

(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2006-8638

(P2006-8638A)

(43) 公開日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/82 (2006.01)</b>	C07K 14/82 ZNA	4B024
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A61K 39/00 H	4B065
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4C084
<b>C12N 5/06 (2006.01)</b>	C12N 5/00 E	4C085
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-191478 (P2004-191478)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構
(22) 出願日	平成16年6月29日 (2004. 6. 29)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663 弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007 弁理士 平山 孝二
		(74) 代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 サバイピン由来のHLA-A24結合性癌抗原ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌の免疫療法に使用しうる癌ワクチン及び抗癌剤を提供する。

【解決手段】 以下に示されるアミノ酸配列：Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp を含み、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導しうるペプチドを提供する。また、特定のアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファンから選択されるアミノ酸残基に置換され、及び/又は上記配列に示されるアミノ酸配列のC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン及びメチオニンから選択されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導しうるペプチドを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含み、HLA-A24 抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性 T 細胞を誘導しうるペプチド。

## 【請求項 2】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 2 位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファンから選択されるアミノ酸残基に置換され、及び/又は配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の C 末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン及びメチオニンから選択されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、HLA-A24 抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性 T 細胞を誘導しうるペプチド。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のペプチドを含む癌ワクチン。

## 【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載のペプチドを含む抗癌剤。

## 【請求項 5】

癌細胞を標的とする細胞傷害性 T 細胞を誘導するための請求項 1 又は 2 に記載のペプチド使用。

## 【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載のペプチドにより誘導された細胞傷害性 T 細胞。

20

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の細胞傷害性 T 細胞を含む抗癌剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、癌細胞を標的とする細胞傷害性 T 細胞（以下、CTL という）を誘導することができるペプチドに関する。

また本発明は、前記ペプチドを含む癌ワクチン及び抗癌剤に関する。

更に本発明は、癌細胞を標的とする CTL を誘導するための前記ペプチドの使用、得られた CTL 及び前記 CTL を含む抗癌剤に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

近年における免疫学と分子生物学の進歩は、腫瘍免疫の進歩に多大の影響を与えている。ヒトでインフルエンザウイルス感染が起きた場合に、その感染に対して免疫が成立して感染症から離脱するという事象は以下の細胞性免疫により説明することができる。インフルエンザウイルスに感染した上皮細胞は、その細胞表面にある主要組織適合抗原複合体 HLA 分子上にウイルスゲノム由来の 9 ~ 10 のポリペプチドを提示する。この HLA - ウイルスペプチド複合体を提示する感染細胞は強烈なアロジェニック反応を惹起し、感染細胞は末梢血中に存在する CD8 陽性 CTL により特異的に認識され、積極的に排除される。この細胞性免疫のメカニズムは自己の細胞が腫瘍化して生じた癌細胞に対しても同様に働くと理解される。このことは、ベルギーの Thierry Boon らによる悪性黒色腫からの腫瘍抗原 MAGE 遺伝子の単離により証明された（例えば、非特許文献 1 参照）。

40

T 細胞が認識する癌抗原の同定方法としては、T 細胞を用いてヒト癌由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法が既に開発されており、この方法を用いて前記の MAGE 遺伝子が単離された。その後、悪性黒色腫を初めとした癌細胞表面上のクラス I 分子に提示されて T 細胞に認識される癌由来癌抗原ペプチドが複数同定され、これらのいくつかを用いた臨床治験が開始されており、既に一定の成果が得られている。例えば、癌患者の血清中に存在する抗体により認識される分子として食道癌より同定された NY-E50-1 分子は、その合成ペプチドが CTL の誘導能を有することが認識されている（例えば、非特許文献 2 及び 3 参照）。

50

## 【 0 0 0 3 】

【非特許文献 1】Van der Bruggenら、Science, 254, 1643-1647 (1991)

【非特許文献 2】Chen, Y.T.ら、Proc. Natl. Acad. USA, 94, 1914-1918 (1997)

【非特許文献 3】Jager, E.ら、J. Exp. Med., 187, 265-270(1998)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 4 】

しかし、臨床的に癌の大部分を占める大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌、膀胱癌等の上皮癌では癌抗原がほとんど同定されておらず、癌抗原を標的とした免疫療法は確立されていない。そこで本発明は、癌の免疫療法に使用しうる癌ワクチン及び抗癌剤を提供することを解決すべき課題とする。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 5 】

