

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5920742号
(P5920742)

(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月22日(2016.4.22)

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C O 7 K 7/06 Z N A
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C O 7 K 7/08
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02

請求項の数 7 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-533063 (P2014-533063)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月29日(2013.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/073084
 (87) 国際公開番号 W02014/034754
 (87) 国際公開日 平成26年3月6日(2014.3.6)
 審査請求日 平成27年11月26日(2015.11.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-191050 (P2012-191050)
 (32) 優先日 平成24年8月31日(2012.8.31)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 511036314
 ジーン・ステム株式会社
 大阪府大阪市北区梅田一丁目1番3-26
 7号
 (73) 特許権者 502280429
 公益財団法人大阪市都市型産業振興センタ
 ー
 大阪府大阪市大正区泉尾六丁目2番29号
 (74) 代理人 100158366
 弁理士 井戸 篤史
 (72) 発明者 田中 秀和
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野
 義製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P S F 1 由来ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号3～9のいずれかに示されるアミノ酸配列からなり、CTL誘導能をもつペプチド。

【請求項2】

配列番号3～9のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項3】

請求項1から2のいずれかに記載のペプチドをコードする核酸分子。

【請求項4】

請求項3記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項5】

請求項1から2のいずれかに記載のペプチド、請求項3記載の核酸分子、または請求項4記載のベクターを含む、医薬組成物。

【請求項6】

癌を治療するための請求項5記載の医薬組成物。

【請求項7】

癌が転移性、化学療法もしくは放射線療法に耐性、または再発性である請求項6記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

【 0 0 0 1 】

本発明は、HLA-A*02陽性癌患者に対する特異的免疫療法に有用なPSF1由来ペプチドに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

PSF1はSLD5、PSF2、PSF3を構成タンパクとする4量体(GINS complex)を形成し、MCM(mini-chromosome maintenance complex)やcdc45と結合してDNA複製の開始や伸長に関係していることが知られている(非特許文献1-2)。

癌との関係については、ヒト乳癌細胞株においてPSF1の発現増加が認められており、PSF1を発現低下させると有意な増殖抑制がみられる。さらに、ヒト乳癌患者由来の癌組織内においてPSF1発現レベルが低い患者群では、高い患者群に比して有意に全生存率が高いことが示されている(非特許文献3)。

また、悪性度の高いメラノーマの他、肺癌や食道癌の癌組織内での発現も報告されている(非特許文献4-5、特許文献1)。

一方、PSF1と癌幹細胞との関連性についても報告されている(非特許文献5)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 3 】

【特許文献1】国際公開公報 W02003/42661号

【非特許文献】

【 0 0 0 4 】

【非特許文献1】Structure of the human GINS complex and its assembly and functional interface in replication initiation. Kamada K. et al. Nat Struct Mol Biol 2007;14:388-396

【非特許文献2】The human GINS complex associates with cdc45 and MCM and is essential for DNA replication. Aparicio T. et al. Nucleic Acid Res 2009; 37:2087-2095

【非特許文献3】Up-regulation of psf1 promotes the growth of breast cancer cells. Nakahara I. et al. Genes to Cells 2010;15:1025-1024.

【非特許文献4】Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. Ryu B. et al. ProsOne 2007;7:e594

【非特許文献5】PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. Nagahama Y. et al Cancer Res. 2010; 70: 1215-24

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

本発明は、癌患者に対する特異的免疫療法に有用なペプチドを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、ヒト乳癌細胞株においてHLA-A*02分子の細胞外領域に結合するPSF1に由来するペプチドを同定した。さらにこれらのペプチドが、ペプチド特異的CTL(細胞傷害性T細胞)を誘導することを確認したことにより、本発明を完成した。

【 0 0 0 7 】

即ち本発明は、

(1) 配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドの一部であり、CTL誘導能をもつペプチド、

(2) 配列番号1の70~110位に含まれる連続した8~14残基の配列を有し、CTL誘導能をも

10

20

30

40

50

つペプチド、

- (3) 配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含み、CTL誘導能をもつペプチド、
- (4) 配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- (5) 配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、および/または挿入されている、CTL誘導能をもつペプチド、
- (6) 前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチドをコードする核酸分子、
- (7) 前記(6)記載の核酸分子を含むベクター、
- (8) 前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチド、前記(6)記載の核酸分子、または前記(7)記載のベクターを含む、医薬組成物、
- (9) 癌を治療するための前記(8)記載の医薬組成物、
- (10) 癌が転移性、化学療法もしくは放射線療法に耐性、または再発性である前記(9)記載の医薬組成物、
- (11) 配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1個、または2個のアミノ酸が置換されている、CTL誘導能をもつペプチドであって、前記置換が、配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列におけるN末端から2番目のアミノ酸のイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンへの置換と、配列番号3~5のいずれかに示されるアミノ酸配列におけるC末端アミノ酸のイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンへの置換から選択されるペプチド、
- (12) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むペプチドにおいて、配列番号3に示されるアミノ酸配列におけるN末端側にアラニンが付加したものの、もしくは配列番号3に示されるアミノ酸配列におけるC末端側にアルギニンが付加したものであるペプチド、
- (13) 配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むペプチドにおいて、配列番号5に示されるアミノ酸配列におけるN末端側にアルギニンが付加したものの、もしくは配列番号5に示されるアミノ酸配列におけるC末端側にロイシンが付加したものであるペプチド、
- (14) 生体から採取された抗原提示細胞を前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチドと接触させることにより、抗原提示細胞を誘導する方法、
- (15) HLA抗原と、前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチドの間で形成された複合体を含む、抗原提示細胞、
- (16) 生体から採取されたT細胞を前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチドと接触させることにより、細胞傷害性T細胞を誘導する方法、
- (17) 生体から採取されたT細胞を前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチドと接触させることにより誘導される、細胞傷害性T細胞、
- (18) 前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチド、前記(6)記載の核酸分子、または前記(7)記載のベクターを患者に投与することにより、患者の癌を治療する方法、
- (19) 癌を治療薬または予防薬としての使用のための前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチド、前記(6)記載の核酸分子、または前記(7)記載のベクター、および
- (20) 癌を治療または予防するための医薬の製造のための前記(1)から(5)のいずれかに記載のペプチド、前記(6)記載の核酸分子、または前記(7)記載のベクターの使用

