

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/046182

発行日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(43) 国際公開日 平成15年6月5日(2003.6.5)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 35/00
 C O 7 K 14/47

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 35/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-547614 (P2003-547614)	(71) 出願人	503355498 株式会社 G B S 研究所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/012502		東京都新宿区大京町 1 0 番地 1 0 ヴィラ コテト 2 0 2
(22) 国際出願日	平成14年11月29日(2002.11.29)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(31) 優先権主張番号	特願2001-367960 (P2001-367960)	(72) 発明者	戸田 正博 日本国東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應 義塾大学医学部内
(32) 優先日	平成13年11月30日(2001.11.30)	(72) 発明者	河上 裕 日本国東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應 義塾大学医学部内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	植田 良 日本国東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應 義塾大学医学部内
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 精巢由来のヒトグリオーマ抗原

(57) 【要約】

グリオーマの診断・治療に応用することができる、グリオーマ抗原と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質やそれをコードする遺伝子等を提供するものである。精巢から全RNAを抽出し、cDNAを合成し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって構築したファージcDNAライブラリーとグリオーマ患者の血清とを反応させ、標識抗IgG抗体を用いて血清中の抗体が反応した陽性クローンを検出し、検出した陽性クローンに対して、さらに数回のスクリーニングを繰り返し、抗体反応性を確認した陽性クローンから抗原を単離し、単離された抗原とグリオーマ患者血清、健常人血清等とを用いて血清スクリーニングを行い、グリオーマの診断・治療に応用することができる、グリオーマ抗原と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質やそれをコードする遺伝子を調製する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、又は配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 2】

配列番号 1 若しくは 3 に示される塩基配列又はそれらの相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む塩基配列からなる DNA。

【請求項 3】

請求項 2 記載の DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】

請求項 3 記載の DNA 又はかかる DNA に対応する RNA と特異的にハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質の発現を阻害しうることを特徴とするオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸。

【請求項 5】

配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質。

【請求項 6】

請求項 5 記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。

【請求項 7】

請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドと、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド。

【請求項 8】

請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドに対する抗体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 10】

請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した、あるいは請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドを過剰発現する非ヒト動物。

【請求項 12】

請求項 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドと被検物質と T 細胞を用い、T 細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 13】

以下の (1) ~ (5) の工程により得られる、グリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質。

(1) 精巣組織から全 RNA を抽出・精製し、精製後の mRNA を用いて cDNA を合成し、この cDNA を ファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって ファージ cDNA ライブラリーを構築する工程；

(2) グリオーマ患者の血清を希釈し、大腸菌の抽出物と反応させ、反応物を除去することにより反应用血清を作製する工程；

(3) 前記 ファージ cDNA ライブラリーと反应用血清を反応させ、標識抗 IgG 抗体を用いて血清中の抗体が反応した陽性クローンを検出する工程；

10

20

30

40

50

(4) 検出された陽性クローンに対して、さらに数回のスクリーニングを繰り返し、抗体反応性を確認する工程；

(5) 陽性クローンから抗原を単離し、単離された抗原と少なくともグリオーマ患者血清、健常人血清とを用いて血清スクリーニングする工程；

【請求項14】

KU-GB-4、KU-GB-3、SOXファミリー分子、ジンクフィンガーホメオボックス、ADPリボシル化因子、又はMフェーズホスホプロテイン1(M-phase phosphoprotein 1)からなることを特徴とする請求項13記載の精巣由来の抗原タンパク質。

【請求項15】

SOXファミリー分子が、SOX5、SOX6、又はSOX13であることを特徴とする請求項14記載の精巣由来の抗原タンパク質。

【請求項16】

請求項13～15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部、及び/又は該タンパク質の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を含有することを特徴とするグリオーマ検出用診断薬。

【請求項17】

請求項13～15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法。

【請求項18】

血清を被検試料とし、ELISA又はウェスタンブロット法を用いることを特徴とする請求項17記載のグリオーマの診断方法。

【請求項19】

細胞組織を被検試料とし、免疫組織化学的分析法を用いることを特徴とする請求項17記載のグリオーマの診断方法。

【請求項20】

請求項13～15のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含有することを特徴とするグリオーマ検出・診断用プローブ。

【請求項21】

請求項13～15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部、及び/又は該グリオーマ抗原の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を有効成分として含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

【請求項22】

請求項21記載の抗腫瘍剤を用いることを特徴とする腫瘍の予防・治療剤。

【請求項23】

免疫組織化学的分析においてグリオーマを特異的に認識することを特徴とするグリオーマ認識抗体。

【請求項24】

抗SOX6抗体であることを特徴とする請求項23記載のグリオーマ認識抗体。

【請求項25】

抗SOX6抗体が、SOX6のHMGボックスを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項24記載のグリオーマ認識抗体。

【請求項26】

請求項23～25のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を含有することを特徴とするグリオーマ検出用診断薬。

【請求項27】

請求項23～25のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法。

【請求項28】

血清を被検試料とし、ELISA又はウェスタンブロット法を用いることを特徴とする請

10

20

30

40

50

求項 27 記載のグリオーマの診断方法。

【請求項 29】

細胞組織を被検試料とし、免疫組織化学的分析法を用いることを特徴とする請求項 27 記載のグリオーマの診断方法。

【請求項 30】

請求項 23 ~ 25 のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、ヒトの悪性脳腫瘍であるグリオーマに発現し免疫反応を示すグリオーマ抗原と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質やその遺伝子、それらグリオーマ抗原やその遺伝子を用いた、免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法や、グリオーマ検出・診断用プローブや、抗腫瘍剤等に関する。

背景技術

免疫療法は古くから期待され、様々な試みがなされてきたが、未だ十分な抗腫瘍効果を示すには至っていない。従来、癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、近年、T細胞が生体内での腫瘍拒絶に重要な役割を果たすことがヒトメラノーマにおいて明らかになり、さらにMAGE-1抗原(Science 254, 1643-7, 1991)が1991年にベルギーのグループより報告されて以来、細胞傷害性T細胞(CTL: cytotoxic T lymphocyte)を誘導しうるT細胞認識腫瘍抗原の単離とMHCクラスI拘束性エピトープの決定に努力がそそがれている。本発明者らはメラノーマの腫瘍反応性T細胞を用いたcDNA発現クローニング法によりCD8⁺T細胞認識抗原を単離し(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515-3519, 1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462, 1994、J. Exp. Med. 180, 347-352, 1994、J. Immunol. 154, 3961-3968, 1995、Immunologic Res. 16, 313-340, 1997)、この抗原を用いた特異的免疫療法により、一部のメラノーマに対して抗腫瘍効果が認められることを報告している(Microbiology Immunology 42, 803-813, 1998、Kawakami, Y., P. F. Robbins, R. F. Wang. et al. Identification of Melanoma antigens by T lymphocytes and their use in the immunotherapy of cancer. In Principle and Practice of Oncology. Update. V. DeVita, S. Hellman, S. A. Rosenberg eds. J. B. Lippincott Co. Philadelphia, p1-20, 1996、Nature Med. 4, 321, 1998)。またT細胞が認識する抗原は、MHC分子に結合したペプチドであり、しかもペプチドの起源は細胞表面タンパクである必要がなく、核内タンパクや細胞質タンパクでも抗原として認識されることが明らかになっている(Immunity 10, 281-7, 1999)。

1995年にドイツのPfreundschuhや米国のOldらのグループにより、腫瘍及びCTLを必ずしも必要とせず、細胞株の樹立が困難である癌腫において適用できる、癌患者血清中のIgG抗体が認識する癌抗原タンパクを検出するSEREX法(serological identification of recombinant cDNA expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci, USA 92, 11810-11813, 1995)が報告されている。この方法によって多くの腫瘍抗原が単離されているが、本方法を用いて単離された抗原の中にはCTLを誘導するMAGE-1やチロシナーゼなどの抗原がみられることから、細胞性免疫が認識する抗原を検出する方法としても有用であることが指摘されている。また、上記方法を用いて、メラノーマ、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌等において、患者IgG抗体が認識

10

20

30

40

50

する癌抗原を単離した報告もなされている (Int. J. Cancer 72, 965 - 971, 1997、Cancer Res. 58, 1034 - 1041, 1998、Int. J. Cancer 29, 652 - 658, 1998、Int. J. Oncol. 14, 703 - 708, 1999、Cancer Res. 56, 4766 - 4772, 1996、Hum. Mol. Genet. 6, 33 - 39, 1997)。これらの抗原には CT (cancer - testis) 抗原 (SSX2 / HOM - MEL - 40、NY - ESO - 1、SCP - 1、CT7 など)、分化抗原 (galectin - 4 / NY - CO - 27)、変異抗原 (p53 など) 等の重要な抗原がある。これらの抗原の中で特に NY - ESO - 1 は HLA - A2 拘束性のエピトープが決定されている。また、SEREX 法を用いて単離された抗原の中には、e1F - 4 や HER2 / neu のように癌に高発現する分子もあり、これら分子は癌化に関連している可能性がある。このような癌に高発現する分子は、治療に応用しうるだけでなく診断のマーカーや再発、予後を推定しうるマーカーとなる可能性がある。

10

他方、中枢神経系は免疫学的寛容の場として知られていたが、近年、活性化されたリンパ球が、血液脳関門を通過して脳内に侵入し、脳内抗原と反応することが示されている (J. Immunol. 158, 2318 - 26, 1997、J. Neurosci. 18, 5804 - 16, 1998)。また本発明者らにより、脳内の腫瘍抗原に対する特異的な免疫誘導は新しい有効な治療法となる可能性が示唆されている (Neuro - Oncology 1, S105, 1999)。現在、悪性脳腫瘍であるグリオーマの診断法として、MRI 等による画像解析と手術検体を用いた病理組織解析が中心に行われているが、近年の分子細胞生物学の進歩により、グリオーマの発生に関与する遺伝子も明らかになりつつあり、それらを解析する遺伝子診断の可能性も示唆されている (Glia. 15, 308 - 27, 1995)。

20

SOX 遺伝子ファミリーは、配列特異的 DNA 結合を仲介するよく保存された SRY 関連の HMG ボックス領域によって定義される転写因子である (Curr. Opin. Genet. Dev. 7, 338 - 344, 1997; Nucleic Acids Res. 27, 1409 - 1420, 1999)。1990 年の SRY 遺伝子 (Y 染色体上の男性を決める精巣決定遺伝子) の発見がきっかけとなり、SRY の HMG ボックスと高いホモロジー (> 60%) を示す遺伝子群が、交差ハイブリダイゼーションや PCR 法により同定され、HMG ボックススーパーファミリーのなかで新たな 1 つのサブファミリーを形成している。SOX 遺伝子は、ヒトとマウスを含む脊椎動物から無脊椎動物 (ショウジョウバエ) まで幅広い種において見い出され、マウスでは少なくとも 20 種類以上の SOX 遺伝子の存在が報告されている。

30

SOX タンパク質の既知の機能は、幅広くかつ複雑であり、Sry は性決定に関与し (Nature 364, 713 - 715, 1993)、SOX 1 - 3 はレンズ発達に関与し (Development 125, 2521 - 2532, 1998)、SOX 4 は心臓における心内膜先端形成及び Pro - B 細胞増殖に関与し (Nature 380, 711 - 714, 1996)、SOX 9 は軟骨形成及び性決定に関与し (Nat. Genet. 22, 85 - 89, 1999; Cell 79, 1111 - 1120, 1994)、そして SOX 10 は神経冠細胞分化に関与する (Nat. Genet. 18, 60 - 64, 1998; Nat. Genet. 18, 171 - 173, 1998)。以上の研究により SOX 遺伝子が発達経路において調節的役割を果たしていることが裏付けられる。

40

また、SOX 6 タンパク質の機能は、他の SOX 遺伝子の行動と同様に、胚発育を規制し細胞運命を決定することにあるとされている。マウス SOX 6 は、胚形成期間中に中枢神経系において発現すると報告されており、交配後 12.5 日まで発現するが、成体脳からは検出されない (Nucleic Acids Res. 23, 3365 - 3372, 1995)。SOX 6、SOX 5、及び SOX 9 はマウス胚の軟骨部位すべてにおいて軟骨形成初期段階から同時に高レベルで発現していた (Embo. J. 17, 5718 - 5733, 1998)。従前の報告 (Embo. J. 17, 5718 - 5733, 1998、Gene 265, 157 - 164, 2001) によると、マウス SOX 6 は胎児脳及び

50

一次 (primary) 軟骨細胞において発現するが、かかる発現は精巣での発現より低い。

また、マウス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 4180 - 4185, 2000)、ラット (Biol. Pharm. Bull. 25, 705 - 709, 2002) 及びヒト (Gene 265, 157 - 164, 2001) において SOX6 転写物の2つの主要な大きさのクラスが報告されている。短い転写物はおよそ3 kb であり、長い転写物は8 - 9 kb である。これらの転写物の違いは3' と5' のUTR (非翻訳領域) 双方の大きさが異なることによって引き起こされると報告されている (Emb. J. 17, 5718 - 5733, 1998) が、異なるプロモーターや異なるRNA プロセッシングに起因している可能性も否定されていない。

10

現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状である。特に悪性脳腫瘍は極めて治療が困難な疾患で、近年の脳外科手術、放射線治療の進歩にもかかわらず、現在まで有効な治療法がなかった。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。本発明の課題は、グリオーマの診断・治療に応用することができるグリオーマ抗原と同効な免疫誘導活性を有する精巣由来の抗原タンパク質やそれをコードする遺伝子等を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、精巣由来のcDNAライブラリーとグリオーマ患者血清とを用いたSEREX法により、グリオーマ患者血清とのみ反応を示す精巣由来の新規抗原タンパク質や、多くのグリオーマ患者血清と反応を示し健常人の血清の抗体とはほとんど反応を示さない精巣由来の新規抗原タンパク質を得た。かかるグリオーマ抗原を用いたRT-PCR法により、グリオーマ抗原と同効な免疫誘導活性を有する精巣由来の抗原タンパク質やそれをコードするDNAがグリオーマの診断・治療に有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