本発明者等は、免疫学的なヒト癌拒絶が主にCTL、特にCD8(+)CTLにより担われていることに着目した。CD8(+)CTLは癌細胞上の主要組織適合抗原複合体(ヒトではHLA)と当該HLA上に提示された癌抗原ペプチドとからなる複合体を認識して活性化する。そして、活性化されたCTLはその細胞表面上のT細胞抗原レセプターを介して癌細胞を認識し、これを攻撃する。したがって、癌抗原ペプチドが同定されれば、これを癌ワクチン及び抗癌剤として使用し、CTLを効率的に誘導して、癌を予防及び治療することができる。

20

サバイビン(Survivin)はアポトーシスインヒビター(IAP)ファミリーに属するタンパク質であり、強い抗アポトーシスを有する。サバイビンは肺癌、膀胱癌等の多くの癌で発現するが、正常組織での発現は胎児組織と成人胸腺、精巣等に限定されていることが報告されている(Ambrosini, G.ら、Nat. Med., 3, 917-921 (1997))。

本発明者等は、種々のサバイビン由来のペプチドについて癌抗原性、すなわちCTL誘導能について鋭意検討を重ね、CTLを誘導することができる特定のペプチドを見出している(特開2002-284797)。本発明者等がさらに検討を重ねたところ、サバイビン遺伝子によりコードされる142個からなるアミノ酸配列内にもHLA-A24結合モチーフが存在し、このなかの特定のペプチドがCTLを誘導することができることを見いだした。本発明はこの知見に基づいてなされたものである。

30

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導しうるペプチド；

(2) 配列番号1に示されるアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファンから選択されるアミノ酸残基に置換され、及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列のC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン及びメチオニンから選択されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導しうるペプチド；

40

(3) 前記(1)又は(2)のペプチドを含む癌ワクチン；

(4) 前記(1)又は(2)のペプチドを含む抗癌剤；

(5) 癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導するための前記(1)又は(2)のペプチド使用；

(6) 前記(1)又は(2)のペプチドにより誘導された細胞傷害性T細胞及び、

(7) 前記(6)の細胞傷害性T細胞を含む抗癌剤

である。

## 【発明の効果】

## 【 0 0 0 6 】

本発明のペプチドは、本発明のペプチドを提示していると考えられるHLA-A24陽性サバイビン陽性の癌細胞を傷害するCTLを誘導することができる。HLA-A24の

50

発現率は高く、欧米人では20～30%、日本人では50%以上が陽性である。したがって、本発明の癌抗原ペプチドは世界中で、さまざまな種類のサバイビン陽性の悪性腫瘍に対して有用な癌ワクチン及び抗癌剤として使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のペプチドは、以下の配列：

Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp (配列番号1)

で示されるアミノ酸配列を含み、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導しうるペプチドである。

前記本発明のペプチドは、HLA-A24抗原と結合して癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導する活性を保持する範囲内で、適宜改変されていてもよい。ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び/又は付加(ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む)を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数及び位置は、癌抗原ペプチドとしての活性を有する限り任意であるが、通常、HLA-A24抗原に結合するペプチドの長さが8～11アミノ酸であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

当該置換に係るアミノ酸残基の改変においては、HLA-A24抗原に対する結合モチーフ構造を有するペプチドにおける第2位及び/又はC末端のアミノ酸残基の置換が好ましい。

このような本発明の置換に係るペプチドの具体的な態様としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列の第2位及び/又はC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列からなるペプチドであって、HLA-A24抗原と結合してCTLにより認識されるペプチドが挙げられる。

前記置換においては、HLA-A24抗原の結合モチーフ構造を保持するアミノ酸残基への置換が好ましい。すなわち本発明の置換に係るペプチドの好ましい態様としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファンから選択されるアミノ酸残基に置換され、及び/又は配列番号1に示されるアミノ酸配列のC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン及びメチオニンから選択されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列からなり、HLA-A24抗原と結合してCTLにより認識されるペプチドが挙げられる。