【発明の効果】

【0008】

本発明により、HLA-A*02陽性癌患者において癌細胞を傷害しうるCTLを誘導することができるPSF1由来ペプチドが提供された。本発明のPSF1由来ペプチドは、HLA-A*02陽性癌患者に対する特異的免疫療法を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】テトラマー染色によるペプチド特異的CTLの検出結果を示す。培養して得たCTL細胞をPE標識tetramerとAPC-H7標識抗CD8抗体で2重染色し、FACS Ariaで蛍光強度を測定し

10

20

30

40

50

た。両標識体によって染色された細胞分画を線で囲んだ位置に検出した（各パネルの上側）。2種類(0209-01 H2、0209-02 D2)のCTLラインにおいて陽性細胞が確認できたことから、YLYDRLLRI（配列番号3）を認識するCTLが得られたことが明らかになった。

【図2 - 1】ペプチド特異的CTLラインによる細胞傷害活性を示す。ペプチドYLYDRLLRI（配列番号3）に特異的なCTL(E; effector cell)とT2細胞(T; target cell)にペプチドをパルス(peptide+)または非パルス(peptide-)した細胞をそれぞれE:T比で1:1、3:1、10:1の細胞比で共培養した。翌日にtarget cellの生存率を求めたところ、ペプチドをパルスしたtarget cellにおいて非パルスしたtarget cellよりも生存率の低下がみられた。また、共培養した細胞比率に応じて生存率が低下したことからペプチド特異的なCTLによる細胞傷害活性が示された。

10

【図2 - 2】ペプチド特異的CTLラインによる細胞傷害活性を示す。ペプチドRALRWEYGSVLPN（配列番号4）に特異的なCTL(E; effector cell)とT2細胞(T; target cell)にペプチドをパルス(peptide+)または非パルス(peptide-)した細胞をそれぞれE:T比で1:1、3:1、10:1の細胞比で共培養した。翌日にtarget cellの生存率を求めたところ、ペプチドをパルスしたtarget cellにおいて非パルスしたtarget cellよりも生存率の低下がみられた。また、共培養した細胞比率に応じて生存率が低下したことからペプチド特異的なCTLによる細胞傷害活性が示された。

【図2 - 3】ペプチド特異的CTLラインによる細胞傷害活性を示す。ペプチドALRWEYGSVL（配列番号8）に特異的なCTL(E; effector cell)とT2細胞(T; target cell)にペプチドをパルス(peptide+)または非パルス(peptide-)した細胞をそれぞれE:T比で1:1、3:1、10:1の細胞比で共培養した。翌日にtarget cellの生存率を求めたところ、ペプチドをパルスしたtarget cellにおいて非パルスしたtarget cellよりも生存率の低下がみられた。また、共培養した細胞比率に応じて生存率が低下したことからペプチド特異的なCTLによる細胞傷害活性が示された。

20

【図3】PSF1のアミノ酸配列（配列番号1）におけるYLYDRLLRI（配列番号3）、RALRWEYGSVLPN（配列番号4）およびALRWEYGSV（配列番号5）の位置を示す。3つのペプチドは、いずれもPSF1の79位～100位に属している。

【発明を実施するための形態】

【0010】

ペプチドおよびポリペプチド

30

本発明は、PSF1由来のCTL誘導能をもつペプチド（以下、本発明のペプチド）を提供する。

【0011】

本発明において「PSF1由来ペプチド」とは、PSF1のアミノ酸配列の一部からなるペプチド断片を意味する。PSF1のアミノ酸配列（配列番号1）および核酸配列（配列番号2）は、GeneBankにおいて開示されている（それぞれNP_066545およびNM_021067）。

【0012】

本発明のペプチドは、HLA-A*02抗原と高い結合親和性をもつペプチドとして見出された。このことは、そのペプチドがHLA-A*02と複合体を形成し細胞表面に提示されうることを意味する。

40

【0013】

本発明において「CTL誘導能をもつ」とは、そのペプチドが特異的なCTLに認識される、言い換えればペプチド特異的CTLを誘導する能力を有することを意味する。上記のようなHLA抗原に対する高い結合親和性をもつペプチドは、癌ワクチンとして大いに効果的であることが期待されるが、医薬有効成分として選択される候補ペプチドは、実際のCTL誘導能の存在について調べる必要がある。ペプチド特異的なCTLを誘導する能力を有するか否かは、例えば、ペプチドで刺激した末梢血単核細胞（PBMC）が対応ペプチドをパルスした抗原提示細胞に反応してインターフェロン-（IFN-）のようなサイトカインを産生するか否かをELISA法等で測定して調べることができる。また、誘導されたCTLの細胞傷害活性は、⁵¹Cr放出試験等により確認することができる。CTLによる認識性を考慮すると、本発明