発明の開示

すなわち本発明は、配列番号2若しくは4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、又は配列番号2若しくは4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA (請求項1) や、配列番号1若しくは3に示される塩基配列又はそれらの相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む塩基配列からなるDNA (請求項2) や、請求項2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA (請求項3) や、請求項3記載のDNA又はかかるDNAに対応するRNAと特異的にハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質の発現を阻害しうることを特徴とするオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸 (請求項4) に関する。

30

また本発明は、配列番号2若しくは4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2若しくは4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質 (請求項5) や、請求項5記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド (請求項6) や、請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドと、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド (請求項7) や、請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドに対する抗体 (請求項8) や、請求項1~4のいずれか記載のDNAを含む組換えベクター (請求項9) や、請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞 (請求項10) や、請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した、あるいは請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドを過剰発現する非ヒト動物 (請求項11) や、請求項5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドと被検物質とT細胞を用い、T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項12) に関する。

40

50

本発明はまた、(1)精巢組織から全RNAを抽出・精製し、精製後のmRNAを用いてcDNAを合成し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによってファージcDNAライブラリーを構築する工程；(2)グリオーマ患者の血清を希釈し、大腸菌の抽出物と反応させ、反応物を除去することにより反应用血清を作製する工程；(3)前記ファージcDNAライブラリーと反应用血清を反応させ、標識抗IgG抗体を用いて血清中の抗体が反応した陽性クローンを検出する工程；(4)検出された陽性クローンに対して、さらに数回のスクリーニングを繰り返し、抗体反応性を確認する工程；(5)陽性クローンから抗原を単離し、単離された抗原と少なくともグリオーマ患者血清、健常人血清とを用いて血清スクリーニングする工程；の工程により得られる、グリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質(請求項13)や、KU-GB-4、KU-GB-3、SOXファミリー分子、ジンクフィンガーホメオボックス(Zinc finger homeobox 1B)、ADPリボシル化因子(ADP-ribosylation factor 4-like)、又はMフェーズホスホプロテイン1(M-phase phosphoprotein 1)からなることを特徴とする請求項13記載の精巢由来の抗原タンパク質(請求項14)や、SOXファミリー分子が、SOX5、SOX6、又はSOX13であることを特徴とする請求項14記載の精巢由来の抗原タンパク質(請求項15)や、請求項13~15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部、及び/又は該タンパク質の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を含有することを特徴とするグリオーマ検出用診断薬(請求項16)や、請求項13~15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法(請求項17)や、血清を被検試料とし、ELISA又はウェスタンブロット法を用いることを特徴とする請求項17記載のグリオーマの診断方法(請求項18)や、細胞組織を被検試料とし、免疫組織化学的分析法を用いることを特徴とする請求項17記載のグリオーマの診断方法(請求項19)や、請求項13~15のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含有することを特徴とするグリオーマ検出・診断用プローブ(請求項20)や、請求項13~15のいずれか記載のタンパク質の全部若しくは一部、及び/又は該グリオーマ抗原の全部若しくは一部に特異的に結合する抗体を有効成分として含有することを特徴とする抗腫瘍剤(請求項21)や、請求項21記載の抗腫瘍剤を用いることを特徴とする腫瘍の予防・治療剤(請求項22)に関する。30

さらに本発明は、免疫組織化学的分析においてグリオーマを特異的に認識することを特徴とするグリオーマ認識抗体(請求項23)や、抗SOX6抗体であることを特徴とする請求項23記載のグリオーマ認識抗体(請求項24)や、抗SOX6抗体が、SOX6のHMGボックスを特異的に認識する抗体であることを特徴とする請求項24記載のグリオーマ認識抗体(請求項25)や、請求項23~25のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を含有することを特徴とするグリオーマ検出用診断薬(請求項26)や、請求項23~25のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法(請求項27)や、血清を被検試料とし、ELISA又はウェスタンブロット法を用いることを特徴とする請求項27記載のグリオーマの診断方法(請求項28)や、細胞組織を被検試料とし、免疫組織化学的分析法を用いることを特徴とする請求項27記載のグリオーマの診断方法(請求項29)や、請求項23~25のいずれか記載のグリオーマ認識抗体を用いることを特徴とするグリオーマの診断方法(請求項30)に関する。40

発明を実施するための最良の形態

本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質としては、例えば、(1)精巢組織から全RNAを抽出・精製し、精製後のmRNAを用いてcDNAを合成し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによってファージcDNAライブラリーを構築する工程；(2)グリオーマ患者の血清を希釈し、大腸菌の抽出物と反応させ、反応物を除去することにより反应用血清を作製する工程；(3)前記ファージcDNAライブラリーと反应用血清を反応させ、標識抗IgG抗体を用いて血清中の抗体が反応した陽性クローンを検出する工程；(4 50

) 検出された陽性クローンに対して、さらに数回のスクリーニングを繰り返し、抗体反応性を確認する工程；(5) 陽性クローンから抗原を単離し、単離された抗原と少なくともグリオーマ患者血清、健常人血清とを用いて血清スクリーニングする工程；を含む調製方法により得られる抗原タンパク質を挙げるができる。また、上記工程(4)で得られた陽性クローンのcDNAインサートをPCRにより増幅し、配列を決定して、既存の遺伝子データベース等を利用して相同性検索をすることが好ましく、工程(5)においては、グリオーマ患者血清、健常人血清の他、他の脳疾患患者や他の癌患者等の血清を用いて血清スクリーニングをすることが好ましい。

かかる精巣由来の抗原タンパク質として、具体的には、グリオーマ患者血清とのみ反応する、あるいは高い反応性を示すKU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6) (GenBankアクセッション番号NM_006940)、SOX6 (GenBankアクセッション番号NM_033326)、SOX13 (GenBankアクセッション番号NM_005686)等のSOXファミリー分子や、ジンクフィンガーホメオボックス (Zinc finger homeobox 1B) (GenBankアクセッション番号NM_014795)や、ADPリボシル化因子 (ADP-ribosylation factor 4-like) (GenBankアクセッション番号NM_033326)などのグリオーマ特異抗原 (グリオーマ特異抗原遺伝子) 群と、グリオーマ患者血清との反応で特異性がみられないMフェーズホスホプロテイン1 (GenBankアクセッション番号NM_016195)等のグリオーマ非特異抗原 (グリオーマ非特異抗原遺伝子) 群から選ばれる1又は2以上の精巣由来の抗原タンパク質を挙げるができる。これら精巣由来の抗原タンパク質を用いると、強力な抗原提示細胞である樹状細胞にインビボあるいはインビトロで発現させて、その抗原発現樹状細胞投与により免疫誘導を行うことができる。

本発明のタンパク質としては、上記グリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巣由来の抗原タンパク質のうち新規な抗原タンパク質やそのアイソフォームを例示することができる。具体的には、配列表の配列番号2に示される精巣由来の抗原タンパク質KU-GB-3や、配列番号4に示される精巣由来の抗原タンパク質KU-GB-4や、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質を例示することができる。ここで免疫誘導活性とは、抗体産生、細胞性免疫、免疫寛容等の免疫反応を誘導する活性をいい、かかる免疫誘導活性の中でも、末梢血の細胞傷害性T細胞 (CTL) 前駆細胞の頻度を上昇させるT細胞誘導活性を有するものが特に好ましい。

本発明のペプチドとしては、上記タンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドを例示することができる。かかるペプチドは特に制限されるものではないが、抗体の認識部位や、CD4⁺T細胞及び/又はCD8⁺T細胞の認識部位を構成するペプチドを好適に例示することができる。上記本発明の対象となるタンパク質及びペプチドに加えて、これらタンパク質及びペプチドに特異的に結合する抗体に対して特異的に結合する組換えタンパク質及びペプチドも本発明に含まれ、これらを総称して、以下「本件グリオーマ抗原」ということがある。なお、本件グリオーマ抗原の由来はヒトに限定されるものではなく、また本件グリオーマ抗原は、腫瘍検出用診断薬又は治療薬や、後述するように免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法に有用である。

本発明の対象となるDNAとしては、上記本発明のタンパク質をコードするDNAを挙げるができる。例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる精巣由来の抗原タンパク質KU-GB-3をコードするDNA、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる精巣由来の抗原タンパク質KU-GB-4をコードするDNA、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA、配列番号1若しくは3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部を含む塩基配列からなるDNAを例示することができる。また、増幅に使用可能なオリゴヌクレオチド配列、またはプローブもしくはマーカーとして使用可能な条件でハイブ

リダイゼーション可能なヌクレオチド配列を含むDNA又はRNAも本発明に包含される。これらのDNA又はRNAは、本件グリオーマ抗原の発現又は機能に関連した、グリオーマ等の癌疾患又はかかる疾患に対する感受性の診断のために、本件グリオーマ抗原の発現量の変化を検査することに使用できる。

また、配列番号1若しくは3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種グリオーマ細胞由来のDNAライブラリーに対してストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションを行い、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、KU-GB-3、KU-GB-4等の抗原タンパク質と同効な目的とする免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。こうして得られるDNAも本発明の範囲内である。かかる本発明のDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42 でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む洗浄バッファーによる42 での洗浄処理を挙げることができ、65 でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む洗浄バッファーによる65 での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

本発明のオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸としては、配列番号1又は3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA、又はかかるDNAに対応するRNAと、特異的にハイブリダイズし、本件グリオーマ抗原の発現を阻害しうるもの（例えば、Bioconjugate Chem. Vol. 5, No. 1, 1994を参照）であれば、特に制限されるものではない。上記「ペプチド核酸」とは、核酸(DNA/RNA)に替わる化学合成核酸アナログを意味し、核酸の基本骨格構造である五単糖・リン酸骨格を、グリシンを単位とするポリアミド骨格に置換したもので、核酸によく似た3次元構造を有するものをいう。かかるペプチド核酸の塩基は、相補的な塩基配列を持つ核酸に対し、非常に特異的かつ強力に結合し、本件グリオーマ抗原の発現を阻害しうる点で好ましい。また、上記「オリゴヌクレオチド」とは、天然に存在する塩基、又は本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分等から生成されたオリゴヌクレオチド又はその類似体をいい、かかる天然に存在する塩基、又は本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分等から生成されたオリゴヌクレオチドとは、天然に存在する種若しくは天然に存在するサブユニット、又はそれらの同族体から生成された合成種をいう。また、上記サブユニットとは、隣接するサブユニットに対してホスホジエステル結合又は他の結合によって結合した塩基-糖の組合せをいう。

一方、上記天然に存在する塩基、又は本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分等から生成されたオリゴヌクレオチドの類似体とは、上記オリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在していない塩基、例えば、ジヒドロウリジン、イノシン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン等の修飾塩基を有するオリゴヌクレオチドや、リン酸基、糖部分、3', 5'末端に化学修飾を施し、安定性を増加させたオリゴヌクレオチドなどをいう。上記リン酸基、糖部分、3', 5'末端に化学修飾を施す方法としては、例えば、ヌクレオチド間におけるホスホジエステル基の酸素原子の1つを硫黄に置換し、オリゴホスホロチオエートを得る方法や、ヌクレオチド間におけるホスホジエステル基の酸素原子の1つを-CH₃に置換し、オリゴメチルホスホネートを得る方法や、ホスホジエステル結合部位を非イオン性かつ非キラル性である他の構造に置換する方法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

上記オリゴヌクレオチドは、当業者であれば公知の合成法、例えばApplied Biosystems社などの合成装置を用いる固相合成法により製造することができる。また、同様の方法を用いて、他のオリゴヌクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエートやアルキル化誘導体を製造することもできる（村上 章ら、「機能性アンチセンスDNAの化学合成」、有機合成化学、48(3):180-193, 1990)。これらの方法

により得られた、本発明のオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸は、動物における本件グリオーマ抗原の生成を抑制することが可能である。

また、上記本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子若しくはDNA、本件グリオーマ抗原等は、以下に具体的に説明するように、本件グリオーマ抗原とマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド又は融合タンパク質や、本件グリオーマ抗原に対する抗体や、本件グリオーマ抗原をコードするDNAを含む組換えベクターや、本件グリオーマ抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、本件グリオーマ抗原を過剰発現する非ヒト動物を作製する際に使用することができる。

本発明の融合タンパク質や融合ペプチドとしては、本件グリオーマ抗原とマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよい。マーカートンパク質としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどの従来知られているマーカートンパク質を具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、Hisタグ、FLAGタグ、Sタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができるがこれらに限定されるものではない。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用したKU-GB-3、KU-GB-4等の抗原タンパク質の精製や、T細胞誘導活性を有するタンパク質の検出や、KU-GB-3、KU-GB-4等の抗原タンパク質に対する抗体の定量、グリオーマ等の癌の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

本発明の本件グリオーマ抗原に対する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げる事ができ、これらは上記本件グリオーマ抗原を用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点で好ましく、特にKU-GB-3、KU-GB-4等のエピトープあるいは該エピトープとHLAとの複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体がより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、例えば、グリオーマ等の癌の診断、ミサイル療法等の治療ばかりでなく、グリオーマ等の悪性腫瘍の発症機構を明らかにする上で有用である。

また本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本件グリオーマ抗原若しくはエピトープを含むその断片、又は該本件グリオーマ抗原、特にエピトープとHLAとの複合体を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

上記本件グリオーマ抗原に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その本件グリオーマ抗原を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本件グリオーマ抗原やその抗原エピトープを含むペプチドに対する抗体は、グリオーマ等の診断や治療に使用できる可能性がある。そして、これら抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチドも、前記のように本発明の本件グリオーマ抗原に包含される。

本発明の組換えベクターとしては、本件グリオーマ抗原をコードするDNAを含むベクターであれば特に制限されないが、本件グリオーマ抗原を宿主細胞内で発現させることができる発現系を含むものが好ましく、例えば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、より具体的には、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイ

10

20

30

40

50

ルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げるができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

本発明の本件グリオーマ抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞は、宿主細胞に本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子を導入することにより作製することができる、かかる本件グリオーマ抗原をコードするDNAやかかるDNAを含むベクターなどの上記発現系の宿主細胞への導入は、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及びSambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)などの多くの標準的な実験マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーパーローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowes悪性黒色腫細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げるができるが、ヒト細胞が好ましい。