【0008】

本発明のペプチドの同定は、以下の工程：

- (1) ヒト主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスIであるHLA-A24の結合モチーフに対応する配列を有するサバイビン由来ペプチドを提供する工程、
  - (2) 前記のペプチドを、HLA-A24を発現する抗原提示細胞に添加しHLA-A24により前記ペプチドを提示している抗原提示細胞を得る工程、
  - (3) 前記抗原提示細胞でT細胞を刺激してCTLを誘導する工程、及び、
  - (4) 誘導されたCTLの癌細胞傷害能を測定する工程、
- を含む方法により行うことができる。

本発明のペプチドはアミノ酸数が10と小さいので、一般的なアミノ酸の化学合成法、例えばFmoc法により合成することができる。市販のアミノ酸合成装置を使用して合成することもできる。また、本発明のペプチドはサバイビンに由来するので、癌患者の癌細胞から文献(Suzuki, K.ら, J. Immunol., 163, 2783-2791 (1999))に記載の方法に従いサバイビンを単離して、該当するペプチドを得ることもできる。

【0009】

本発明のペプチドを使用して癌細胞を標的とするCTLを誘導することができる。誘導されたCTLは癌細胞を認識して、これを攻撃する。したがって、本発明のペプチドは癌

10

20

30

40

50

ワクチン及び抗癌剤として使用することができる。

本発明の癌ワクチン及び抗癌剤を適用しうる癌は、本発明のペプチドをHLA-A24により提示している癌細胞からなる癌、例えば上皮癌である。上皮癌としては、肺癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、膵癌、前立腺癌、乳癌等が挙げられる。また、サバイピンを発現している非上皮癌、例えば腎細胞癌、肝細胞癌、悪性リンパ腫、骨肉腫、滑膜肉腫等が挙げられる。

本発明のペプチドを癌ワクチン及び抗癌剤として使用する場合、本発明のペプチドは、それ自身で又は補助剤と共に使用することができ、更に医薬的に許容しうる担体を適宜含有させることができる。

補助剤としては、免疫応答の強化を目的とするアジュバント、例えばフロイドの不完全（完全）アジュバント、アルミニウムアジュバント等が挙げられる。 10

医薬的に許容しうる担体としては、例えばPBS、蒸留水等の希釈剤、生理食塩水等が挙げられる。

本発明の癌ワクチン及び抗癌剤は、当該技術分野において周知の方法により、液剤、油剤、エマルジョン、ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤、錠剤、顆粒剤、固形剤等の形態にすることができる。

本発明の癌ワクチン及び抗癌剤は、その使用形態に応じて経口、非経口又は経皮投与することができる。例えば、静注投与、筋注投与、皮下投与、皮内投与等が挙げられる。本発明のペプチドの投与量は、通常、患者の体重、疾患の性質及び状態に依存して変化するが、成人に使用する場合、1日あたり最大で5～10mgである。例えば、成人癌患者に皮下注射により使用する場合、1週間あたり0.1～10mgであり、好ましくは100～1000μgである。 20

#### 【0010】

また、本発明のペプチドを、癌細胞を標的とするCTLを誘導するために使用することができる。誘導は、例えば文献（Nabeta, Y.ら, Jpn. J. Cancer Res, 91, 616-621 (2000)）に記載の方法に従い行うことができる。

具体的には以下の工程：

HLA-A24を発現している細胞を提供する工程、  
前記細胞に本発明のペプチドを添加して、HLA-A24上に提示させる工程、  
前記ペプチドをHLA-A24により提示している細胞でT細胞を刺激し、前記T細胞を癌細胞標的CTLへ誘導する工程、  
を含む方法を使用することができる。 30

HLA-A24を発現する細胞は癌患者から採取したものでよいが、非HLA-A24発現細胞に、HLA-A24をコードする遺伝子を導入して作成してもよい。

得られたCTLは癌細胞を標的とするので、これを抗癌剤として使用することができる。この場合、前記の本発明のペプチドを含む抗癌剤と同様に、適宜医薬的に許容しうる担体を含み、かつ種々の形態をとることができる。

本発明のCTLを含む抗癌剤は、本発明のペプチドを含む癌ワクチン及び抗癌剤と同様に非経口投与することができる。

本発明のCTLの投与量は、通常、患者の体重、疾患の性質及び状態に依存して変化するが、成人に使用する場合、1日あたり最大で $5 \times 10^9$ 個である。例えば、成人癌患者に静脈内注射により使用する場合、1週間あたり $1 \times 10^7$ 個～ $5 \times 10^9$ 個であり、好ましくは $1 \times 10^8$ 個～ $1 \times 10^9$ 個である。 40