50

のペプチドのアミノ酸残基数は8～14個の範囲内であることが好ましく、より好ましくは8～11個、特に好ましくは9または10個である。

【0014】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を調べた結果として、HLA抗原に対する高い結合親和性をもつペプチドは必ずしも高い誘導能をもつとは限らないことが発見された。しかしながら、YLYDRLLRI (配列番号3)、RALRWEYGSVLPN (配列番号4)およびALRWEYGSV (配列番号5)により示されたアミノ酸配列を含むペプチドから選択されたペプチドは、特に高いCTL誘導能および細胞傷害活性を示した。これらの3種類のペプチドは、いずれもPSF1の79～100位の領域に属していることがわかる(図3参照)。YLYDRLLRI (配列番号3)についてはこのアミノ酸配列を含むペプチドであるAYLYDRLLRI (配列番号6)やYLYDRLLRIR (配列番号7)についても高いCTL誘導能を示した。また、ALRWEYGSV (配列番号5)についても、このアミノ酸配列を含むペプチドであるALRWEYGSVL (配列番号8)やRALRWEYGSV (配列番号9)についても高いCTL誘導能を示した。

10

【0015】

本発明は、またPSF1由来ペプチドの誘導体(以下、本発明の誘導体)も提供する。本発明において「PSF1由来ペプチドの誘導体」とは、PSF1由来ペプチドのアミノ酸配列において1または2個のアミノ酸の置換、欠失および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、かつCTL誘導能をもつペプチドを意味する。誘導体が所望の性質を有するか否かは、前述の方法により調べることができる。

【0016】

アミノ酸の置換は、ペプチドの性質を変化させない観点から、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間で行うことが好ましい。アミノ酸の欠失および挿入は、誘導体のアミノ酸残基数が8～14個となるように行うことが好ましい。

20

【0017】

一般にHLAに結合するペプチドは、HLAの型に依存する規則性あるアミノ酸配列を有する。その規則性あるアミノ酸配列は、結合モチーフと呼ばれる。HLA-A*02に対する結合モチーフとは、N末端から第2番目のアミノ酸がイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンであり、C末端アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンである配列をいう(Current Pharmaceutical Design 2010, 16, 3149-3157)。HLA-A*02結合モチーフを有するペプチドのHLA-A*02に対する結合は、Bioinformatics and Molecular Analysis Section (NIH, Bethesda, MD)等のコンピューター解析により決定することができる(Parker KC, et al., J. Immunol., 152: 163-175, 1994)。

30

本発明において、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入は、HLA結合モチーフ上許容されるものが好ましい。すなわち、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入は、誘導体のアミノ酸配列のN末端から第2番目のアミノ酸がイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンであり、C末端アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはスレオニンとなるように行うことが好ましい。

【0018】

本発明のペプチドおよび誘導体を構成するアミノ酸は、天然のアミノ酸またはアミノ酸アナログであってよく、アミノ酸アナログとしては、アミノ酸のN-アシル化物、O-アシル化物、エステル化物、酸アミド化物、アルキル化物等が挙げられる。本発明のペプチドおよび誘導体は、機能を著しく損なわない限りにおいてその構成アミノ酸またはカルボキシル基などが修飾されていてもよい。修飾は、N末端や遊離のアミノ基にホルミル基、アセチル基、t-ブトキシカルボニル基等を結合するものや、C末端や遊離のカルボキシル基にメチル基、エチル基、t-ブチル基、ベンジル基等を結合するものが挙げられる。他に、例えば、ペプチドの血清半減期を増加させるために用いることができるD-アミノ酸や他のアミノ酸の模倣体の導入も含まれる。

40

【0019】

50

本発明のペプチドおよび誘導体は、通常のペプチド合成により製造することができる。例えば、そのようなペプチドは、組換えDNA技術または化学合成のいずれかを用いて、合成的に調整することができる。そのような方法として、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol2, Academic Press Inc., New York, 1976に記載されている方法が挙げられる。

【0020】

核酸・ベクター

本発明は、さらに本発明のペプチドまたは誘導体をコードする核酸分子および前記核酸分子を含むベクターを提供する。本発明の核酸分子を含むベクターは、抗原提示細胞に導入されると本発明のペプチドまたは誘導体を発現し、それらをHLAとの複合体として細胞表面に提示させる。この抗原提示細胞は、ペプチド特異的に癌細胞を傷害するCTLを効率的に増殖させることができる。

10

【0021】

本発明の核酸分子を組み込むベクターとしては、各種プラスミドおよびウィルスベクター、例えばアデノウィルス、アデノ関連ウィルス、レトロウィルス、ワクシニアウィルス等が挙げられる (Liu M, Acres B, Balloul JM, Bizouarne N, Paul S, Slos P, Squiban P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. Proc Natl Acad Sci USA 101 Suppl, 14567-71, 2004)。ベクターの調製方法は当業界にて周知である (Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory)。

【0022】

本発明のベクターは、患者体内の抗原提示細胞において本発明のペプチドまたは誘導体を発現させるため患者に投与することができる。あるいは、患者体外において例えば患者由来の樹状細胞に本発明のベクターを導入し、本発明のペプチドまたは誘導体を発現させた細胞を患者に戻しても良い。これら方法は当業界において周知である (Hrouda D, Dalgleish AG. Gene therapy for prostate cancer. Gene Ther 3: 845-52, 1996)。

20

【0023】

本発明のベクターを患者に投与する場合、投与量は疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により変化するが、例えばDNA量として、0.1 μg ~ 100mg、好ましくは1 μg ~ 50mgである。投与方法には、静脈注射、皮下投与、皮内投与等が挙げられる。