そして、上記宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げるができる。また、HLA発現能を有する宿主細胞や、元来HLA発現能を有さない宿主細胞にHLAcDNAをトランスフェクションした宿主細胞に本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子を上記の方法で導入することにより、本件グリオーマ抗原を発現することができる発現系を含んでなるHLA発現能を有する宿主細胞を作製することができる。

また、発現系としては、本件グリオーマ抗原を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノアソシエーテッドウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げるができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる本件グリオーマ抗原は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel(Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997)らの方法などを用いることができ、また、かかる本件グリオーマ抗原を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ア

10

20

30

40

50

フィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレク
チンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィー
が用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例え
ば、本件グリオーマ抗原に対する抗体を結合させたカラムや、上記本件グリオーマ抗原に
通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合した
カラムを用いることにより、本件グリオーマ抗原を得ることができる。

本発明の本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と
は、染色体上の本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損
・置換等の遺伝子変異により不活性化され、本件グリオーマ抗原を発現する機能を失った
非ヒト動物をいい、また、本件グリオーマ抗原を過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非
ヒト動物に比べてかかる本件グリオーマ抗原を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして
、上記非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に
挙げるができるが、これらに限定されるものではない。

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、本件グリオー
マ抗原欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動
物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レ
ベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち本件
グリオーマ抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と
同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際
して併用することが好ましい。かかる本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子機能が染色
体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、本件グリオーマ抗原のノックアウト
マウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

例えば、本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すな
わち本件グリオーマ抗原ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等
の方法により得られた遺伝子断片を用いて、本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子をス
クリーニングし、スクリーニングされた本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子をウイル
スベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクロー
ンの本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセ
ット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や
単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入する
ことにより、ターゲティングベクターを作製する。

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔
)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、
G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES
細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザン
プロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウ
スの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメ
ラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘ
テロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさ
せることによって、本件グリオーマ抗原ノックアウトマウスを作製することができる。ま
た、本件グリオーマ抗原ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法とし
ては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンプロット
法等により調べたり、またこのマウスにおける本件グリオーマ抗原の発現をウェスタンブ
ロット法等により調べる方法がある。

また、本発明のグリオーマ抗原のトランスジェニックマウスは、本件グリオーマ抗原をコ
ードするcDNAにチキン - アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプ
ロモーター、及びラビット - グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させ
て導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクショ
ンし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を
飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかか

10

20

30

40

50

るトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

本発明の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、本件グリオーマ抗原と被検物質とT細胞を用い、T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、被検物質と本件グリオーマ抗原とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検物質と本件グリオーマ抗原を発現している細胞膜又は細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、HLAを発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターを共にトランスフェクトした本件グリオーマ抗原発現宿主細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検ポリペプチドを発現するベクターをトランスフェクトしたHLA発現能を有する本件グリオーマ抗原発現宿主細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、前記ノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物のT細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法等を挙げることができる。上記細胞膜又は細胞としては、前記本件グリオーマ抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、前記本件グリオーマ抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができる。かかる細胞膜又は細胞と被検物質との接触方法としては、被検物質の存在下に本件グリオーマ抗原を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、次いでT細胞と接触させる方法等を挙げることができる。T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、T細胞から培地中に放出されたIFN量を指標として評価する方法を具体的に例示することができる。また上記スクリーニング方法により得られる免疫誘導活性促進物質は、免疫誘導活性の促進を必要としている患者の治療等に用いることができ、また、免疫誘導活性抑制物質は、免疫誘導活性の抑制を必要としている患者の治療等に用いることができる。

本発明のグリオーマ検出用診断薬としては、前記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質又はその一部を含有する試薬であれば特に制限されるものではなく、抗原タンパク質の一部としては、グリオーマ抗原の抗原認識部位等を例示することができる。また、2種以上の抗原を組み合わせる場合には、KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6) (GenBankアクセッション番号NM_006940)、SOX6 (GenBankアクセッション番号NM_033326)、SOX13 (GenBankアクセッション番号NM_005686)等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックス (GenBankアクセッション番号NM_014795) や、ADPリボシル化因子 (GenBankアクセッション番号NM_033326) などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群の中から選択することが好ましい。また、本発明のグリオーマ検出用診断薬としては、前記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質又はその一部に特異的に結合するモノクローナル抗体等の抗体を含有する試薬も使用することができる。かかる抗体についても2種以上の抗体を組み合わせる場合には、上記KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6)、SOX6、SOX13等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックスや、ADPリボシル化因子などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群の中から選択することが好ましい。本発明のグリオーマ検出用診断薬を用いたグリオーマ等の癌の診断方法としては、標識化グリオーマ抗原を用いて検体から得られた血清中のIgG抗体と反応させ、抗体反応が認められるかどうかを調べる方法や、上記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質又はその一

10

20

30

40

50

部に対する蛍光や鉄などの標識化抗体を血中投与することにより、境界が不明瞭なグリオーマ等の癌を画像診断する方法等を例示することができる。

本発明のグリオーマ検出・診断用プローブとしては、前記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質又はその一部をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖を含有する試薬であれば特に制限されるものではなく、例えば、KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6)、SOX6、SOX13等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックスや、ADPリボシル化因子などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群の中から選ばれる1種若しくは2種以上のグリオーマ抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含有する試薬等を具体的に挙げるができるが、20bp以上からなるDNA又はRNAが好ましく、また、2種以上のプローブを組み合わせて用いる場合には、上記KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6)、SOX6、SOX13等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックスや、ADPリボシル化因子などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群から選ばれる1種若しくは2種以上の抗原タンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の中から選択することが好ましい。本発明のグリオーマ検出・診断用プローブを用いたグリオーマの検出・診断方法としては、標識化アンチセンス鎖を用いて検体から得られた上記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質又はその一部のmRNAを検出する方法等が挙げられる。かかる検出・診断方法に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

本発明の抗腫瘍剤としては、前記本発明のグリオーマ抗原タンパク質と同効な免疫誘導活性を有する精巢由来の抗原タンパク質の調製方法により得られる1種若しくは2種以上の抗原タンパク質の全部又は一部を有効成分として含有する製剤を用いることができ、抗原タンパク質の一部としては、グリオーマ抗原の抗原認識部位等を例示することができ、また、2種以上の抗原を組み合わせ用いる場合には、上記KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6)、SOX6、SOX13等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックスや、ADPリボシル化因子などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群の中から選択することが好ましい。また、本発明の抗腫瘍剤としては、前記グリオーマ抗原の全部又は一部に特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の抗体を有効成分として含有する製剤も使用することができ、かかる抗体についても2種以上の抗体を組み合わせ用いる場合には、上記KU-GB-3や、KU-GB-4や、SOX5 (sex determining region Y BOX6)、SOX6、SOX13等のSOXファミリーの分子や、ジンクフィンガーホメオボックスや、ADPリボシル化因子などのグリオーマ特異抗原群、又はMフェーズホスホプロテイン1等のグリオーマ非特異抗原群に対する抗体の中から選択することが好ましい。本発明の抗腫瘍剤を用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら治療薬や生体防御機能増強剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができ、あるいは、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができるが、経口投与の場合は抗腫瘍剤を前述のリボソーム封入・包埋タイプとしておくことが好ましい。そしてまた、本発明のグリオーマ等の癌疾患の治療方法としては、上記抗腫瘍剤を用いる治療方法であれば特に制限されるものではなく、かかる抗腫瘍剤を経口、静脈、皮内、皮下注射等により投与す

10

20

30

40

50

ると、インビボにおけるT細胞誘導活性が増大することによる抗腫瘍効果が期待できる。また、本発明の抗腫瘍剤を用いてT細胞をインビトロで刺激することにより活性化T細胞に誘導することができ、例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球にIL-2とともに本発明の抗腫瘍剤で刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。さらに、本発明のモノクローナル抗体等の抗体を用いて、選択的にグリオーマに遺伝子を導入させる遺伝子治療や、選択的にグリオーマに抗腫瘍剤を作用させるミサイル療法等を行うこともできる。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 (SEREX法による精巣由来のヒトグリオーマ抗原の同定)

10

[細胞株と組織]

ヒトグリオーマ細胞株(GI-1、T98G、U87MG、U251、A172)、ヒト悪性黒色腫細胞株(888MEL)、肺癌細胞株(LU99、EBC1)、食道癌細胞株(TE10)、膵癌細胞株(PK1)、膀胱癌細胞株(KU7)、前立腺癌細胞株(PC3)、乳癌細胞株(MDA231)、白血病細胞株(MOLT4)、線維芽細胞を、それぞれペニシリン(100IU/ml)とストレプトマイシン(100µg/ml)を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMIで培養した。ヒトグリオーマ組織[GB(膠芽腫)13、GB17、GB16、GB4]は、手術時に摘出された病変の一部を用いた。正常組織(脳、心臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胎盤、筋肉、胎児脳)のRNAは全てクローンテック社より購入した。

20

[cDNAライブラリーの構築]

成人ヒト精巣の全RNAをCLONTECH Laboratories, Inc.社より購入した。オリゴデオキシチミジル酸(Oligotex-dT30 super、Takara Shuzo社製)でコーティングしたラテックスビーズを用いて、ポリ(A)⁺RNAを二度精製した。5µgのポリ(A)⁺RNAと、ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene社製)とを用いた逆転写反応により、精巣cDNAライブラリーを構築した。cDNA断片を、バクテリオファージ発現ベクターzapII(Stratagene社製)に挿入したところ、ライブラリーとして3×10⁶の一次組換体を得た。

[血清による精巣cDNAライブラリーのスクリーニング]

30

上記構築したcDNAライブラリーを150mmNZYアガロースプレートに1×10⁴クローンで播き、42℃で4時間培養した後37℃で4時間培養し、大腸菌(XL1-Blue)上で10mMのIPTGにより発現誘導されたりコンビナントタンパクを、ニトロセルロースフィルター(Hybond-c, Amersham, Buckinghamshire, England)に転写し、0.05%のTWIN20を含むTBS(10mMのTris-HCl、150mMのNaCl; pH7.5)でフィルターを洗浄することにより吸着したバクテリアやファージを除去した後、5%のスキムミルクを含むTBSにて非特異反応を抑制した。このフィルターを400倍に希釈した患者血清と37℃で4時間反応させた。なお、患者血清としては、表1に示す12人のグリオーマ患者からそれぞれ採取し、グリオーマ患者血清4人分を混合したもの[(G1, G3, G5, G8患者血清を混合)、(G20, G21, G22, G27患者血清を混合)、(G18, G23, G24, G28患者血清を混合)]を用いた。これらの患者血清は-80℃で保存し、使用直前に5%のスキムミルクを含むTBS溶液で5倍に希釈して、さらにバクテリアに反応する抗体をあらかじめ除去するため、溶菌した大腸菌のライセートと1:2の割合で混合して42℃で8時間反応させた後、その上清を最終的に400倍に希釈したものをを用いた。

40

(表1)

患者血清	年齢	性	診断	単離遺伝子の種類
G1	48	M	膠芽腫	3(新規2種を含む)
G3	53	F	膠芽腫	
G5	61	M	退形成稀突起星細胞腫	
G8	30	M	退形成星細胞腫	
G20	17	F	退形成星細胞腫	8(新規2種を含む)
G21	32	M	星細胞腫	
G22	18	M	退形成星細胞腫	
G27	25	M	星細胞腫	
G18	21	F	膠芽腫	4
G23	3	F	星細胞腫	
G24	7	F	稀突起星細胞腫	
G28	41	M	退形成稀突起星細胞腫	
				合計 15

10

20

30

40

50

かかる処理血清とニトロセルロースフィルターにプロットしたリコンビナントタンパクとを37で4時間反応させ、血清中の抗体が反応したリコンビナントタンパクを、アルカリリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体(Cappel社製)とインキュベーションした。ニトロブルーテトラゾリウム(Boehringer Mannheim社製)及び5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩(Sigma Chemical Co.社製)を用いて、結合した二次抗体を酵素検出した。次いで、発色反応陽性部位に一致する陽性クローンを前記150mmNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液(100mMのNaCl、10mMのMgSO₄、50mMのTris-HCl、0.01%のgelatin; pH7.5)に溶解させた。さらにこのスクリーニングを数回繰り返し行い、陽性クローンの抗体反応性を確認した。患者血清1人あたり5×10⁵個のファージクローンからスクリーニングして、58個の陽性クローンを単離した。

[単離抗原遺伝子の相同性検索]

上記得られた58個のファージに組み込まれたcDNAインサートをExTaqキット(Takara Shuzo社製)を使用したPCR法により増幅し、各塩基配列を決定した。反応酵素にはExTaq(Takara Shuzo社製)を用い、センスプライマーにT3(5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3';配列番号5)、アンチセンスプライマーにT7(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3';配列番号6)を用いた。なお、反応条件は、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)を用いて最初のみ94で5分間変性させ、その後94で1分間熱変性させ、55で1分間アニーリングし、72で2分間伸張反応させるというサイクルを35回繰り返し行い、最後に72で7分間伸張させた。得られたPCR産物を、Big Dye DNA Sequencing Kit(ABI)とABI310オートシーケンサーとを用いてDNAシーケンスを行い、5'側の塩基配列を300~500bp程決定した。この決定したDNAを、米国国立生体工学情報センターの遺伝子データベース又はESTデータベースにおいて登録されている遺伝子情報との間で比較し、既知の遺伝子との相同性を検索した。この結果、上記58個の陽性クローンは、11種類の既知タンパク質をコードするcDNAと4種類の新規タンパク質をコードするcDNAの15種類の抗原cDNAであることがわかった。患者別の15種類の抗原cDNA数を表1に示す。

[血清スクリーニング]