次に、実施例により本発明の効果を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

##### 【0011】

実施例1 本発明のサバイピン由来癌抗原ペプチドの製造

以下のアミノ酸配列：

Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp (配列番号1)

を有するペプチドを合成した。ペプチドは、9 - フルオレニルメチルオキジカルボニル ( F m o c ) 戦略に基づいて固相同時多重ペプチド合成機 P S S M - 8 ( 島津製作所 ) を使用して合成し、次いで C 1 8 逆相高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) ( Millipore ) により精製した。ペプチドの純度及び同一性は、それぞれ分析用 H P L C 及び質量分析により測定した。ペプチドを、ジメチルスルホキシド中に濃度 1 . 5 m g / m l で溶解し、 - 8 0 で保存した。

#### 【 0 0 1 2 】

実施例 2 本発明のサバイピン由来癌抗原ペプチドの H L A - A 2 4 結合性

T 2 - A 2 4 細胞はヒトリンパ芽球様細胞 T 2 細胞に H L A - A 2 4 0 2 遺伝子を導入して発現させた細胞株である。この細胞の細胞表面には低レベルの H L A - A 2 4 分子が発現しており、H L A - A 2 4 特異的単クローン抗体と Flow cytometer を用いて検出することができる。発現レベルは、mean fluorescence intensity ( M F I ) として定量化される。この細胞に試験管内で合成ペプチドを添加すると、添加したペプチドが H L A - A 2 4 分子と結合する場合、結合親和性と相関して細胞表面 H L A - A 2 4 発現レベルが増加する。この実験系を用いて、実施例 1 で製造した本発明のサバイピン由来癌抗原ペプチド ( サバイピン C ペプチド ) の H L A - A 2 4 結合親和性を解析した。

T 2 - A 2 4 細胞にサバイピン C ペプチドまたは H L A - A 2 4 と結合することが既に証明されている 3 種類のペプチド ( サイトメガロウイルス C M V - p p 6 5 由来ペプチド、エイズウイルス H I V - e n v 由来ペプチド、サバイピン 2 B ペプチド ) 、 H L A - A 2 4 とは結合しないペプチド ( V S V ウイルス由来 V S V 8 ペプチド ) の各ペプチドを終濃度 1 0 0 μ g / m l となるように添加した。その直後の細胞表面 H L A - A 2 4 発現レベルを単クローン抗 H L A - A 2 4 抗体と F I T C 標識抗マウス I g G 抗体とで染色し、Flow cytometer ( FACScan, Becton Dickinson ) で解析した。発現レベルは M F I 値によって定量化し、

$$( M F I \text{ shift} ) = ( \text{ペプチド添加後の M F I 値} ) - ( \text{ペプチド添加前の M F I 値} )$$

として、発現変化の程度を定量化した。

図 1 に示すように、本発明のサバイピン C ペプチドは、H I V - e n v ペプチドにほぼ匹敵する程度の結合親和性を有している。

#### 【 0 0 1 3 】

実施例 3 本発明のサバイピン由来癌抗原ペプチドを用いた C T L の in vitro 誘導

ヒトの末梢血とフィコール・コンレイ密度勾配中で遠心分離して末梢血単核球 ( P B M C ) を集め、次いで接着細胞と非接着細胞とに分離した。接着細胞を A I M - V ( Gibco Co. ) 中、1 0 0 n g / m l の G M - C S F ( Novartis Pharma ceuticals ) 及び 1 0 I U / m l の I L - 4 ( 小野薬品 ) と共にインキュベートした。この細胞を抗原提示細胞 ( A P C ) として使用した。非接着細胞を A I M - V 中、3 0 ~ 1 0 0 I U / m l の組換え I L - 2 ( 味の素 ) と共にインキュベートした。5 ~ 6 日目に、本発明のペプチド ( 終濃度 3 0 μ g / m l ) を A P C に添加し、放射線を照射した後、この A P C と自家非接着細胞から分離した C D 8 陽性細胞とを、I L - 2 ( 武田薬品工業 ) を終濃度 5 0 ~ 1 0 0 I U / m l で添加した A I M - V 培養液中で共培養した。1 4 日目以後は T 細胞マイトジェンである P H A で刺激した自家 P H A プラスト ( P H A 刺激 T 細胞 ) に本発明のペプチド ( 終濃度 3 0 μ g / m l ) を添加し、放射線を照射した細胞を A P C として使い、7 日毎に C D 8 陽性細胞を刺激した。刺激毎に、培養に 5 0 ~ 1 0 0 I U / m l の I L - 2 を含む新鮮培地を追加した。2 8 日目 ( 4 回刺激後 ) の C T L を以下の活性試験に使用した。