【0024】

医薬組成物

本発明は、さらに本発明のペプチドまたは誘導体、前記ペプチドまたは誘導体をコードする核酸分子、または前記核酸分子を含むベクターを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、癌を治療または予防において有用である。特に、PSF1は癌幹細胞の再生に関連していることから、化学療法や放射線療法に治療抵抗性、再発性、または転移性の癌の治療または予防においても有用である。本発明の医薬組成物は、1種類のペプチドまたは誘導体を含むものであってもよく、2種類以上のペプチドおよび/または誘導体を組み合わせて含んでも良い。癌患者のCTLは相異なる癌抗原ペプチドを認識する細胞の集合なので、複数種類のペプチドおよび/または誘導体を組み合わせて使用するとさらに効果的である。本発明のペプチド以外の癌抗原ペプチドと組み合わせても良い。

30

40

【0025】

本発明の医薬組成物は、ペプチドまたは誘導体に加えて、医薬上許容される担体などを含むことができる。担体としては、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が使用できる。本発明の医薬組成物は、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤などであってもよい。また、免疫応答が効果的に成立するように、従来からワクチン投与に用いられることが知られているアジュバントとともに投与することもできる。適切なアジュバントは、文献 (Johnson AG. (1994) Clin. Microbiol. Rev., 7:277-89) に記載されている。例示的なアジュバントは、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、およびミョウバンを含むが、これに限定されない。投与方法は、例えば皮内投与または皮下投与などである。

50

【0026】

本発明の医薬組成物は、癌ワクチンとして使用可能である。投与量は、疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常医薬組成物中のペプチドまたは誘導体の量は、0.0001 mg ~ 1000 mg、好ましくは0.001 mg ~ 100 mg、より好ましくは0.01 mg ~ 10 mg、より一層好ましくは0.1 mg ~ 5 mgまたは0.5 mg ~ 30 mgである。これを毎日、毎週、または数日、数週または数ヶ月に1回、1~3年間継続して投与することが好ましい。

【0027】

CTLの誘導方法

本発明はさらにCTLの誘導方法を提供する。本発明においては、CTLはHLA-A*02陽性癌細胞に対して細胞傷害性を有する。「細胞傷害性」とは、癌細胞上の癌抗原ペプチドとHLAとの複合体を認識し、その細胞を傷害する能力を有することを意味する。CTLは、例えば、HLA-A*02陽性癌患者から採取されたPBMCを、in vitroで本発明のペプチドまたは誘導体の存在下において培養することにより得られる。本発明のCTL誘導方法は、PBMCを採取した患者の体内に誘導したCTLを戻して癌細胞を傷害する養子免疫療法に有用である。

10

【0028】

抗原提示細胞の誘導方法

本発明はさらに抗原提示細胞の誘導方法を提供する。本発明の方法は、HLA-A*02陽性癌細胞を傷害するCTLを誘導しうる抗原提示細胞を誘導するものである。本発明の方法は、例えば、HLA-A*02陽性癌である患者由来の抗原提示能を有する細胞を本発明のペプチドまたは誘導体とともに培養し、そのペプチドまたは誘導体をHLA-A*02に結合および提示させることにより行う。あるいはそのようなペプチドを発現可能なベクターを、HLA-A*02陽性である癌患者由来の抗原提示能を有する細胞に導入し発現させてもよい。抗原提示能を有する細胞は、例えば樹状細胞である。患者由来の樹状細胞は、例えば、患者より採取したPBMCから培養プレート接着細胞を分離し、その細胞をIL-4およびGM-CSFの存在下で約1週間培養することで得られる。本発明の方法により誘導された抗原提示細胞は、その細胞表面に提示するペプチドまたは誘導体とHLA-A*02との複合体を特異的に認識するCTLを誘導することができる。癌患者に投与された場合患者体内で癌反応性CTLの誘導を促進することができる。

20

【0029】

その他

本発明はさらに、本発明のペプチド、核酸、またはベクターを患者に投与することを含む、癌を治療または予防する方法を提供する。また本発明は、癌を治療または予防するために使用する本発明のペプチド、核酸、またはベクターを提供する。

30

【実施例】

【0030】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はいかなる意味においてもこれらの実施例により制限されるものではない。

【0031】

<実施例1> Direct epitope discovery

40

癌ワクチンによって誘導される細胞傷害性T細胞(CTL)は、癌細胞表面に発現するHLA-A*02分子とペプチドの複合体を認識して攻撃すると考えられている。よって、ペプチドの由来となるタンパク質は癌抗原となる可能性がある。そこで、癌細胞のHLA-A*02分子に結合するPSF1配列ペプチドを探索し、PSF1が癌抗原となる可能性を調べた。

【0032】

(方法)

Direct epitope discovery法は既報 (Hawkins et al. J. Proteome. Res: 7, 1445-1457, 2008) を参考に条件設定して実施した。

【0033】

可溶性HLAベクターの構築と安定発現株の作製

50

ヒトHLA-A*02配列の細胞外タンパク領域をコードする遺伝子にCIIタグ (collagen type I) 配列を結合した発現ベクターを構築し、ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231、ATCC)に導入して安定発現株を作製した。