単離された15種類の抗原を発現する各クローン用いて、グリオーマの血清診断への応用

を検討するために、グリオーマ患者29人（膠芽腫12人、退形成星細胞腫7人、退形成稀突起星細胞腫4人、星細胞腫4人、稀突起星細胞腫2人）、他の脳疾患患者14人（悪性リンパ腫2人、脳膿瘍1人、くも膜下出血1人、パーキンソン病2人、髄膜腫4人、神経細胞腫1人、頭蓋咽頭腫1人、転移性脳腫瘍2人）、及び健常人37人の100倍に希釈した各血清を用いてスクリーニングを行い、これら血清中に各単離グリオーマ抗原に対するIgG抗体が検出するかどうかについて調べた。この結果、グリオーマ患者血清とのみ反応を示すか、又は多くのグリオーマ患者血清と反応を示し健常人の血清とはほとんど抗体反応を示さない6種のグリオーマ特異抗原（グリオーマ特異抗原遺伝子）と、グリオーマ患者血清との反応で特異性は認められなかったが、グリオーマ患者血清と反応を示す1種のグリオーマ非特異抗原（グリオーマ非特異抗原遺伝子）を得ることができた。6種のグリオーマ特異抗原（グリオーマ特異抗原遺伝子）は、表2に示されるように、新規なKU-GB-4の他、KU-GB-3、SOX5（sex determining region Y BOX6）、SOX6、ジンクフィンガーホメオボックス、ADPリボシル化因子であった。また1種のグリオーマ非特異抗原（グリオーマ非特異抗原遺伝子）は、表3に示されるように、Mフェーズホスホプロテイン1であった。上記Mフェーズホスホプロテイン1は血清反応では特異性は認められなかったが、6種のグリオーマ特異抗原は、グリオーマ患者血清と特異的に反応することから、グリオーマの血清診断薬や治療薬として有用であると考えられる。

さらに表2に示したように、別に単離したSOX13を発現するクローンを用いて、グリオーマ患者29人（膠芽腫12人、退形成星細胞腫7人、退形成稀突起星細胞腫4人、星細胞腫4人、稀突起星細胞腫2人）の100倍に希釈した各血清を用いてスクリーニングを行い、これら血清中に各単離グリオーマ抗原に対するIgG抗体が検出するかどうかについて調べた結果、SOX5及びSOX6と全く同様の患者血清に対して反応が検出された。SOX13はSOX5、SOX6と同様にSOXファミリーの中のSOX Dグループに属する分子であり、これらSOX Dグループ分子群はグリオーマの血清診断薬や治療薬として有用であると考えられる。

（表2）

遺伝子	GeneBank アクセッション 番号	血清スクリーニング		
		グリオーマ患者	健常人	他の脳疾患患者
KU-GB-3	NM019079	3/29	0/37	0/14
KU-GB-4	なし	3/29	0/37	0/14
SRY (sex determineg region Y)-box6; SOX6	NM033326	8/29	1/37	0/14
SOX5	NM033326	8/29	1/37	0/14
ジンクフィンガー ホメオボックス	NM014795	5/29	0/37	0/14
ADP リボシル化因子	NM001661	1/29	0/37	0/14
SOX13	NM005686	8/29		

（表3）

遺伝子	GeneBank アクセッション 番号	血清スクリーニング		
		グリオーマ患者	健常人	他の脳疾患患者
Mフェーズホスホプロテイン1	NM016195	2/29	2/37	0/14

単離されたクローンの塩基配列を、自動DNAシーケンサー (ALF Express; ファーマシアバイオテック社製) を用いて調べた結果、KU-GB-3は865個のアミノ酸配列 (配列番号2) をコードする遺伝子を含む全長2898bpの塩基配列 (配列番号1) から構成され、KU-GB-4は399個のアミノ酸配列 (配列番号4) をコードする遺伝子を含む全長1748bpの塩基配列 (配列番号3) から構成されていることがわかった。なお、KU-GB-3遺伝子は胎盤由来のcDNAとしてGenBank (アクセッション番号AK001973) に登録されているが、グリオーマ抗原としては知られていなかった。

[グリオーマ抗原の発現を検出するためのRT-PCR法]

次にグリオーマ抗原KU-GB-3、KU-GB-4、SOX5、SOX6、ジンクフィンガーホメオボックス、Mフェーズホスホプロテイン1遺伝子の各正常組織、グリオーマ細胞株及び組織並びに他の腫瘍細胞株における発現特異性をRT-PCR法により調べてみた。脳、心臓、肺、胃、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胎盤、筋肉、胎児脳等の正常組織由来のRNA (全てクローンテック社製より購入)、4種のグリオーマ組織 (GB13、GB17、GB16、GB4) 由来のRNA、4種のグリオーマ細胞株 (GI-1、U87MG、T98G、U251、A172) 由来のRNA、培養した線維芽細胞由来のRNAを、各5µgずつ使用し、トリ骨髄芽球ウイルス逆転写酵素 (TAKARA社製) と、プライマーとしてオリゴ (dT) を用いて、全反応量200µl、42℃でRT-PCRの鑄型となるcDNAのパネルを作製した。また、KU-GB-4遺伝子の発現を検出するためのRT-PCR法においては、各5µgの悪性黒色腫細胞株 (888MEL) 、肺癌細胞株 (LU99、EBC1) 、食道癌細胞株 (TE10) 、膵癌細胞株 (PK1) 、膀胱癌細胞株 (KU7) 、前立腺癌 (PC3) 、乳癌 (MDA231) 及び白血病細胞株 (MOLT4) のRNAを用いた。

KU-GB-3検出用には、センスプライマーとして (5' - TCAAGGAACCTGGCATA CCTGTCT - 3' ; 配列番号7 : P1) を、アンチセンスプライマーとして (5' - GGTA CT CGACAAGCACTGACAATC - 3' ; 配列番号8 : P2) を、KU-GB-4検出用には、センスプライマー (5' - CAAACTCTGGGAGGAAGACC - 3' ; 配列番号9 : P3) 、アンチセンスプライマー (5' - AGTTGGCTGAGAAGGACAAG - 3' ; 配列番号10 : P4) を、SOX5検出用には、センスプライマー (5' - GCAACAGGAGGAAGGA AAT - 3' ; 配列番号11 : P5) 、アンチセンスプライマー (5' - GACAAGCCAACTGATAAGGGTC - 3' ; 配列番号12 : P6) を、SOX6検出用には、センスプライマー (5' - CGCGCTTTGAGAATTTGGGGCC - 3' ; 配列番号13 : P7) 、アンチセンスプライマー (5' - TCTTTGTTGGGGAGGGGGGTGA - 3' ; 配列番号14 : P8) を、ジンクフィンガーホメオボックス検出用には、センスプライマー (5' - TGGAGATCACTCCATGGACGATAG - 3' ; 配列番号15 : P9) 、アンチセンスプライマー (5' - CCTGTTCTTTGAAGCACCCATGT - 3' ; 配列番号16 : P10) を、Mフェーズホスホプロテイン1検出用には、センスプライマー (5' - AACGAGCCAAACGGAA - 3' ; 配列番号17 : P11) 、アンチセンスプライマー (5' - GTATCCATCCCTCAAGC - 3' ; 配列番号18 : P12) を用いた。コントロールとしてのアクチン検出用 (551bp) には、センスプライマーとして (5' - GTCGACAACGGCTCCGGCAATGTGCA - 3' ; 配列番号19 : P13) とアンチセンスプライマー (5' - GGATCTTCAATGAGGTAGTCAAGTCAAG - 3' ; 配列番号20 : P14) を用いた。これらのPCRプライマーを用い、反応酵素にEXTaq (TAKARA社製) を使用して、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) を用いて、94℃で1分間熱変性させ、アニーリングの後に72℃で30秒間伸張反応させるというサイクルで30サイクル (KU-GB-3の場合は28サイクル) 繰り返し行った。アニーリング温度はプライマーのTm値 [KU-GB-3は59℃、KU-GB-4は62℃、SOX5は63℃、SOX6は61℃、ジンクフィンガーホメオボックスは62℃、Mフェーズホスホ

プロテイン 1 は 6 2 、コントロールとしての アクチンは 6 8] に設定し 3 0 秒間行った。得られた P C R 産物をアガロースゲル電気泳動 (2 . 0 %) につけ、エチジウムブロマイド (E t B r) で染色し、254nm の紫外線照射によりバンドを検出した。

上記の結果を、図 1 (K U - G B - 3)、図 2 (K U - G B - 4)、図 3 (S O X 5)、図 4 (S O X 6)、図 5 (ジンクフィンガーホメオボックス)、図 6 (M フェーズホスホプロテイン 1) にそれぞれ示すが、基本的にいずれも精巣において強い発現が認められた。K U - G B - 3 の R T - P C R では、肺、G B 1 7、G B 1 6 における発現、及び膵臓、G B 4、及び T 9 8 G における弱い発現が認められ (図 1)、K U - G B - 4 の R T - P C R では、L U 9 9 (肺癌細胞株)、E B C 1 (肺癌細胞株)、K U 7 (膀胱癌細胞株)、P C 3 (前立腺癌細胞株)、M D A 2 3 1 (乳癌細胞株) などにおいて弱い発現が認められた (図 2)。S O X 5 の R T - P C R では、G B 1 3、G B 4、胎児脳において強い発現が認められ、脳、G B 1 6、U 2 5 1 における発現、及び膵臓、G B 1 7 における弱い発現が認められた (図 3)。S O X 6 の R T - P C R では、G B 1 3 及び G B 1 7 において強い発現が認められ、G B 4 において弱い発現が認められた (図 4)。ジンクフィンガーホメオボックスの R T - P C R では、肺、G B 1 7、G I - 1 において強い発現が認められ、筋肉、G B 1 3、G B 1 6、G B 4、U 8 7 M G、T 9 8 G、U 2 5 1 における発現、及び膵臓、腎臓、胎盤における弱い発現が認められた (図 5)。M フェーズホスホプロテイン 1 の R T - P C R では、G I - 1、U 2 5 1 において強い発現が認められた (図 6)。

10

上記の結果から、K U - G B - 3、K U - G B - 4、S O X 5、S O X 6、ジンクフィンガーホメオボックス、M フェーズホスホプロテイン 1 の遺伝子は、グリオーマを含む癌の遺伝子診断薬や治療薬として有用であることがわかった。なお、精巣における発現については、免疫系から隔離された組織であることから、K U - G B - 3、K U - G B - 4、S O X 5、S O X 6、ジンクフィンガーホメオボックス、M フェーズホスホプロテイン 1 抗原を実際に免疫療法等に用いる際に精巣の障害が問題となる可能性は殆どないと考えられる。

20

実施例 2 (精巣由来のヒトグリオーマ抗原 S O X 6 の特性)

S E R E X 法により精巣由来のヒトグリオーマ抗原として同定された S O X 6 の特性についてより詳細に調べてみた。

[組換え S O X 6 H M G ボックスタンパク質の調製]

30

S O X 6 H M G ボックスの c D N A を p E T 3 2 a プラスミド (N o v a g e n 社製) にサブクローニングし、かかるタンパク質を、大腸菌である B L 2 1 (D E 3) L y s S (N o v a g e n 社製) で発現させた。アフィニティ - H i s である H i T r a p C h e l l a t i n g (A m e r s h a m P h a r m a c i a 社製) を使用して、組換え S O X 6 を精製した。

[S O X 6 H M G ボックスに対する血清反応を評価するためのウェスタンブロット]

精製した組換え S O X 6 H M G ボックスと、2 % の S D S、1 0 % の β -メルカプトエタノール、1 0 % のグリセロール、1 m M の E D T A、4 0 m M の T r i s 及び 2 4 0 m M のグリシンから成る同量のドデシル硫酸ナトリウム (S D S) - サンプル緩衝液を p H 8 . 5 で混合し、3 分間煮沸した。同量の全タンパク質 (1 0 μ g) を、S D S - ポリアクリルアミドゲル (1 0 %) の各レーンに添加した。電気泳動を行った後、電気ブロッティング (e l e c t r o b l o t t i n g) により、かかるゲルをニトロセルロースシート (H y b o n d C ⁺ ; A m e r s h a m P h a r m a c i a 社製) に移した。5 % のスキムミルクで 2 時間ブロッティングした後、かかるシートをグリオーマ患者から得た 1 : 1 0 0 に希釈した血清を用いて、室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄処理後、かかるブロットを、1 : 2 0 0 0 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト I g G (F c) 抗体 (C a p p e l 社製) とインキュベーションした。結合した二次抗体を酵素検出するため、ニトロブルーテトラゾリウム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m 社製) 及び 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸塩 (S i g m a C h e m i c a l C o . 社製) を使用した。

40

50

[S O X 6 H M G ボックスに対する血清反応を調べるための E L I S A]

1 ウェル当たり 100 ng の精製した組換え S O X 6 H M G ボックスを、96 ウェルのプレートで一晩吸収させた。対照として用いるウェルを、精製した組換えタンパク質 p E T 3 2 a プラスミドでコーティングした。ウェルを 2% の B S A / P B S で洗浄及びブロッキングを行った後、100 μ l の希釈したヒト血清を添加し、4 で 1 時間インキュベーションした。血清を、1 : 100 から 1 : 50, 000 の範囲の希釈で検査した。ウェルをヒト I g G に対するパーオキシダーゼ結合抗体で 1 時間洗浄及びインキュベーションした。その後、T M B 基質 (D a k o 社製) と反応させ、450 nm の吸光度で測定した。

[定量的 R T - P C R 及びノーザンプロット]

蛍光色素である S Y B R グリーンを使用し、A B I p r i s m 7700 S e q u e n c e D e t e c t i o n S y s t e m (P e r k i n - E l m e r 社製) を用いて、文献記載の方法 (N a t . M e d . 4 , 1329 - 1333 , 1998) で定量的 R T - P C R 分析を行った。サーマルサイクラーのパラメータは、95 では 10 分間であり、また、95 で 30 秒間の変性を 50 サイクル、60 で 1 分間のアニーリング及び 72 で 1 分間の伸長であった。S O X 6 の相対発現量は、以下の手順に従って計算した。すなわち、各組織の β -アクトンを標準化とし、各サンプルの (C_T) (t h r e s h o l d c y c l e v a l u e) を正常な脳の C_T 値によって割ることにより算出した。C_T 値は蛍光シグナルがバックグラウンド閾値以上に増加するとき、実際の P C R サイクルとして定義され、それは標的遺伝子のコピー数を示す。