#### 【 0 0 1 4 】

実施例 4 本発明のペプチドを用いて誘導された C T L の細胞傷害性

##### ( 1 ) 試験方法

C T L の細胞傷害能を  $^{51}C r$  細胞傷害試験により評価した。C T L の標的細胞を 1 0 0 μ C i のクロム酸ナトリウム (  $^{51}C r$  ) を用いて 3 7 で 2 時間標識し、洗浄し、再懸濁した。試験ペプチドが提示された標識標的細胞は、前記の標的細胞 (  $5 \times 1 0^5$  細胞 / m l ) を  $^{51}C r$  で標識し、3 0 μ g / m l の試験ペプチドと室温で 2 時間インキュベートす

10

20

30

40

50

ることにより得た。エフェクター細胞（CTL）をV字底マイクロタイタープレートCostar3894（Corning Incorporated）の各ウェルに入れ、ここに前記標識標的細胞を濃度  $5 \times 10^3$  細胞/ウェルで添加し、容量 0.2 ml とした。6時間のインキュベート後、0.1 ml の上清を集め、自動化ガンマカウンター（LKB Wallac）により  $^{51}\text{Cr}$  の放出を測定した。測定は3重に行い標準偏差を計算した。特異的細胞傷害能の百分率は、特異的  $^{51}\text{Cr}$  放出の百分率を下記の式：

$$[(\text{実験値}) - (\text{自発的放出値}) / (\text{最大放出値}) - (\text{自発的放出値})] \times 100$$

を用いて計算することにより決定した。自発的放出値は、標的細胞をエフェクター細胞の非存在下で単独インキュベートしたときの放出値より得た。最大放出値は界面活性剤である 10% Nonidet-P40（ナカライケミカルCo.）と共にインキュベートしたときの最大放出量により得た。

#### 【0015】

##### (2) CTL のペプチド特異的細胞傷害性

1名のHLA-A24陽性の乳癌患者Aの末梢血を用いて、実施例3と同様の方法により本発明のペプチドを用いてCTLを誘導した。

CTLの標的細胞として、HLA-A2402遺伝子を持っていないT2細胞株（ATCCより入手）にHLA-A2402遺伝子を導入し、HLA-A24分子を細胞表面に発現させたT2-A24細胞と、同じくHLA-A2402遺伝子を持っていないC1R細胞株（ATCCより入手）にHLA-A3101遺伝子を導入したC1R-A31細胞、HLAを全く発現していないK562細胞を用いた。前記(1)の試験法にしたがい、各標的細胞に試験ペプチドを添加して標的細胞上にペプチドを提示させ、これを試験に使用した。試験ペプチドには、本発明のサバイピンCペプチドの他に、HLA-A24によって提示される滑膜肉腫抗原SYT-SSXペプチドを用いた。

CTLの $^{51}\text{Cr}$ 細胞傷害試験の結果を図2-Aに示す。縦軸は標的細胞の融解の百分率を、横軸は図に示した各標的細胞におけるE/T比（エフェクター細胞（CTL）/標的細胞）を示す。本発明のペプチド（サバイピンC）により誘導されたCTLは、HLA-A24を発現しているT2-A24細胞にサバイピンCペプチドを添加した標的細胞（A24+SUWwild）のみを傷害し、ペプチドを何も添加しない細胞（T2A24, C1RA31）、SYT-SSXペプチドを添加した細胞（T2A24+SYT）、HLA-A24を発現していないC1R-A31細胞にサバイピンCペプチドを添加した細胞（A31+SUWwild）、HLAを発現していないK562細胞はほとんど傷害しなかった。