【 0 0 3 4 】

PSF1エピトープペプチドの精製および同定

本細胞または本細胞に対してヒトPSF1を一過性に強制発現させた細胞の培養上清を回収し、発現させたHLA-A*02分子を抗CIIタグ抗体カラムで精製した(国際公開公報 WO2011/034128号)。150 mM NaCl/20 mM Tris緩衝液および400 mM NaCl/20 mM Tris緩衝液により抗CIIタグ抗体カラムを洗浄後、HLA-A*02分子に結合するペプチドを10%酢酸にて抽出した。抽出したペプチドをAmicon Ultra 10K(Millipore社)を用いて限外濾過し、SCX(GL Sciences社)によるペプチドの分画を行った。各フラクションに対し、C18カラム(GL Sciences社)にてペプチド精製を行い、Speed Vacによる遠心濃縮を行った。遠心濃縮後のサンプルを0.1% TFA/2% アセトニトリルに再溶解し、LTQ Orbitrap XL(Thermo Fisher Scientific社)を用いて測定後、MASCOTアルゴリズム(Matrix Science社)により、PSF1に由来するペプチド配列を検索した。

10

【 0 0 3 5 】

(結果)

PSF1のアミノ酸配列(配列番号1)と一致する5個のペプチドを見出した。その結果を表1に示した。癌細胞から回収したHLA-A*02分子ペプチド複合体の中にPSF1ペプチドが含まれていたことから、PSF1が癌抗原となる可能性が得られた。また、同定されたペプチドの中にはHLA-A*02結合ルール(Nature (1991) 351 290-296)に当てはまるペプチドが存在したことから、これらが癌ワクチンペプチドとしてCTL誘導活性を示す可能性が考えられた。

20

【 0 0 3 6 】

【表1】

開始アミノ酸番号	ペプチド配列
21	LPAFNEDGLRQV
35	EMKALYEQN
79	YLYDRLLRI
88	RALRWEYGSVLPN
130	GDEGLDITQDMKP

30

【 0 0 3 7 】

<実施例2> in silico予測

実施例1においてPSF1が癌抗原であることが示され、複数の癌ワクチン候補ペプチドが同定された。一方、reverse immunologyではソフトウェアを用いてHLA-A*02分子に結合する可能性があるペプチドを得る(Immunology and Cell Biology (2006) 84, 318-330)。そこで、実施例1以外のPSF1ペプチド候補を得るためにソフトウェア検索を行った。

【 0 0 3 8 】

(方法)

HLA-A*02分子に結合するペプチドの予測は3種類のソフトウェア

NetMHC <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>、

BIMAS http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/、

SYFPEITHI <http://www.syfpeithi.de/>

を用いて実施した。これらのソフトウェアにPSF1全長アミノ酸配列を入力し、9 merおよび10 merのペプチドに関する結合スコアを得た。

40

【 0 0 3 9 】

(結果)

PSF1全長に由来する9 merおよび10 merのペプチドにおいてスコアが高いペプチドが複数得られた。SYFPEITHI によって得られたスコアを表2に示す。これらのペプチドはHLA-A*

50

02分子に結合できる可能性があることを示している。

【0040】

【表2】

開始アミノ酸番号	配列(9mer)	SYFPEITHIスコア	開始アミノ酸番号	配列(10mer)	SYFPEITHIスコア
5	KAMELIREL	25	38	ALYEQNSQSDV	25
8	ELIRELHRA	18	68	SLLRNRRTV	26
31	QVLEEMKAL	18	78	AYLYDRLLRI	16
35	EMKALYEQN	5	79	YLYDRLLRIR	18
69	LLRNRRTV	24	88	RALRWEYGSV	18
79	YLYDRLLRI	27	89	ALRWEYGSVL	22
89	ALRWEYGSV	24	97	VLPNARFHM	15
120	SLATYMRSL	27	127	SLGGDEGLDI	23
145	SLYIEVRCL	27	152	CLKDYGEFEV	22
159	FEVDDGTSV	14	176	FLPRWKCEQL	21

10

20

【0041】

<実施例3> マウスCTL誘導実験 (ELISPOT assay)

上記の実施例によって得られたPSF1ペプチドが、HLA-A*02を介してペプチド特異的なCTLを誘導するかどうか確認する。

【0042】

(方法)

ペプチド免疫とresponder cellの回収

ペプチドによるマウスCTL誘導活性の測定はマウス免疫モデルを用いて実施した。マウスは、CB6F1-Tg (HLA-A*0201/H2-Kb)A*0201をタコニック社より入手した。DMSOに溶解した各ペプチド液を最大5種類混合してPBS溶液を作製し、同量のMONTANIDE ISA 51VG (SEPPIC社)と混合してエマルジョン抗原液を作製した。抗原液はマウスの腹部の両側2箇所50 μ Lずつ皮下注射した(各ペプチド50 μ g/マウス、N=3-4)。注射してから2週間後に脾臓を摘出し、溶解液 (BD Pharm LyseTM, BD社)にて赤血球を除去した脾臓細胞をELISPOT assayのresponder cellとして回収した。

30

【0043】

stimulator cellの作製

ELISPOT assayに使用するstimulator cellのT2細胞 (ATCC) は、免疫したそれぞれの評価ペプチド (30 μ g/mL) または、ネガティブコントロールペプチド (ELAGIGILTV) を添加したAIM-V培地で一晚培養して作製した。

40

【0044】

ELISPOT assay

ELISPOT assayは、responder cellから産生されるIFN- γ を検出することによって実施した。方法は測定キットであるMouse IFN- γ ELISpot^{PLUS} (MABTECH社)の添付書に従った。IFN- γ 産生のための前培養は、測定キットに含まれる96-wellプレートに細胞を添加して実施した。各stimulator cellを 5×10^4 cell / 100 μ L/wellにてduplicate wellまたはsingle wellで播種後、responder cellを 2×10^6 cell / 100 μ L/wellにて添加した。一晚共培養後、細胞を除去してwellを洗浄し、測定キットに含まれる1次抗体 (biotin-抗マウスIFN- γ 抗体) を添加した。室温で2時間反応後にwellを洗浄し、2次抗体 (streptavidin-ALP) を加えて1時間室温で反応させた。十分な洗浄後、基質液を添加して1時間室温で放置

