがんワクチンを用いたがんの治療・予防方法を提供することが可能になった。

## 請求の範囲

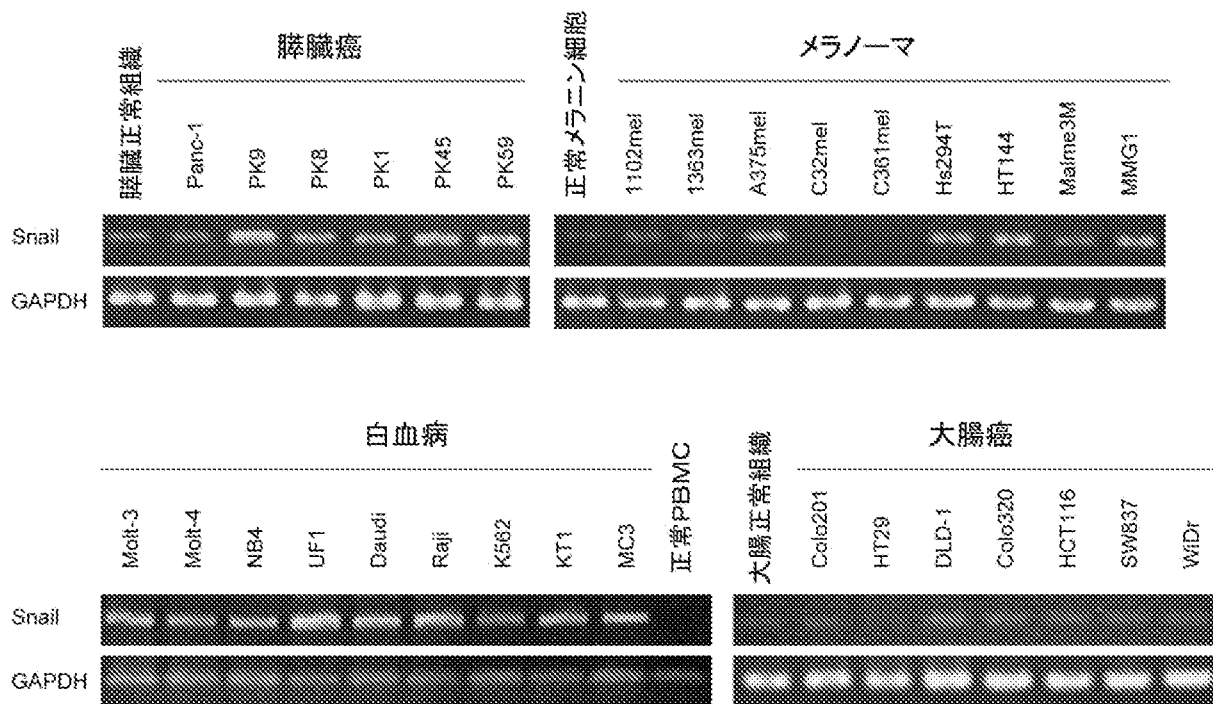
- [請求項1] 配列番号1 (K M H I R S H T L) または配列番号2 (R T F S R M S L L) の配列からなるペプチド。
- [請求項2] 配列番号1 または2 の配列からなるペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞。
- [請求項3] 請求項2 に記載の抗原提示細胞によって誘導され、*snail* 抗原を発現しているがん細胞を認識するT細胞。
- [請求項4] 細胞傷害性T細胞であることを特徴とする請求項3 に記載のT細胞。
- [請求項5] 前記がん細胞が、膵臓癌細胞、メラノーマ細胞、白血病細胞、あるいは大腸癌細胞であることを特徴とする、請求項3 または4 に記載のT細胞。
- [請求項6] 配列番号1、2 から選択される一つ以上のペプチド、前記ペプチドを発現する発現ベクター、請求項2 に記載の抗原提示細胞、または、請求項3～5 のいずれかに記載のT細胞を含有するがんワクチン。
- [請求項7] *Snail* タンパク質を発現するがん細胞に対するがんワクチンであることを特徴とする請求項6 に記載のがんワクチン。
- [請求項8] 前記がんが、膵臓癌、メラノーマ、白血病、または大腸癌であることを特徴とする、請求項6 または7 に記載のがんワクチン。
- [請求項9] ヒト以外の脊椎動物に対する、請求項8 に記載のがんワクチンを用いたがんの治療・予防方法。