これらの結果は、本発明のペプチドにより誘導されたCTLが、HLA-A24陽性かつサバイピンCペプチドを細胞表面に有する細胞を特異的に認識し、高い細胞傷害活性を発揮することを示している。

#### 【0016】

##### (3) 本発明のペプチドで誘導されたCTLの癌細胞傷害性

前記(2)の乳癌患者Aの末梢血から本発明のペプチドによって誘導されたCTLについて、さまざまなヒト癌細胞を標的として細胞傷害性を試験した。標的細胞として用いた4種類の癌細胞株はいずれもサバイピン蛋白を発現している癌細胞株であるが、HMC2細胞とHMC1細胞は細胞表面にHLA-A24を発現している癌細胞株で、MCF7細胞とK562細胞はHLA-A24陰性の癌細胞株である。 $^{51}\text{Cr}$ 細胞傷害試験の結果を図2-Bに示す。試験は1種の標的細胞につき、3つのE/T比（10、3及び1）で行った。本発明のペプチドで誘導されたCTLは、HLA-A24陽性の癌細胞株だけを傷害した。

次に前記(2)とは別のHLA-A24陽性の口腔癌患者Bの末梢血を用いて、実施例3と同様の方法により本発明のペプチドを用いてCTLを誘導した。このCTLについて、HLA-A24陽性の癌細胞とHLA-A24陰性の癌細胞とを標的として細胞傷害性を試験した。標的細胞として用いた3種類の癌細胞株はいずれもサバイピン蛋白を発現している癌細胞株である。OSC20細胞はHLA-A24遺伝子を持っていない口腔扁平

10

20

30

40

50

上皮癌細胞株で、OSC20A24細胞はOSC20細胞にHLA-A2402遺伝子を導入して発現させた細胞株である。<sup>51</sup>Cr細胞傷害試験の結果を図3に示す。試験は1種の標的細胞につき、3つのE/T比(30、10及び3)の条件で行った。本発明のペプチドで誘導されたCTLは、HLA-A24陽性の癌細胞株だけを傷害した。

これらの実験より、本発明のペプチドにより誘導されたCTLが、細胞外からサバイピンCペプチドを添加した細胞だけでなく、HLA-A24陽性かつ細胞内でサバイピンを発現している癌細胞を特異的に認識し、高い細胞傷害性を発揮することが示された。

【図面の簡単な説明】

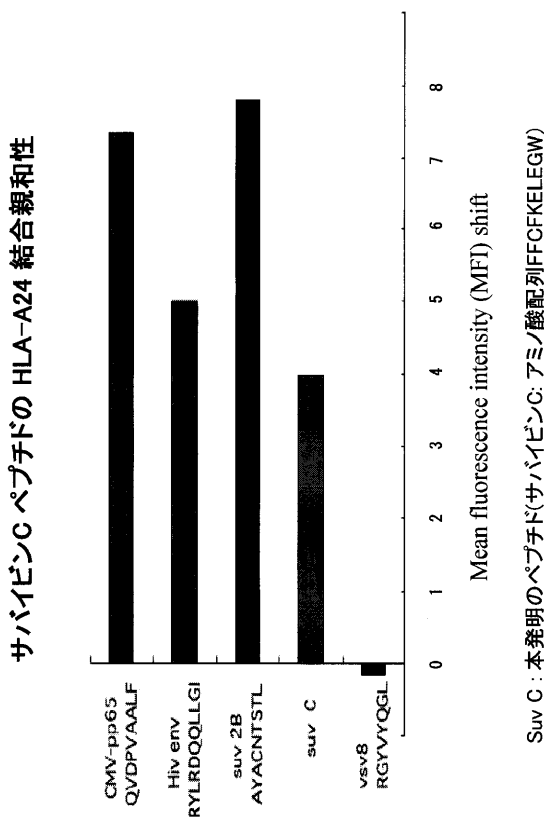
【0017】

【図1】本発明のサバイピンCペプチドとHLA-A24分子との結合性を試験した結果を表すグラフである。

【図2】本発明のサバイピンCペプチドを用いて誘導した細胞傷害性T細胞(CTL)についての標的細胞傷害試験の結果を示すグラフである。図Aと図Bとは、同じ癌患者から誘導されたCTLを用いて試験された。