ノーザンプロット法を行うため、10 μ g の全 R N A を 1% のホルムアルデヒドアガロースゲル内で電気泳動を行って分画し、ナイロン膜 (H y b o n d - X L ; A m e r s h a m P h a r m a c i a 社製) に移した。H i g h P r i m e D N A L a b e l i n g K i t (B o e h r i n g e r M a n n h e i m 社製) を用いて、放射性同位体で標識した c D N A 断片を調製した。Q u i c k H y b 溶液 (S t r a t a g e n e 社製) を用いて、65 で 30 分間の前ハイブリダイゼーションを行い、プローブを用いたハイブリダイゼーションを 65 で一晩行った。かかる膜に対して、0.1% の S D S 中の 2 x S S C を用いて、室温で 15 分間、2 度の洗浄処理を行った。次に、0.1 x S S C 及び 0.1% の S D S 内で、60 で 30 分間、さらに洗浄処理をした。放射性シグナルは、B A S 5000 (B i o - R a d 社製) を用いて検出した。

[293T 細胞への S O X 6 の感染]

完全長 S O X 6 c D N A を、哺乳類発現ベクターである p c D N A 3 m y c (I n v i t r o g e n 社製) にサブクローニングした。293T 細胞株に、リポフェクタミン P L U S 試薬 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社製) を用いて、線状化した c D N A を遺伝子導入した。

[核抽出物の単離]

C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s , I n c . より購入した正常脳組織、グリオーマ組織及び 293T 細胞を、0.25 M のスクロース中で均質化し、10 分間遠心分離機にかけた。プロテアーゼ阻害剤カクテル (S i g m a A l d r i c h 社製) を補充した 0.25 M のスクロース内に、ペレットを再び懸濁した。

[ポリクローナル抗体]

ヒト S O X 6 のペプチド (アミノ酸 349 残基 ~ 364 残基) を認識するウサギ抗 S O X 6 アフィニティー精製ポリクローナル抗体を、C H E M I C O N I n t e r n a t i o n a l , I n c . より購入した。

[S O X 6 の発現を確認するためのウェスタンプロット及びブロッキング]

グリオーマ及び正常脳における S O X 6 の発現について、上記のアッセイを用いて調べた。20 μ g の全タンパク質を各レーンに添加した。第 1 の抗体は、ウサギ抗ヒト S O X 6 アフィニティー精製ポリクローナル抗体 (10 μ g / m l) であり、第 2 の抗体は、1 : 2000 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ I g G (F c) (C a p p e l 社製) であった。ブロッキング実験のため、希釈した S O X 6 ポリクローナル抗体 (10 μ g / m l) を、1% の P B S 、 0.5% のスキムミルク中で 20 μ g / m l の最

終濃度でSOX6を発現する293T細胞でインキュベーションし、その後、上記の通りウェスタンブロットを行った。

[免疫組織化学染色]

腫瘍サンプル及び正常脳組織を10%のホルマリン中で固定し、免疫組織化学分析のためにパラフィン包埋した。切り取った切片(5µm)をポリリジンでコーティングした顕微鏡スライド上に載せた。載せた組織切片のパラフィンをキシレンで取り除き(deparaffinized)、再び水和させた。文献記載の通り、抗原を賦活化した(J. Pathol. 183, 116-123, 1997)。メタノール中の0.3%の過酸過水素でインキュベーションして、内因性過酸化水素をブロックし、次にリン酸緩衝食塩水(PBS)中で洗浄処理を行った。5%のBSAを含む0.02MのPBS及び0.1% Triton X-100を含むPBSで1時間インキュベーションすることにより、抗体の非特異的結合をブロックした。その後、かかるスライドを、同じブロッキング溶液中で希釈した抗ヒトSOX6ウサギポリクローナル抗体(1µg/ml)を用いて、4℃で一晩インキュベーションした。スライドを第2の抗体(Universal Immunoperoxidase Polymer、抗ウサギ抗体; Histofine Simple Stain MAX PO(R)、NICHIREI CORPORATION社製)で、37℃で30分間インキュベーションし、DABを用いてHRP標識を可視化した。これらの切片を、ヘマトキシリンで軽く対比染色した。各工程の後で、PBS中で3回洗浄処理を行った。

10

腫瘍の増殖活性度を評価するため、切片をモノクローナル抗体であるMIB-1で染色した。pH7の10mMのクエン酸緩衝液中のワックスを取り除き再び水和させた切片を、600ワットの電子レンジで4分間、5回処理した。3%のウマ血清を含む5%のウシ血清アルブミンを用いて、室温で1時間の処理を行った後、切片をMIB-1(1:50に希釈、Immunotech社製)で一晩、4℃でインキュベーションした。DABを用いたアビジン-ビオチン複合手法(complex technique)により、1次抗体を可視化した。切片を、ヘマトキシリンで軽く対比染色した。免疫陽性の核を最も多く発現した3つ以上の領域の1000個以上の腫瘍細胞を用いて、増殖細胞指数を分析した。かかる分析は、コンピュータでアシストされた画像分析機(Luzex, F, Nir eco社製)を用いて行った。

20

[SOX6に特異的なIgG抗体の存在を調べるための健常者、グリオーマ患者及び各種癌患者由来の血清の分析]

30

各種患者に対してSEREX法を用いた血清スクリーニングを行い、SOX6に応答する抗体の特異性及び関連性を確認した。年齢20~78歳の、グリオーマ患者36人、他の脳疾患患者14人、各種癌患者54人及び健常人37人から得た血清を100倍に希釈して、SOX6に特異的なIgG抗体のスクリーニングに用いた。SOX6の転写産物は、36人のグリオーマ患者のうち12人(33.3%)において血清応答を誘導した。しかしSOX6の転写産物は、14人の他の脳疾患患者のうち0人(0%)及び54人の他の癌患者のうち1人(1.9%)でしか血清応答を誘導しなかった。成人健常人37人から得た血清では、1人を除いて前記タンパク質に対する抗体は検出されなかった(表4)。

(表4)

40

血清	陽性反応
グリオーマ	12/36 (33.3%)
他の脳疾患	0/14 (0%)
黒色腫	0/10 (0%)
食道ガン	0/10 (0%)
肺癌	1/10 (10%)
膀胱癌	0/10 (0%)
結腸直腸癌	0/7 (0%)
腎臓の細胞癌	0/7 (0%)
健常人	1/37 (2.7%)

50

[S O X 6 タンパク質の免疫原性エピトープ]

S O X 6 の D N A 結合部位である保存された H M G ボックスドメインがグリオーマ患者血清由来の I g G によって認識される可能性があることが示唆されたので、S O X 6 の H M G ボックスをコードする配列を p E T 3 2 a ベクター中でサブクローニングを行い、H i s タグ化された組換えタンパク質を調製した。まず、S O X 6 の H M G ボックスに対する血清反応性をウェスタンブロット法で調べた。S E R E X 法でもって S O X 6 に対する血清反応が陽性であったグリオーマ患者 8 人のうち 3 人から得た血清中の I g G は、組換えにより発現した H M G ボックスに対応する 3 0 k D a タンパク質を検出した (図 7)。予測される免疫原性エピトープをさらに定量的に確認するために、S O X 6 H M G ボックスタンパク質に対する血清学的反応を E L I S A 法で調べた。その結果、H i s に対する血清学的反応性は、健常人においても S O X 6 に対する抗体を有するグリオーマ患者においてもほとんど観察されなかった。一方、血清抗体の S O X 6 の H M G ボックスに対する反応性については、ウェスタンブロット法による結果と同様に、健常人と前記グリオーマ患者との間では有意な差が観察された (図 8)。

10

[R T - P C R 及びノーザンブロットを用いたグリオーマ組織及び正常組織中の S O X 6 遺伝子発現の分析]

グリオーマ組織及び健常成人組織における S O X 6 遺伝子発現量を調べるために、S Y B R G r e e n を用いる定量的 R T - P C R 分析によって、グリオーマと健常成人脳との間の S O X 6 遺伝子発現に関する違いを評価した。健常成人脳と比較して分析を行った全てのグリオーマ組織において、S O X 6 が著しく多量に発現した (図 9)。

20

これまでに、長短 2 つの転写物が、マウス S o x 6 遺伝子 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 9 7 , 4 1 8 0 - 4 1 8 5 , 2 0 0 0 ; E m b o . J . 1 7 , 5 7 1 8 - 5 7 3 3 , 1 9 9 8) 及びヒト S O X 6 遺伝子 (G e n e 2 6 5 , 1 5 7 - 1 6 4 , 2 0 0 1) から検出されることが報告されている。かかる転写物の長さの違いは、3 ' 末端の非翻訳領域及び 5 ' 末端の非翻訳領域の両方の大きさが異なることにより生じるようである (E m b o . J . 1 7 , 5 7 1 8 - 5 7 3 3 , 1 9 9 8)。短い転写物は成人精巣において特異的に発現し、長い転写物はマウス脳 (N u c l e i c A c i d s R e s . 2 3 , 3 3 6 5 - 3 3 7 2 , 1 9 9 5) や軟骨細胞 (E m b o . J . 1 7 , 5 7 1 8 - 5 7 3 3 , 1 9 9 8) の発達時に発現するが、該転写物は成人のかかる組織では消滅している。

30

どの転写物がグリオーマ中で発現するかを調べるため、ノーザンブロット法によりヒトグリオーマ中の S O X 6 m R N A の発現を調べた (図 1 0)。S O X 6 の長い転写物は、ヒト胎児脳において発現するが、成人の脳では発現しなかった。短い転写物は、主に精巣で発現した。グリオーマ組織において、長い転写物は、非常に多量に発現していた。結論的には、S O X 6 遺伝子は、ヒト神経発達の初期段階において発現し、成人精巣及びグリオーマにおいては選択的に発現していた。

[グリオーマにおける S O X 6 タンパク質の選択的発現]

ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法で、S O X 6 タンパク質の発現を評価した。該抗体は、S O X 6 c D N A を感染させた 2 9 3 T 細胞において S O X 6 タンパク質の 9 0 k D a のバンドを検出した。一方、該抗体は、S O X c D N A を感染させていない 2 9 3 T 細胞においてかかるバンドを検出しなかった (図 1 1 左)。S O X 6 タンパク質はグリオーマにおいて発現していたが、健常な脳組織において発現しなかった。このようなグリオーマにおける S O X 6 タンパク質の選択的発現は、定量 R T - P C R 法及びノーザンブロット法によって得られた結果と一致していた。

40

S O X 6 を発現する 2 9 3 T 細胞と上記ポリクローナル抗体と共にインキュベーションすることにより、この抗体の特異性を確認した。免疫ブロット法における 9 0 k D a シグナルがこのポリクローナル抗体を用いたブロッキング実験において消失している (図 1 1 右) が、このことは前記抗体が S O X 6 を特異的に認識することを示している。

[グリオーマにおける S O X 6 の免疫組織化学的分析]

S O X 6 に対する抗体を用いて、ホルマリンで固定した腫瘍から切片化した試料を分析し

50

、またMIB抗原を用いて増殖活性を評価した。分析した18種類のグリオーマ組織全てが核腫瘍細胞中でSOX6を発現していた。一方、大脳皮質由来の非腫瘍性組織において、SOX6陽性の細胞は検出されなかった(図12及び表5)。図12には、大脳皮質由来の非腫瘍性組織(図12A)、びまん性星細胞腫(ケースOA4;図12B)、退形成星細胞腫(ケースAA1;図12C)、膠芽腫(ケースGB4;図12D)の各組織におけるSOX6発現の免疫組織化学的分析の結果が示されている。

グリオーマにおける組織的悪性腫瘍、増殖及び血清反応性とSOX6発現との相互関連が表5としてまとめられている。SOX6に対するIgG抗体を有する患者から得た全ての腫瘍組織において、SOX6の発現が確認された。さらに、グリオーマにおけるSOX6の発現と増殖活性との関連性の可能性を評価したが、両者の間に明確な関連性はみられなかった。

(表5)

ケースNo.	組織学	年齢	性別	SEREX ^a	MIB-1 ^b	免疫組織化学 ^c
〈WHOグレードIV〉						
GB1	膠芽腫	25	F	+	41.1	+++
GB2	膠芽腫	31	M	+	12.7	+++
GB3	膠芽腫	7	M	+	17.7	+++
GB4	膠芽腫	50	M	NA	14.5	+++
GB5	膠芽腫	34	F	+	0.9	+++
GB6	膠芽腫	41	F	+	0.8	+++
GB7	膠芽腫	21	F	+	2.1	++
GB8	膠芽腫	14	M	+	28.1	+
〈WHOグレードIII〉						
AA1	退形成星細胞腫	28	M	+	4.5	+++
AA2	退形成星細胞腫	26	M	-	5.2	++
AA3	退形成星細胞腫	36	M	-	1.2	++
AA4	退形成星細胞腫	30	F	+	2.3	+
AA5	退形成星細胞腫	37	F	+	1.5	+
AA6	退形成星細胞腫	32	F	+	NA	NA
OA1	オリゴアストロサイトマ(グレード III)	31	M	-	15.1	+++
OA2	オリゴアストロサイトマ(グレード III)	41	M	-	5.2	+++
OA3	オリゴアストロサイトマ(グレード III)	51	M	-	6.8	+
〈WHOグレードII〉						
DA1	びまん性星細胞腫	3	F	-	2.7	+
OA4	オリゴアストロサイトマ(グレード II)	7	F	+	NA	++

a SEREXによるSOX6の血清反応は陽性を+、陰性を-と表示する。

b 増殖細胞指数は、MIB-1陽性核をもっとも多く発現する3つ以上の領域で合計1000以上の腫瘍細胞において分析された。

c 染色のパターンは陰性又はかすかな染色を-、腫瘍細胞の30%未満の染色を+、腫瘍細胞の30%以上70%未満の染色を++、腫瘍細胞の70%以上の染色を+++と表した。