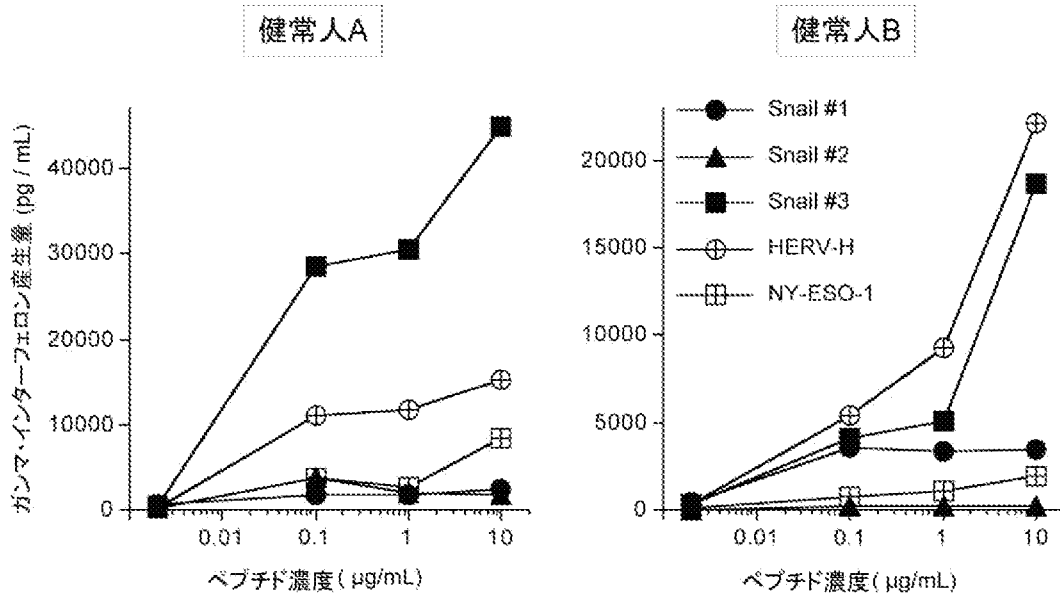
[ 1 ]



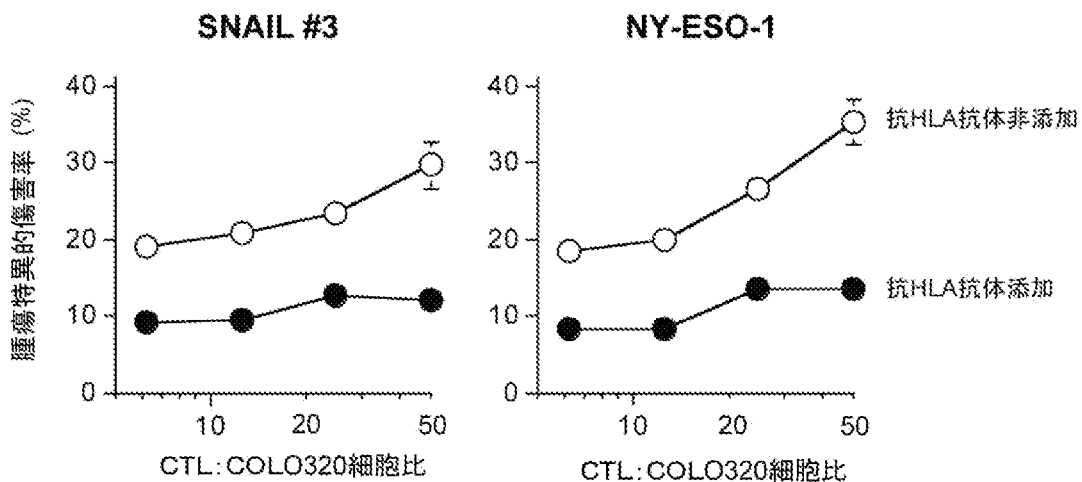
[図2]