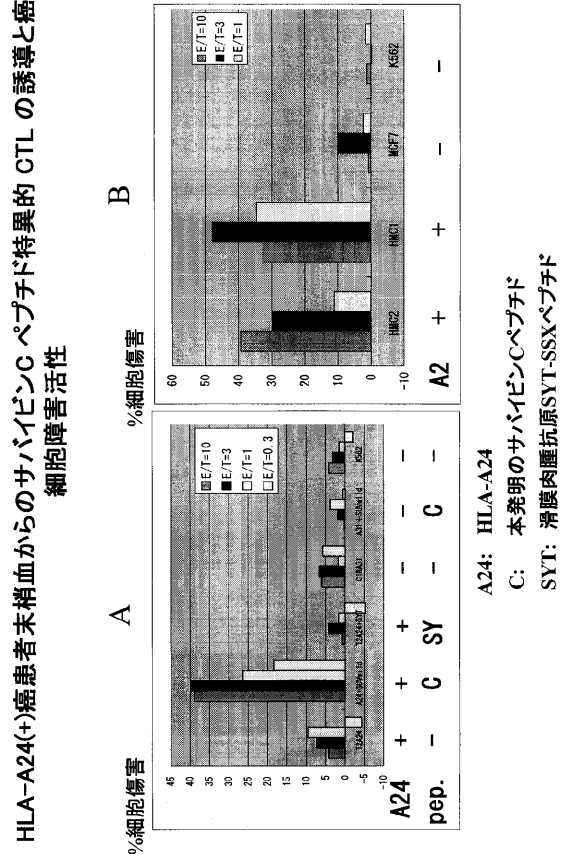
【図3】本発明のサバイピンCペプチドを用いて図2とは別の癌患者末梢血から誘導した細胞傷害性T細胞(CTL)についての標的細胞傷害試験の結果を示すグラフである。

【図1】



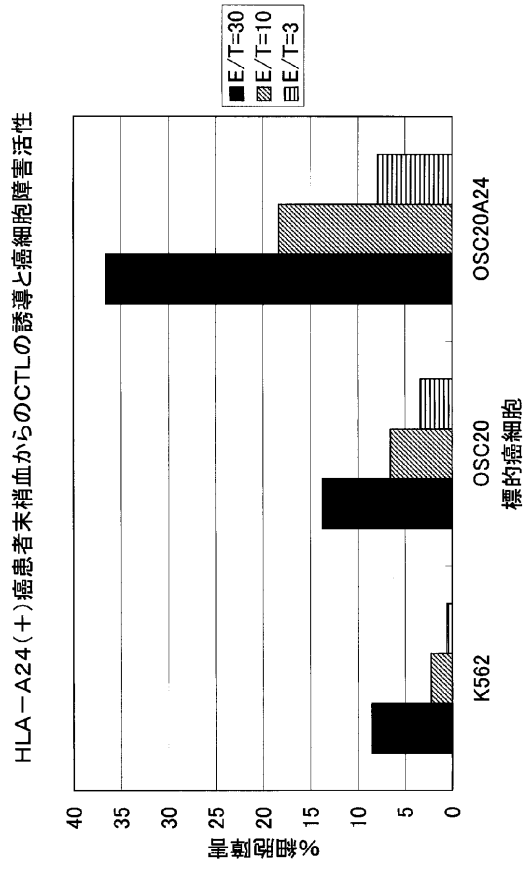
Suv C: 本発明のペプチド(サバイピンC: アミノ酸配列FFCFKLELGW)

【図2】





【 図 3 】



【 配列表 】

[2006008638000001.app](#)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 佐藤 昇志

北海道札幌市豊平区福住2条9丁目13-3

(72)発明者 鳥越 俊彦

北海道札幌市南区澄川5条11丁目9-13

(72)発明者 廣橋 良彦

北海道札幌市中央区南3条西20丁目3-12-305

(72)発明者 井手之上 里美

北海道札幌市中央区南8条西16丁目 マンション黒田202

(72)発明者 小林 淳一

北海道札幌市北区あいの里1条6丁目3-1304

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA36 CA02 DA03 HA11 HA17

4B065 AA94X AB01 BB19 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 BA01 BA17 BA23 CA59 DC50 ZB092 ZB262

4C085 AA03 BB01 DD51

4H045 AA10 AA30 BA15 CA41 DA86 EA28 EA51 FA34 FA58