NAは適用不可、Mは男性、Fは女性を表す。

上記実施例から、33%以上のグリオーマ患者において免疫反応を引き起こす新規のグリオーマ発現抗原としてSOX6を明らかにした。SOX6タンパク質に対する高頻度の免疫応答はSOX6遺伝子の高発現によって生起すると思われる。さらに、SOX6は正常組織での発現は限定されるが、グリオーマ組織において主に発現する。以上の結果により

、S O X 6 がグリオーマの診断手段及び治療の開発における有用な標的となりうることが示された。

産業上の利用可能性

本発明の精巢由来のグリオーマ抗原及び/又はグリオーマ抗原遺伝子は、グリオーマ等の癌に対する治療や診断に有用であり、またグリオーマ発症に関する基礎的知見を得る上でも有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERCITY

<120> Novel human glioma antigens from testis

<130> P10000246

<140>

10

<141>

<150> JP P2001-367960

<151> 2001-11-30

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 2898

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (251)..(2848)

30

<400> 1

actttgttcg ctcctcagtc gtccaggcgg atccctttt cgccaggcac caaggcacag 60

cttagagiag acccgagtec tgctctgagg agtctgctt cccagcgaag gtacagaggc 120

ggaalgaactg ctgagacttg attgacgtat ttaagattt ttttaacttc tgaagtctag 180

caggccctgla agaacaaaaa tcattctgla ggaattaaaa acagaateca gtcttgacaa 240

40

cataccaca atg tct gat gta tct act agl gla caa tca aaa ttt gct 289

Met Ser Asp Val Ser Thr Ser Val Gln Ser Lys Phe Ala

1	5	10		
aga ctt gca aag aaa aag gaa aat atc acc tat atg aaa aga gag cag			337	
Arg Leu Ala Lys Lys Lys Glu Asn Ile Thr Tyr Met Lys Arg Glu Gln				
15	20	25		
tta aca gaa act gat aag gac ata gct ccg gta tta gat tta aaa tgc			385	
Leu Thr Glu Thr Asp Lys Asp Ile Ala Pro Val Leu Asp Leu Lys Cys				
30	35	40		10
aag gac gta tca gca att atg aat aag ttt aag gtc tta atg gaa att			433	
Lys Asp Val Ser Ala Ile Met Asn Lys Phe Lys Val Leu Met Glu Ile				
50	55	60		
caa gac ctg atg ttt gag gag atg agg gaa act ctt aaa aat gac cta			481	
Gln Asp Leu Met Phe Glu Glu Met Arg Glu Thr Leu Lys Asn Asp Leu				
65	70	75		20
aaa gca gtt tta gga gga aaa gct aca ata cct gag gta aag aat tca			529	
Lys Ala Val Leu Gly Gly Lys Ala Thr Ile Pro Glu Val Lys Asn Ser				
80	85	90		
gag aac tcc agt agt agg aca gag ttt cag caa ata atc aat tta gca			577	
Glu Asn Ser Ser Ser Arg Thr Glu Phe Gln Gln Ile Ile Asn Leu Ala				
95	100	105		
tta caa aaa aca ggg atg gta ggg aaa ata gaa gga gaa aac tct aaa			625	
Leu Gln Lys Thr Gly Met Val Gly Lys Ile Glu Gly Glu Asn Ser Lys				
110	115	120		30
ata ggt gat gat aat gaa aat tta acc ttt aaa tta gaa gta aat gag			673	
Ile Gly Asp Asp Asn Glu Asn Leu Thr Phe Lys Leu Glu Val Asn Glu				
130	135	140		
ctg agt ggt aaa tta gac aac act aac gaa tac aat agt aat gat ggt			721	
Leu Ser Gly Lys Leu Asp Asn Thr Asn Glu Tyr Asn Ser Asn Asp Gly				
145	150	155		40

aag aaa tta ccc cag ggt gaa tca cga agt tac gaa gtc atg gga agt	769	
Lys Lys Leu Pro Gln Gly Glu Ser Arg Ser Tyr Glu Val Met Gly Ser		
160	165	170
atg gaa gaa acc tta tgc aat ata gat gac aga gat gga aat cgc aat	817	
Met Glu Glu Thr Leu Cys Asn Ile Asp Asp Arg Asp Gly Asn Arg Asn		
175	180	185
gtc cat tta gaa ttt aca gaa aga gag agt agg aag gat gga gag gat	865	10
Val His Leu Glu Phe Thr Glu Arg Glu Ser Arg Lys Asp Gly Glu Asp		
190	195	200
gaa ttt gtc aaa gaa atg aga gag gaa aga aaa ttt cag aaa ttg aag	913	
Glu Phe Val Lys Glu Met Arg Glu Glu Arg Lys Phe Gln Lys Leu Lys		
210	215	220
aat aaa gag gag gtt tta aaa gcc tcc aga gaa gaa aaa gtg ttg atg	961	20
Asn Lys Glu Glu Val Leu Lys Ala Ser Arg Glu Glu Lys Val Leu Met		
225	230	235
gat gaa gga gca gta ctt acc ctg gta gcc gac ctt tca tca gca aca	1009	
Asp Glu Gly Ala Val Leu Thr Leu Val Ala Asp Leu Ser Ser Ala Thr		
240	245	250
ctg gat att agt aag caa tgg agt aat gtc ttc aac att ctg aga gaa	1057	
Leu Asp Ile Ser Lys Gln Trp Ser Asn Val Phe Asn Ile Leu Arg Glu		30
255	260	265
aat gat ttt gaa cct aaa ttt ctg tgt gaa gtt aaa tta gca ttt aaa	1105	
Asn Asp Phe Glu Pro Lys Phe Leu Cys Glu Val Lys Leu Ala Phe Lys		
270	275	280
tgt gat ggt gaa ala aag aca ttt tca gat ctg caa agc ctt aga aaa	1153	
Cys Asp Gly Glu Ile Lys Thr Phe Ser Asp Leu Gln Ser Leu Arg Lys		40
290	295	300
ttt gcc agc caa aaa tct tct gtg aaa gaa tta ctg aaa gat gta ctc	1201	
Phe Ala Ser Gln Lys Ser Ser Val Lys Glu Leu Leu Lys Asp Val Leu		

305	310	315		
cca caa aag gaa gaa ata aat caa gga gga aga aaa tai gga att caa			1249	
Pro Gln Lys Glu Glu Ile Asn Gln Gly Gly Arg Lys Tyr Gly Ile Gln				
320	325	330		
gaa aaa agg gat aaa acc cta ata gac tca aag cat aga gct gga gaa			1297	
Glu Lys Arg Asp Lys Thr Leu Ile Asp Ser Lys His Arg Ala Gly Glu				
335	340	345		10
ata acc agt gat ggc ttg agc ttc cta ttt ctt aaa gaa gta aaa gtt			1345	
Ile Thr Ser Asp Gly Leu Ser Phe Leu Phe Leu Lys Glu Val Lys Val				
350	355	360	365	
gct aag cca gag gag atg aaa aac tta gag act caa gag gaa gag ttt			1393	
Ala Lys Pro Glu Glu Met Lys Asn Leu Glu Thr Gln Glu Glu Glu Phe				
370	375	380		20
tcc gag cta gag gag ctg gat gaa gag gcc tca ggg atg gag gat gat			1441	
Ser Glu Leu Glu Glu Leu Asp Glu Glu Ala Ser Gly Met Glu Asp Asp				
385	390	395		
gaa gat acc tca ggg ctg gag gag gag gag gaa gag ecc tca ggg ctg			1489	
Glu Asp Thr Ser Gly Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ser Gly Leu				
400	405	410		
gag gag gaa gaa gaa gaa gag gct tca ggg ttg gag gag gat gag gcc			1537	
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ser Gly Leu Glu Glu Asp Glu Ala				
415	420	425		30
tca ggg cta gag gag gaa gag gaa cag act tca gaa cag gac tca acc			1585	
Ser Gly Leu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Thr Ser Glu Gln Asp Ser Thr				
430	435	440	445	
ttt cag ggt cat act ttg gta gat gca aag cat gaa gtt gag ata acc			1633	
Phe Gln Gly His Thr Leu Val Asp Ala Lys His Glu Val Glu Ile Thr				
450	455	460		40

agt gat ggc atg gaa act act ttc att gac tct gta gag gat tct gaa	1681	
Ser Asp Gly Met Glu Thr Thr Phe Ile Asp Ser Val Glu Asp Ser Glu		
465 470 475		
tca gag gag gaa gaa gaa gga aag agc tct gaa aca gga aag gta aag	1729	
Ser Glu Glu Glu Glu Glu Gly Lys Ser Ser Glu Thr Gly Lys Val Lys		
480 485 490		
act acc tcc ctg act gag aaa aaa gcc tca cgt aga caa aag gaa att	1777	10
Thr Thr Ser Leu Thr Glu Lys Lys Ala Ser Arg Arg Gln Lys Glu Ile		
495 500 505		
ccc ttt agt tat ttg gtt ggg gac tct ggg aag aaa aag ttg gtg aaa	1825	
Pro Phe Ser Tyr Leu Val Gly Asp Ser Gly Lys Lys Lys Leu Val Lys		
510 515 520 525		
cac cag gtg gtg cac aaa acc cag gag gaa gag gaa aca gct gtg ccc	1873	20
His Gln Val Val His Lys Thr Gln Glu Glu Glu Glu Thr Ala Val Pro		
530 535 540		
aca agt caa gga act ggc ata ccc tgt ctg acc tta tgt ttg gcc tct	1921	
Thr Ser Gln Gly Thr Gly Ile Pro Cys Leu Thr Leu Cys Leu Ala Ser		
545 550 555		
ccc tca aag tca cta gag atg agt cat gat gag cat aaa aag cat tca	1969	30
Pro Ser Lys Ser Leu Glu Met Ser His Asp Glu His Lys Lys His Ser		
560 565 570		
cat aca aat ttg agt att tca aca gga gtc acc aaa ctt aag aaa aca	2017	
His Thr Asn Leu Ser Ile Ser Thr Gly Val Thr Lys Leu Lys Lys Thr		
575 580 585		
gaa gaa aag aaa cac aga act ctg cac aca gaa gaa cta aca tcc aaa	2065	40
Glu Glu Lys Lys His Arg Thr Leu His Thr Glu Glu Leu Thr Ser Lys		
590 595 600 605		
gaa gca gac tta aca gag gaa aca gaa gaa aac ttg aga agt agt gtg	2113	
Glu Ala Asp Leu Thr Glu Glu Thr Glu Glu Asn Leu Arg Ser Ser Val		

610	615	620		
att aat agc atc aga gag ata aaa gag gag att gga aat ttg aaa agt			2161	
Ile Asn Ser Ile Arg Glu Ile Lys Glu Glu Ile Gly Asn Leu Lys Ser				
625	630	635		
tcc cat tca ggt gtc ttg gaa att gaa aat tca gta gat gat ctg agt			2209	
Ser His Ser Gly Val Leu Glu Ile Glu Asn Ser Val Asp Asp Leu Ser				
640	645	650		10
agc aga atg gac ala ctt gaa gaa aga ata gac agt cta gaa gat caa			2257	
Ser Arg Met Asp Ile Leu Glu Glu Arg Ile Asp Ser Leu Glu Asp Gln				
655	660	665		
att gaa gaa ttc tct aag gat aca atg caa atg acc aaa cag ata att			2305	
Ile Glu Glu Phe Ser Lys Asp Thr Met Gln Met Thr Lys Gln Ile Ile				
670	675	680	685	20
agt aaa gaa agg caa aga gat ata gag gag aga tct aga agt tgc aac			2353	
Ser Lys Glu Arg Gln Arg Asp Ile Glu Glu Arg Ser Arg Ser Cys Asn				
690	695	700		
att cgt ttg ata gga att cca gaa aag gag agt tat gag aat agg gca			2401	
Ile Arg Leu Ile Gly Ile Pro Glu Lys Glu Ser Tyr Glu Asn Arg Ala				
705	710	715		
gag gac ata att aaa gaa ata att gat gaa aac ttt gca gaa cta aag			2449	
Glu Asp Ile Ile Lys Glu Ile Ile Asp Glu Asn Phe Ala Glu Leu Lys				
720	725	730		30
aaa ggt tca agt ctt gag att gtc agt gct tgt cga gta cct agt aaa			2497	
Lys Gly Ser Ser Leu Glu Ile Val Ser Ala Cys Arg Val Pro Ser Lys				
735	740	745		
att gat gaa aag aga ctg act cct aga cac atc ttg gtg aaa ttt tgg			2545	
Ile Asp Glu Lys Arg Leu Thr Pro Arg His Ile Leu Val Lys Phe Trp				
750	755	760	765	40

aat tct agt gat aaa gag aaa ata ata agg gct tct aga gag aga aga	2593	
Asn Ser Ser Asp Lys Glu Lys Ile Ile Arg Ala Ser Arg Glu Arg Arg		
770 775 780		
gaa att acc tac caa gga aca aga atc agg ttg aca gca gac tta tca	2641	
Glu Ile Thr Tyr Gln Gly Thr Arg Ile Arg Leu Thr Ala Asp Leu Ser		
785 790 795		
ctg gac aca ctg gat gct aga agt aaa tgg agc aat gtc ttc aaa gtt	2689	10
Leu Asp Thr Leu Asp Ala Arg Ser Lys Trp Ser Asn Val Phe Lys Val		
800 805 810		
ctg ctg gaa aaa ggc ttt aat cct aga atc cta tat cca gcc aaa atg	2737	
Leu Leu Glu Lys Gly Phe Asn Pro Arg Ile Leu Tyr Pro Ala Lys Met		
815 820 825		
gca ttt gat ttt agg ggc aaa aca aag gta ttt ctt agt att gaa gaa	2785	20
Ala Phe Asp Phe Arg Gly Lys Thr Lys Val Phe Leu Ser Ile Glu Glu		
830 835 840 845		
ttt aga gat tat gtt ttg cat atg ccc acc ttg aga gaa tta ctg ggg	2833	
Phe Arg Asp Tyr Val Leu His Met Pro Thr Leu Arg Glu Leu Leu Gly		
850 855 860		
aat aat ata cct tag cacgccaggg tgactacaaa caatalgctt tccctccccca	2888	
Asn Asn Ile Pro		30
865		
gcatgcatcc	2898	
<210> 2		
<211> 865		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		40
<400> 2		
Met Ser Asp Val Ser Thr Ser Val Gln Ser Lys Phe Ala Arg Leu Ala		