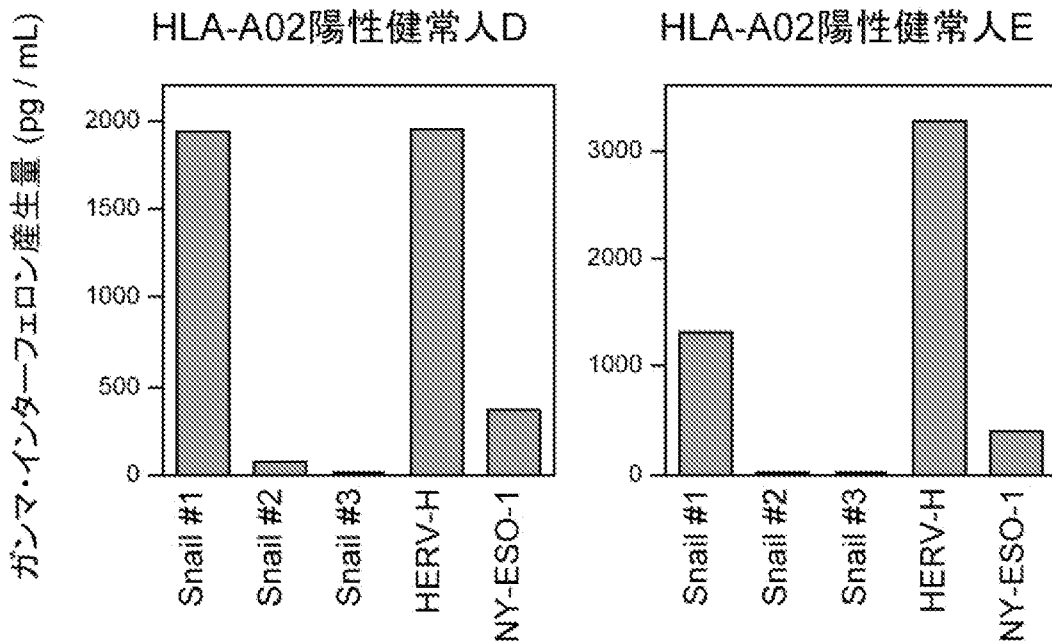
[図3]



[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/057777

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/18  
(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i,  
C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0784(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K7/06, A61K39/00, A61P1/04, A61P1/18, A61P17/00, A61P35/00, A61P35/02,  
C12N5/0783, C12N5/0784, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/028411 A1 (KEIO UNIVERSITY), 05 March 2009 (05.03.2009), entire text & US 2010/0291677 A & EP 2193805 A1	1-9
A	Yutaka KAWAKAMI et al., "Immunosuppression mechanisms by cancer cells and their control", 2009, Saishin Igaku, vol.64, no.11, pages 2428 to 2433, entire text	1-9
A	WO 2010/032696 A1 (KEIO UNIVERSITY), 25 March 2010 (25.03.2010), entire text (Family: none)	1-9

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  
25 April, 2011 (25.04.11)

Date of mailing of the international search report  
10 May, 2011 (10.05.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/057777

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-137772 A (Keio University), 07 June 2007 (07.06.2007), entire text (Family: none)	1-9
A	WO 2007/088372 A2 (THE UNIVERSITY OF MANCHESTER), 09 August 2007 (09.08.2007), sequence no.14, 15 & US 2009/0155222 A1 & EP 1979470 A	1-9
A	WO 2007/025231 A2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA), 01 March 2007 (01.03.2007), sequence no.3, 5 & US 2009/0232819 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0784(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/06, A61K39/00, A61P1/04, A61P1/18, A61P17/00, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/0783, C12N5/0784, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), PubMed

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	WO 2009/028411 A1 (KEIO UNIVERSITY) 2009.03.05, & US 2010/0291677 A & EP 2193805 A1 全文	1-9
A	河上裕 et al., 腫瘍免疫抑制機構とその克服, 2009, 最新医学, Vol. 64, No.11, p.2428-2433 全文	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

25.04.2011

国際調査報告の発送日

10.05.2011

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 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)	4B	3963
福澤 洋光		
電話番号 03-3581-1101 内線		3448

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	WO 2010/032696 A1 (KEIO UNIVERSITY) 2010.03.25, (ファミリーなし) 全文	1-9
A	JP 2007-137772 A (学校法人慶應義塾) 2007.06.07, (ファミリーなし) 全文	1-9
A	WO 2007/088372 A2 (THE UNIVERSITY OF MANCHESTER) 2007.08.09, & US 2009/0155222 A1 & EP 1979470 A 配列番号 1 4、配列番号 1 5	1-9
A	WO 2007/025231 A2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2007.03.01, & US 2009/0232819 A1 配列番号 3、配列番号 5	1-9