50

した。発色反応を終了させるために流水で十分洗浄し、プレートを風乾した。

【0045】

スポット数の測定と判定方法

Well底に見られる青色のスポットの数をImmunoSpot (R) S5 Verse Analyzer (Cellular Technology Limited社)にて計測した。なお、広範囲に着色されてスポットが不鮮明となった場合の計測値は不採用とした。duplicate wellは平均値を求め、さらにペプチド特異的なスポット数を得るためにネガティブコントロールとの差を計算した。マウスごとの値を用いて平均値とSDを計算し、平均値とSD値の差が正数となった場合に陽性と判断した。

【0046】

(結果)

表3に示すペプチドについてペプチド特異的なスポットがみられ、このうち10個のペプチドを陽性と判断した。PSF1由来ペプチドによって特異的なCTLが誘導されたことから、ペプチドがHLA-A*02に提示され、さらにPSF1由来ペプチドを認識するマウスCTLが誘導されることが分かった。マウス免疫システムでの結果であるが、ヒトMHCであるHLA-A*02を介した反応であるため、ヒトでも同様にしてCTLが誘導される可能性が示唆された。

【0047】

【表3】

開始アミノ酸番号	配列	特異的スポット数(Ave ±SD)	開始アミノ酸番号	配列	特異的スポット数(Ave ±SD)
9mer			10mer		
5	KAMELIREL	22±13	38	ALYEQNQSDV	30±15
31	QVLEEMKAL	7±7	68	SLLRNRRTV	1±2
35	EMKALYEQN	6±8	78	AYLYDRLLRI	23±21
69	LLRNRRTV	7±9	79	YLYDRLLRIR	165±17
79	YLYDRLLRI	80±18	97	VLPNALRFHM	127±41
120	SLATYMRSLS	70±79	152	CLKDYGEFEV	53±28
145	SLYIEVRCL	43±24	176	FLPRWKCEQL	31±24
			>10mer		
			21	LPAFNEDGLRQV	3±8
			88	RALRWEYGSVLPN	29±22
			130	GDEGLDITQDMKP	1±2

【0048】

<実施例4> ヒトCTL誘導実験 (ELISPOT assay)

実施例1および2によって得られたPSF1ペプチドが、ペプチド特異的なヒトCTLを誘導するかどうか確認する。

【0049】

(方法)

ヒトCTL誘導実験は既報 (Harano et al. Int. J. Cancer: 123, 2616-2625, 2008) を参考に条件設定して実施した。

【0050】

末梢血単核球細胞の回収

HLA-A*0201を有する健常人ボランティアのヘパリン加末梢血を3000 rpmで20分間遠心して

10

20

30

40

50

血漿を除去した。HEPES (SIGMA社) を5 mMとなるように添加したHBSS(-) (和光純薬) を細胞ペレットに加えて懸濁し、Ficoll-paque PREMIUM (GE Healthcare社) に重層した。400 gで40分間遠心し、中間層に分離される末梢血単核球細胞 (Peripheral Blood Monocyte cell; PBMC) を回収した。

【0051】

CD14陽性細胞およびCD8陽性細胞の調製

PBMCにCD14マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社) を添加して4 で15分間回転しながら反応させた。細胞をLSカラム (Miltenyi Biotec社) に通し、QuadroMACS (TM) Separator (Miltenyi Biotec社) を用いてCD14陽性細胞を得た。残りの細胞を回収して洗浄し、CD8マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社) を添加して4 で15分間反応させた。その後、同様に処理してCD8陽性細胞を得た。CD14陽性細胞については、引き続いて単球由来樹状細胞 (Monocyte-derived dendritic cells: Mo-DC) への分化誘導を行い、CD8陽性細胞は一旦凍結保存した。

10

【0052】

Mo-DCへの分化誘導とペプチド提示細胞の作製

CD8陽性細胞に対する抗原刺激は2回実施するので、これにあわせてペプチド提示細胞の作製も2回行った。RepCellプレート (CellSeed社) 2枚にCD14陽性細胞を播種し、抗生物質と血清を含むAIM-V (Invitrogen社) 培地に100 ng/ml GM-CSF (R&D Systems社) と10 ng/ml IL-4 (R&D Systems社) を添加した培養液で37、5% CO₂ インキュベーター内で培養した (Mo-DC分化誘導)。

20

初回のペプチド提示細胞の作製は培養開始から5-7日後に実施した。一方のプレートに0.1 KE/mlの濃度でOK-432 (中外製薬) を添加して、翌日に細胞を回収し96-well U底プレートに播種した。プレートの半面 (48wells) 当たり一種類の評価ペプチドを20 μg/mlずつ添加し、37、5% CO₂ インキュベーター内で一日培養してペプチド提示細胞を作製した。2回目の作製は、培養開始から12-14日後にもう一方のプレートに対して同様に実施した。

【0053】

ペプチド提示細胞を用いた抗原刺激によるCTLの誘導およびresponder cellの調製

96-wellプレート内のペプチド提示細胞に対してX線照射 (30 Gy) した後、凍結保存していたCD8陽性細胞を全ウェルに添加して1回目の抗原刺激を行った。培養液は抗生物質と血清を含むAIM-V培地に10 ng/ml IL-7 (R&D Systems社) を添加したものをを用いた。7日間培養後、上清に含まれる細胞を回収して、2回目に作製したペプチド提示細胞 (X線照射済み) と共培養して96-wellプレート内で2度目の抗原刺激を行った。この時の培養液には20 U/mL IL-2 (塩野義製薬) を添加した。さらに7日間培養後、CTLを含む上清内細胞を回収して抗生物質と血清を含むAIM-V培地で洗浄し、ウェル当たり約2 x 10⁵ cells/mlの濃度に調製してELISPOT assayのresponder cellとした。