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (421)..(1617)

<400> 3

gaagcgggic ccgacggteg ccacggttgg gggaaaacgcg gcggacgccg cccccgtccc 60 10

gaaggggact cgaaaatgta cagccagcgg ttggcaccg tacagcggga ggtaagggc 120

cccaccccca aagtggtgat cgtgagatec aagcctccia aaggccaagg agctgagcac 180

catctagaaa gaatccgacg cagccatcag aagcataatg ctattttggc ttccattaag 240

tcaagtgagc gggatcgctt gaaagctgag igggaccagc acaatgactg caagattttg 300 20

gacagccttg tgcgagcaag aatcaaggat gctgtgcaag ggtttatcat taacattgaa 360

gaaagacgaa ataagctacg tgagctttta gcattagaag aaaatgagta tttiacagaa 420

atg caa ttg aag aaa gaa acc att gag gag aaa aaa gat agg atg aga 468

Met Gln Leu Lys Lys Glu Thr Ile Glu Glu Lys Lys Asp Arg Met Arg

1 5 10 15

gag aaa act aaa tta cta aaa gag aag aat gaa aaa gag agg cag gat 516 30

Glu Lys Thr Lys Leu Leu Lys Glu Lys Asn Glu Lys Glu Arg Gln Asp

20 25 30

ttt gtg gct gaa aag cta gac cag caa ttc agg gaa cgc tgt gag gag 564

Phe Val Ala Glu Lys Leu Asp Gln Gln Phe Arg Glu Arg Cys Glu Glu

35 40 45

ctc cgt gtt gaa ttg tta tct atc cat cag aag aag gtg tgt gag gag 612 40

Leu Arg Val Glu Leu Leu Ser Ile His Gln Lys Lys Val Cys Glu Glu

50 55 60

210	215	220		
aag ata tac cai aaa tat ttg gca cag aga cgt gag gaa gaa aaa gct			1140	
Lys Ile Tyr His Lys Tyr Leu Ala Gln Arg Arg Glu Glu Glu Lys Ala				
225	230	235	240	
cag gag aaa gaa ttt gac aga ata tta gag gaa gac aag gca aag aag			1188	
Gln Glu Lys Glu Phe Asp Arg Ile Leu Glu Glu Asp Lys Ala Lys Lys				
	245	250	255	10
ttg gct gag aag gac aag gag ctg aga ctt gaa aag gag gca agg aga			1236	
Leu Ala Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg Leu Glu Lys Glu Ala Arg Arg				
	260	265	270	
cag ctt gtg gat gag gtc atg tgt aca aga aaa ctt caa gtt caa gaa			1284	
Gln Leu Val Asp Glu Val Met Cys Thr Arg Lys Leu Gln Val Gln Glu				
	275	280	285	20
aag ttg caa cga gaa gct aaa gaa cag gaa gaa cgt gct atg gaa cag			1332	
Lys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Glu Gln Glu Glu Arg Ala Met Glu Gln				
	290	295	300	
aaa cac ata aat gaa agt ctt aaa gaa ctt aac tgt gaa gag aag gag			1380	
Lys His Ile Asn Glu Ser Leu Lys Glu Leu Asn Cys Glu Glu Lys Glu				
305	310	315	320	
aat ttt gca aga cgc caa cgt tta gcc cag gag tac agg aag caa ctt			1428	
Asn Phe Ala Arg Arg Gln Arg Leu Ala Gln Glu Tyr Arg Lys Gln Leu				
	325	330	335	30
cag atg caa atc gcc tac cag cag cag tcc caa gaa gca gag aag gaa			1476	
Gln Met Gln Ile Ala Tyr Gln Gln Gln Ser Gln Glu Ala Glu Lys Glu				
	340	345	350	
gag aaa cgc cga gag ttt gaa gca ggt gta gca gca aac aag atg tgt			1524	
Glu Lys Arg Arg Glu Phe Glu Ala Gly Val Ala Ala Asn Lys Met Cys				
	355	360	365	40

ttg gac aag gtc cag gag gtc ctg tcc acc cat caa gig ctg cct caa 1572
 Leu Asp Lys Val Gln Glu Val Leu Ser Thr His Gln Val Leu Pro Gln
 370 375 380

aac att cat ccc atg cgc aag gca tgc ccc agt aag ctt cca ccg 1617
 Asn Ile His Pro Met Arg Lys Ala Cys Pro Ser Lys Leu Pro Pro
 385 390 395

tagttccgtg agcatcaata tatcttttct tggctctttta atatttttaa ctacagtaig 1677 10

cttgtatgct tcttttaact ccggataaa cttttctttt tccctgaaa aaaaaaaaaa 1737

aaaaaaaaaa a 1748

<210> 4

<211> 399

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 4

Met Gln Leu Lys Lys Glu Thr Ile Glu Glu Lys Lys Asp Arg Met Arg
 1 5 10 15

Glu Lys Thr Lys Leu Leu Lys Glu Lys Asn Glu Lys Glu Arg Gln Asp
 20 25 30

30

Phe Val Ala Glu Lys Leu Asp Gln Gln Phe Arg Glu Arg Cys Glu Glu
 35 40 45

Leu Arg Val Glu Leu Leu Ser Ile His Gln Lys Lys Val Cys Glu Glu
 50 55 60

Arg Lys Ala Gln Ile Ala Phe Asn Glu Glu Leu Ser Arg Gln Lys Leu
 65 70 75 80

40

Val Glu Glu Gln Met Phe Ser Lys Leu Trp Glu Glu Asp Arg Leu Ala
 85 90 95

Lys Glu Lys Arg Glu Ala Gln Glu Ala Arg Arg Gln Lys Glu Leu Met
 100 105 110

Glu Asn Thr Arg Leu Gly Leu Asn Ala Gln Ile Thr Ser Ile Lys Ala
 115 120 125

Gln Arg Gln Ala Thr Gln Leu Leu Lys Glu Glu Glu Ala Arg Leu Val
 130 135 140

Glu Ser Asn Asn Ala Gln Ile Lys His Glu Asn Glu Gln Asp Met Leu
 145 150 155 160

Lys Lys Gln Lys Ala Lys Gln Glu Thr Arg Thr Ile Leu Gln Lys Ala
 165 170 175

Leu Gln Glu Arg Ile Glu His Ile Gln Gln Glu Tyr Arg Asp Glu Gln
 180 185 190

Asp Leu Asn Met Lys Leu Val Gln Arg Ala Leu Gln Asp Leu Gln Glu
 195 200 205

Glu Ala Asp Lys Lys Lys Gln Lys Arg Glu Asp Met Ile Arg Glu Gln
 210 215 220

Lys Ile Tyr His Lys Tyr Leu Ala Gln Arg Arg Glu Glu Glu Lys Ala
 225 230 235 240

Gln Glu Lys Glu Phe Asp Arg Ile Leu Glu Glu Asp Lys Ala Lys Lys
 245 250 255

Leu Ala Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg Leu Glu Lys Glu Ala Arg Arg
 260 265 270

Gln Leu Val Asp Glu Val Met Cys Thr Arg Lys Leu Gln Val Gln Glu
 275 280 285

Lys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Glu Gln Glu Glu Arg Ala Met Glu Gln

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7

<400> 6

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 7

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:KU-GB-3 Sense
Primer (P1)

<400> 7

tcaaggaact ggcataccct gtct

24

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:KU-GB-3
Antisense Primer (P2)

30

<400> 8

ggtactcgac aagcactgac aatc

24

<210> 9

<211> 20

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:KU-GB-4 Sense
Primer (P3)

<400> 9

caaactctgg gaggaagacc

20

<210> 10

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:KU-GB-4
Antisense Primer (P4)

<400> 10

agttagctga gaaggacaag

20

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SOX5 Sense
Primer (P5)

<400> 11

gcaacaggag gaaggaaat

19

30

<210> 12

40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SOX5 Antisense
Primer (P6)

<400> 12

gacaagccaa ctgataaggg tc

22

10

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SOX6 Sense
Primer (P7)

20

<400> 13

cgcgctttga gaattgggg cc

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SOX6 Antisense
Primer (P8)

<400> 14

tccttggtgg ggaggggggt ga

22

40

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ZINC FINGER
HOMEBOX 1B Sense Primer(P9)

<400> 15

lggagatcac tccaatggacg atag

24

10

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ZINC FINGER
HOMEBOX 1B Antisense Primer(P10)

20

<400> 16

cctgttcttt gaagcaccca tgi

23

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:M-PHASE
PHOSPHOPROTEIN1 Sense Primer(P11)

<400> 17

aacgagccaa acggaa

16

40

<210> 18

<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:M-PHASE PHOSPHOPROTEIN1 Antisense Primer (P12)		
<400> 18		10
gtatccatcc cctcaage	18	
<210> 19		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence:beta-actin sense primer (P13)		
<400> 19		
gtcgacaacg gctccggcat gtgca	25	
<210> 20		30
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:beta-actin antisense primer (P14)		
<400> 20		40
ggatcttcat gaggtagta gtcag	25	

【図面の簡単な説明】

第1図は、RT-PCRによるグリオーマ抗原KU-GB-3の発現解析の結果を示す写真である。

第2図は、RT-PCRによるグリオーマ抗原KU-GB-4の発現解析の結果を示す写真である。

第3図は、RT-PCRによるSOX5 (sex determining region Y-BOX5)の発現解析の結果を示す写真である。

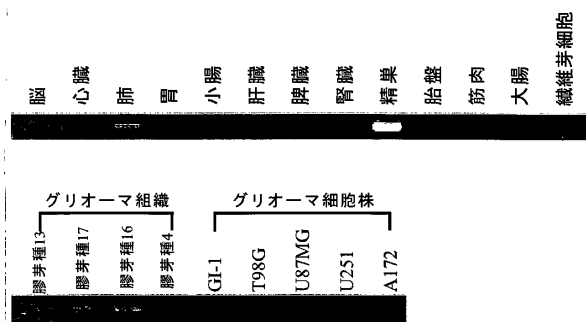
第4図は、RT-PCRによるSOX6 (sex determining region Y-BOX6) の発現解析の結果を示す写真である。
 第5図は、RT-PCRによるジンクフィンガー (Zinc finger homeobox 1B) ホメオボックスの発現解析の結果を示す写真である。
 第6図は、RT-PCRによるMフェーズホスホプロテイン1の発現解析の結果を示す写真である。
 第7図は、組換えSOX6 HMGボックスタンパクに対するグリオーマ患者血清中のIgG抗体反応のウェスタンブロット解析による結果を示す写真である。
 第8図は、組換えSOX6 HMGボックスタンパクに対するグリオーマ患者血清中のIgG抗体反応のELISA解析による結果を示す図である。図中のバーは中央値を示し、^a P < 0.01はunpaired t testを示す。
 第9図は、RT-PCRによるSOX6 (sex determining region Y-BOX6) の発現解析の結果を示す図である。
 第10図は、グリオーマ組織におけるSOX6のノーザンブロット解析の結果を示す写真である。左パネルは正常組織 (精巣、胎児脳、及び成人脳) におけるSOX6の発現を示し、右パネルはグリオーマ組織標本におけるSOX6の発現を示す。
 第11図は、グリオーマ組織におけるSOX6のウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。右パネルはSOX6抗体に対する吸収反応後の結果を示す。
 第12図は、グリオーマ及び正常脳組織におけるSOX6発現の免疫組織化学的分析の結果を示す写真である。