30

【0054】

stimulator cellの作製

ELISPOT assayに使用するstimulator cellのT2細胞は、評価ペプチド (20 μg/mL) を添加したAIM-V培地で一晚培養して作製した。ネガティブコントロールのstimulator cellはT2細胞のみを用いた (ペプチドなし)。各細胞に対してX線照射 (30 Gy) し、抗生物質と血清を含むAIM-V培地で洗浄して2 x 10⁵ cells/mlの濃度に調製した。

40

【0055】

ELISPOT assay

ELISPOT assayは、responder cellから産生されるIFN- を検出することによって実施した。方法は測定キットであるELISpotPRO for Human IFN- (MABTECH社) の添付書に従った。測定キットの96-wellプレートにresponder cellを100 μL/wellで2wellずつ添加し、各wellに評価ペプチドを添加したstimulator cellまたはネガティブコントロールのstimulator cell (ペプチドなし) を100 μL/wellずつ播種した。一晚培養後、各wellの細胞を除去してwellを洗浄し、測定キットに含まれるALP標識抗IFN- 抗体を添加した。室温で2

50

時間反応後に十分洗浄し、基質液を添加して5分間室温で放置した。発色反応を終了させるために流水で十分な洗浄を実施し、プレートを風乾した。

【0056】

スポット数の測定と判定方法

Well底に見られる青色のスポットの数をImmunoSpot (R) S5 Verse Analyzerにて計測した。同一のresponder cellが入ったウェルにおいて、ペプチド添加したstimulator cellによるスポット数からネガティブコントロールのstimulator cell(ペプチドなし)によるスポット数を引いてペプチド特異的スポット数を計算した。差が50以上の場合を陽性としたところ、複数のドナーに対する検討において以下の7個のペプチドが陽性であった。

【0057】

(結果)

以下の表4に示す7個のペプチドが特異的なヒトCTLを誘導した。PSF1由来ペプチドによって特異的なCTLが誘導されたことから、ヒトにおいてPSF1由来ペプチドを認識するCTLが存在することが分かった。これにより、これらのPSF1ペプチドが癌ワクチンとなる可能性が示唆された。

【0058】

ELISPOT assay解析結果

【表4】

ペプチド開始番号	配列	陽性ドナー数	ドナー数	ドナー陽性率
21	LPAFNEDGLRQV	0	7	0%
35	EMKALYEQN	1	8	13%
79	YLYDRLLRI	6	13	46%
145	SLYIEVRCL	2	2	100%
88	RALRWEYGSVLPN	1	8	13%
88	RALRWEYGSV	3	5	60%
89	ALRWEYGSVL	2	2	100%
89	ALRWEYGSV	2	5	40%
130	GDEGLDITQDMKP	0	7	0%

【0059】

<実施例5> ヒトCTL誘導実験(Tetramer assay)

PSF1ペプチド特異的CTLが誘導されていることを別法にて確認するためにTetramer assayを実施した。

【0060】

(方法)

CTLラインの作製

前述したELISPOT assayにおいて陽性が確認できた細胞について、抗生物質と血清を含むAIM-V培地に100 ng/mlのIL-15(Miltenyi Biotec社)を添加した培養液で培養を継続した。

【0061】

Tetramer assay

PSF1ペプチド(YLYDRLLR)に対するtetramer(MBL社)を作製した。CTLラインの細胞を回収し、tetramerおよびAPC H7標識抗CD8抗体(SK-1)(BD社)で染色してFACS Aria(BD社)で測定した。CTLラインは2種類(0209-01 H2、0209-02 D2)を使用した。

【0062】

(結果)

図1に示すとおり、いずれのCTLラインにおいても抗CD8抗体とtetramerの両方に反応する

10

20

30

40

50

細胞集団が見られたことからPSF1ペプチドを認識するCTLラインが作製されていることが明らかになった。Tetramer陽性の細胞が見られたことから、ペプチド特異的ヒトCTLが存在することが直接的に明らかになった。

【0063】

<実施例6> ヒトCTL細胞傷害性試験

CTLラインが、細胞を攻撃する活性を有するかどうか調べるために細胞傷害性試験を実施した。

【0064】

具体的には、既報(New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. Jedema I. et al. Blood (2004)103, 2677-2682) の方法を参考にして実験条件を設定した。

【0065】

target cellの作製

細胞傷害性試験に使用するtarget cellとしてT2細胞に1 μMのCellTracker (TM) Green CMFDA(5-chloromethylfluorescein diacetate) (Invitrogen社)を添加して、37 °Cで15分間反応した。蛍光標識体であるCMFDAでラベルした後、AIM-Vで洗浄し、各評価ペプチド(20 μg/ml)をT2細胞に添加して一晩培養した。ネガティブコントロールのtarget cellは蛍光ラベルのみ行ったT2細胞を用いた(ペプチド添加なし)。各細胞を抗生物質と血清を含むAIM-V培地で洗浄して 5×10^4 cells/mlの濃度に調製した。

【0066】

effector cellの作製

細胞傷害性試験に使用するeffector cellは、前述のELISPOT assay後の培養によって得られた3種類のCTLライン(0209-1 H2; YLYDRLLR1、1004-1 P-13-1_2; RALRWEYGSVLPN、1004-1 P-10-9_1; ALRWEYGSVL)を用いた。細胞は、AIM-Vで洗浄後50, 15, 5×10^4 cells/mlの濃度となるように調製した。調製は抗生物質と血清を含むAIM-V培地で行った。

【0067】

細胞傷害性試験

CTL誘導した際に使用したペプチドを添加したtarget cell(T)またはペプチド未添加のネガティブコントロールのtarget cell(T)をそれぞれEffector cell(E)と細胞比(E/T比)10:1、3:1、1:1で混合して一晩共培養した。MACS Quant (Miltenyi Biotec)もしくはFACS Ariaでの測定の直前に、生細胞と死細胞を染め分けるために0.1 μg/ml DAPIを添加した。解析は、CMFDAでラベルしたtarget cellにおけるDAPI陰性細胞(生細胞)の割合を求め、さらにeffector cellとの共培養を実施しなかった培養条件(target cellのみ)を100%としてtarget cellの生存率を計算した。

【0068】

(結果)

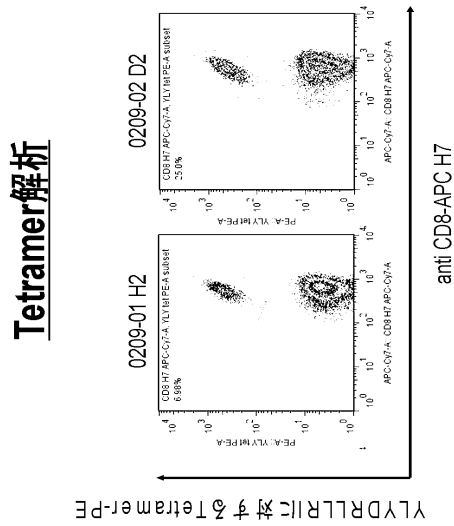
図2に示すとおり、いずれのCTLラインに対する実験でも、ネガティブコントロールのtarget cell(ペプチドなし)に比し、ペプチドを添加したtarget cellの生存率の方が低かった。各ペプチドによって誘導された3種類のCTLラインは、ペプチドを特異的に認識して細胞傷害効果を示すことがわかった。このことからPSF1ペプチドを細胞表面に提示する癌細胞がPSF1ペプチドを認識するCTLによって傷害される可能性が示唆され、PSF1ペプチドが癌ワクチンになりえることが示された。

【産業上の利用可能性】

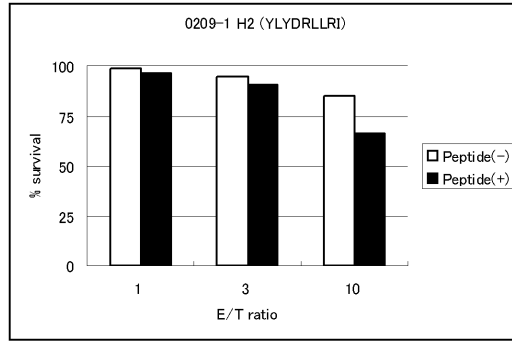
【0069】

本発明によって、CTLを有意に誘導できるペプチド、そのペプチドをコードするDNA、これらのペプチドやDNAを含有する医薬組成物、およびこれらのペプチドやDNAを利用した癌ワクチンを提供することが可能となった。

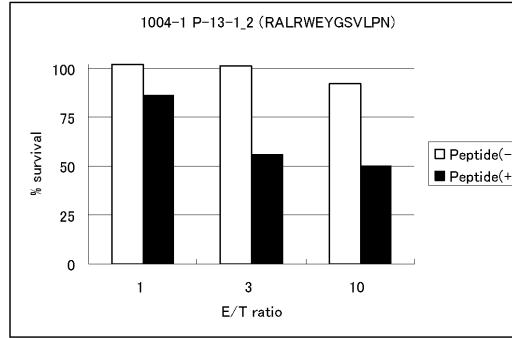
【 図 1 】



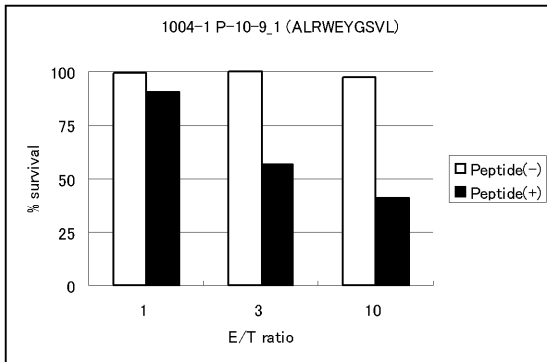
【 図 2 - 1 】



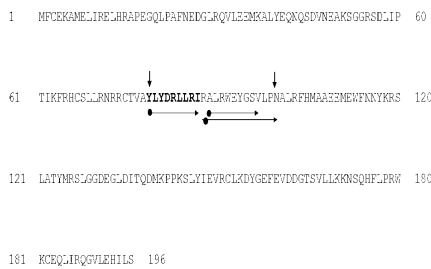
【 図 2 - 2 】



【 図 2 - 3 】



【 図 3 】



【配列表】

0005920742000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

(72)発明者 井口 源文
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

(72)発明者 横山 真理
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第2008/102557(WO, A1)
国際公開第2007/119515(WO, A1)
NAKAHARA, I., et al., Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells
, Genes to Cells, 2010年, Vol.15, p.1015-1024
中原泉, et al., PSF1遺伝子の過剰発現は乳がん細胞の増殖を促進する, 第32回日本分子
生物学会年会要旨集, 2009年, 1P-0755

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)
UniProt/GeneSeq
PubMed