10

20

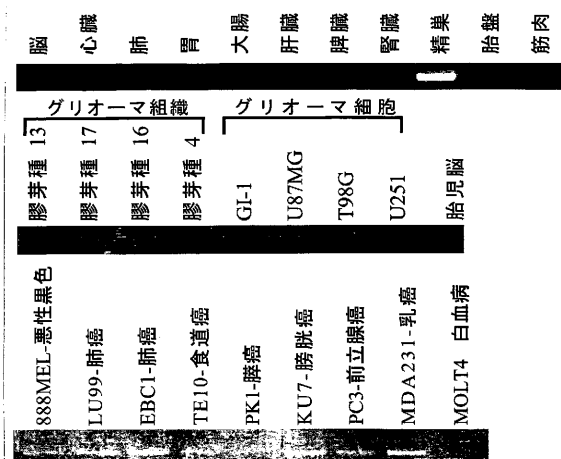
【図1】

第1図



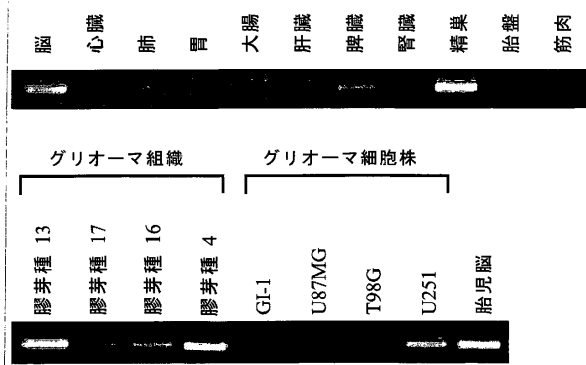
【図2】

第2図



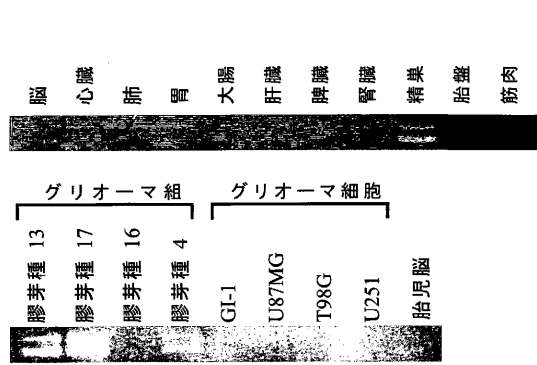
【 図 3 】

第 3 図



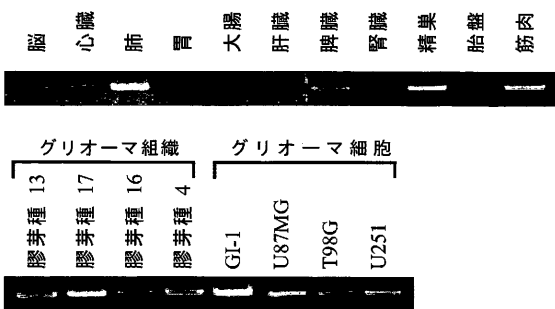
【 図 4 】

第 4 図



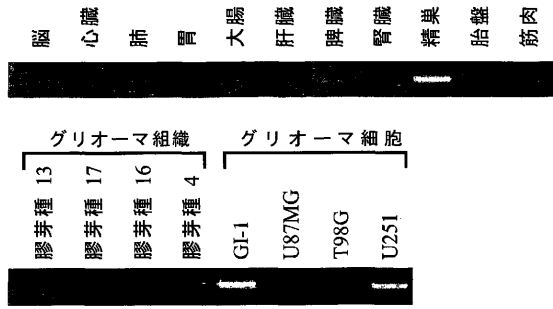
【 図 5 】

第 5 図



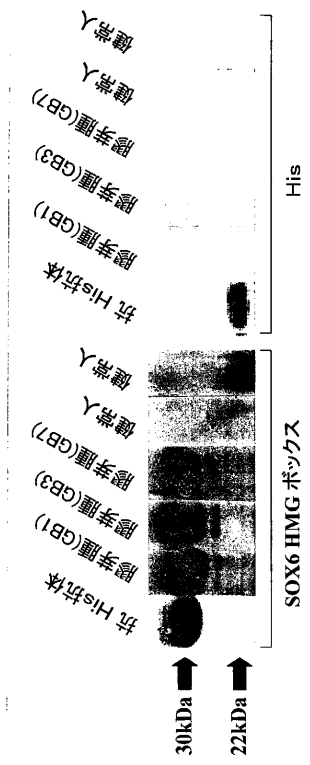
【 図 6 】

第 6 図



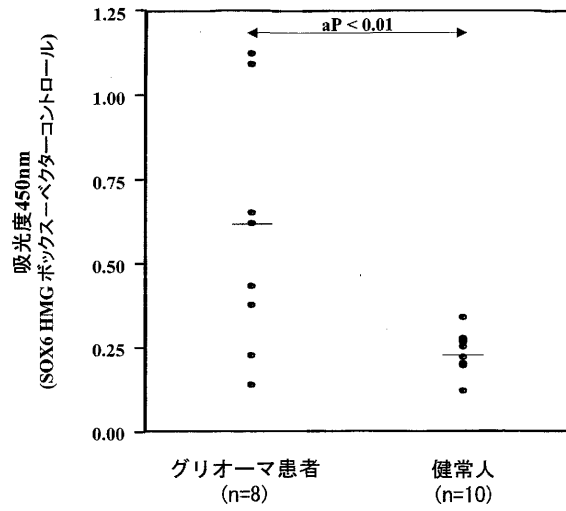
【 図 7 】

第 7 図



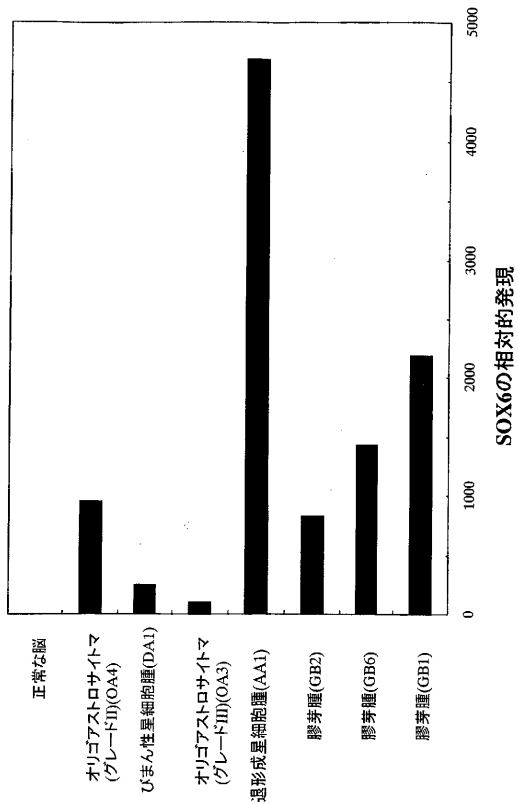
【 図 8 】

第 8 図



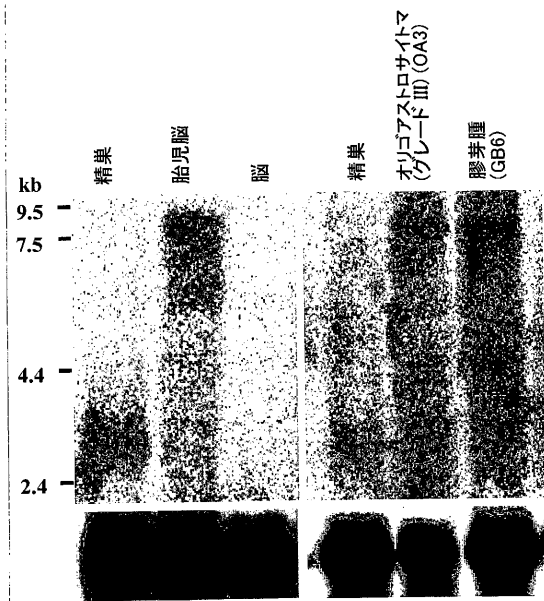
【 図 9 】

第 9 図



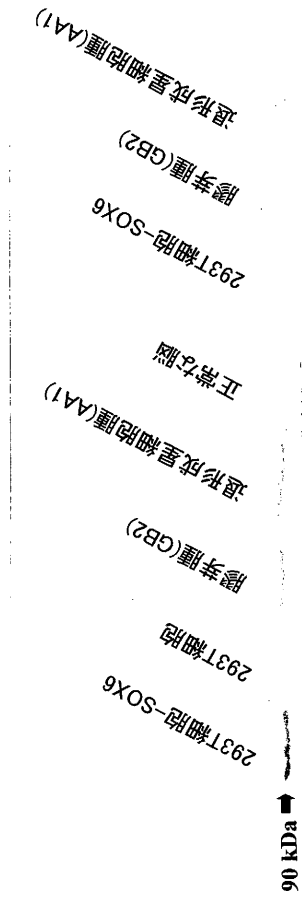
【 図 10 】

第 10 図



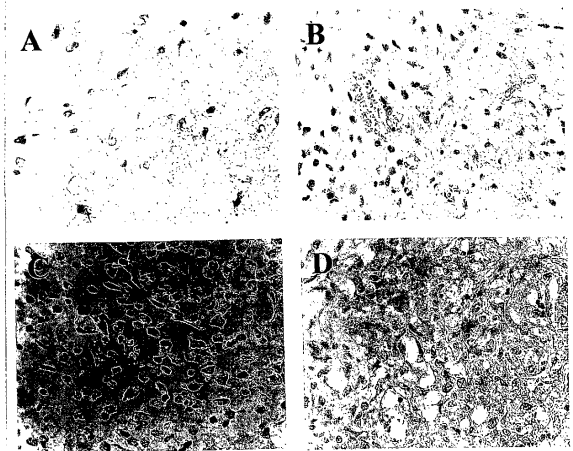
【 図 1 1 】

第 1 1 図



【 図 1 2 】

第 1 2 図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12502
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/12, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, 19/00, C12Q1/02, 1/68, A01K67/027, A61K39/395, A61P35/00 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) Int.Cl ⁷ C12N15/00-15/90, C07K14/00-14/825, C12Q1/02, 1/68, A01K67/027, A61K39/395, A61P35/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1074617 A2 (Helix Research Institute), 07 February, 2001 (07.02.01), & JP 2002-171977 A & JP 2002-191363 A & US 2003/0017480 A1	<u>1,5-11</u> 2-4, 12-16, 20-22
Y	Masahiro TODA et al., "SEREX Kogen ni yoru Glioma no Kessei Shindan", Neuroimmunological Research, December 2000, Vol.13, pages 44 to 46	1-16, 20-22
Y	T. RECI et al., Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1998, Vol.95, pages 5211 to 5216	1-16, 20-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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 04 March, 2003 (04.03.03)		Date of mailing of the international search report 18 March, 2003 (18.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12502

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
-
- Claims Nos.: 17-19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims involve diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

- 2.
-
- Claims Nos.: 13-16, 20-22

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet)

- 3.
-
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 30 involve two groups of inventions, i.e., the inventions relating to the glioma antigen originating in testis as set forth in claims 1 to 22 and the inventions relating to a glioma-recognizing antibody regardless of the origin as set forth in claims 23 to 30. Moreover, the major part common to these 2 groups of invention, i.e., the glioma antigen (regardless of the origin) had been publicly known. Thus, it cannot be considered that these groups of inventions have any special technical feature in common. Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a general single inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 22

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12502

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

The antigenic protein originating in testis as set forth in claim 13 is specified as a compound which can be obtained by the screening method comprising the steps (1) to (5) and, therefore, involves any compounds obtained by the screening method. However, it is recognized that only part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning as specified in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as specified in PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope of the antigenic protein as set forth in claim 13 and what are not. Thus, claim 13 also fails to fulfill the requirement of clearness as defined in PCT Article 6.

Therefore, the search was made on the compounds listed in Tables 2 and 3 which are specifically disclosed in the description.

The same applies to claims 14 to 16 and 20 to 22.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/12502
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N 15/12, 1/21, 5/10, C07K 14/47, 16/18, 19/00, C12Q 1/02, 1/68, A01K 67/027, A61K 39/395, A61P 35/00		
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 ¹ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825, C12Q 1/02, 1/68, A01K 67/027, A61K 39/395, A61P 35/00		
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		
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)		
MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS) GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
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 請求の範囲の番号
X Y	EP 1074617 A2 (Helix Research Institute) 2001.02.07 & JP 2002-171977 A & JP 2002-191363 A & US 2003/0017480 A1	1, 5-11 2-4, 12-16, 20-22
Y	戸田 正博 他, SEREX抗原によるグリオーマの血清診断, 神経 免疫研究, 12月, 2000, 第13巻, p. 44-46	1-16, 20-22
<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		の日の後に公表された文献、
「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		「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
「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		「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
「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)		「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	04.03.03	国際調査報告の発送日 18.03.03
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) 鈴木 恵理子	4N 2937 印
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/12502
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 請求の範囲の番号
Y	T·RECI . et al. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, Vol. 95, p. 5211-5216	1-16, 20-22

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/12502

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 17-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、ヒトの診断方法を包含するものであり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 13-16, 20-22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、別紙 (特別ページ) 参照。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-30に記載された発明は、請求の範囲1-22に記載の精巢由来のグリオーマ抗原と、請求の範囲23-30に記載の(由来に無関係の)グリオーマ認識抗体に係る、2の発明を包含し、しかもこの2の発明に共通する主要部である(由来に無関係の)グリオーマ抗原は公知であり、両者が特別の技術的特徴を有するとも認められないので、これらの発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-22

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/12502

第I欄2. について

請求の範囲13に記載の精巢由来の抗原タンパク質は、工程(1)～(5)に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物として特定されており、当該スクリーニング方法によって得られるあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、出願時の技術常識を勘案しても請求の範囲13に記載の抗原タンパク質として具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲13はPCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、明細書に具体的に開示されている表2及び表3に記載の化合物について行った。

また、請求の範囲14-16、20-22についても同様である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		F I	
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 19/00		C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/53	M
// A 6 1 K 45/00		G 0 1 N 33/566	
A 6 1 P 37/04		C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 P 37/06		A 6 1 K 45/00	
		A 6 1 P 37/04	
		A 6 1 P 37/06	

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	睾丸衍生的人神经胶质瘤抗原		
公开(公告)号	JPWO2003046182A1	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003547614	申请日	2002-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社GBS研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社GBS研究所		
[标]发明人	戸田正博 河上裕 植田良		
发明人	戸田 正博 河上 裕 植田 良		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 A61K45/00 A61P37/04 A61P37/06		
CPC分类号	C07K14/47 A61K2121/00 C07K14/4748 C07K16/3053 G01N33/57488		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K45/00 A61P37/04 A61P37/06		
优先权	2001367960 2001-11-30 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了具有与神经胶质瘤抗原蛋白相当的免疫诱导活性的睾丸来源的抗原蛋白及其编码基因等，可以用于神经胶质瘤的诊断和治疗。通过以下步骤制备具有可与神经胶质瘤抗原蛋白相当的免疫诱导活性的睾丸来源的抗原蛋白和可编码该基因基因，该基因可用于神经胶质瘤的诊断和治疗：从睾丸中提取总RNA，合成cDNA，和通过将cDNA导入λ噬菌体载体并用该载体感染大肠杆菌来构建λ噬菌体cDNA文库。使如此构建的λ噬菌体cDNA文库与神经胶质瘤患者的血清反应，并使用标记的抗IgG抗体来检测与血清中的抗体反应的阳性克隆；对检测到的阳性克隆重复几次筛选过程，以确认抗体的反应性；从确认的阳性克隆中分离抗原，并使用分离出的抗原和神经胶质瘤患者血清和健康个体的血清等进行血清筛选。

遺伝子	GeneBank アクセッション 番号	血清スクリーニング		
		グリオーマ患者	健康人	他の脳疾患患者
KU-GB-3	NM019079	3/29	0/37	0/14
KU-GB-4	なし	3/29	0/37	0/14
SRY (sex determining region Y)-box6; SOX6	NM033326	8/29	1/37	0/14
SOX5	NM033326	8/29	1/37	0/14
ジンクフィンガー ホモオボックス	NM014795	5/29	0/37	0/14
ADP リポシル化因子	NM001661	1/29	0/37	0/14
SOX13	NM005686	8/29		