

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 372532

(P2002 - 372532A)

(43)公開日 平成14年12月26日(2002.12.26)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 3
39/21		39/21	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
35/02		35/02	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 18数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 137526(P2001 - 137526)

(22)出願日 平成13年5月8日(2001.5.8)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 花淵 志野

東京都文京区湯島1 - 5 - 45 東京医科歯科

大学内

(72)発明者 大橋 貴

東京都文京区湯島1 - 5 - 45 東京医科歯科

大学内

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H T L V - I 腫瘍に対する抗腫瘍抗原又はその抗原エピトープ

(57)【要約】

【課題】 A T L 等の H T L V - I 腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する C T L 認識抗原又は該抗原エピトープをスクリーニングし、得られる C T L 認識抗原若しくは該抗原エピトープ又はそれらをコードする D N A を有効成分とする免疫応答誘導用ワクチン等を提供すること。

【解決手段】 H T L V - I 感染細胞株で免疫した免疫正常ラット由来の脾臓 T 細胞を、ホルマリン固定 H T L V - I 感染細胞株で刺激し、H T L V - I 特異的 C T L 細胞株を樹立し、エピトープ候補の合成ペプチドで感作した標的細胞 G 1 4 に対する上記 H T L V - I 特異的 C T L 細胞株の細胞傷害活性を測定し、主要エピトープ G A F L T N V P Y を同定した。かかるエピトープ合成ペプチドとアジュバンドで免疫正常ラットを免疫し、腫瘍抗原エピトープ特異的 C T L を誘導し、生体内の H T L V - I 感染腫瘍細胞の増殖を抑制する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検物質によって誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)をHTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法。

【請求項2】 HTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物が、成人T細胞白血病モデル非ヒト動物であることを特徴とする請求項1記載のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法。

【請求項3】 非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項1又は2記載のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法。

【請求項4】 被検物質によって誘導されたCTLと、HTLV-I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該CTLの細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法。

【請求項5】 被検物質で感作した標的細胞又は被検物質を発現する標的細胞と、HTLV-I特異的CTL細胞株とを接触させ、該HTLV-I特異的CTL細胞株の細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープ。

【請求項7】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項6記載の抗原エピトープ。

【請求項8】 請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープと被検アジュバントとを用いて誘導したCTLをHTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法。

【請求項9】 HTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物が、成人T細胞白血病モデル非ヒト動物であることを特徴とする請求項8記載のHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法。

【請求項10】 非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項8又は9記載のHTLV-I腫瘍に対す

る抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープと被検アジュバントとを用いて誘導したCTLと、HTLV-I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該CTLの細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法。

【請求項12】 請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープとして、請求項7記載の抗原エピトープペプチドを用いることを特徴とする請求項8～11のいずれか記載のHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法。

【請求項13】 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られ、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープを有効成分として含有することを特徴とする免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項14】 請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープをコードするDNAを有効成分として含有することを特徴とする免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項15】 CTL認識抗原が、配列番号1に示されるHTLV-IのTaxタンパク質であることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項16】 CTL認識抗原が、配列番号1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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるタンパク質であることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項17】 CTL認識抗原エピトープが、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項18】 CTL認識抗原エピトープが、配列番号2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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるペプチドであることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項19】 HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項13～18のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項20】 アジュバンドが、請求項8～12のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバンドであることを特徴とする請求項19記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項21】 請求項8～12のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバンドが、ISS-ODNであることを特徴とする請求項20記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項22】 請求項13～21のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチンにより誘導されたHTLV-I認識CTL。

【請求項23】 請求項22記載のHTLV-I認識CTLを有効成分として含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、成人T細胞白血病(ATL)等のヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する細胞傷害活性T細胞(CTL)を誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピートプのスクリーニング方法や、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原若しくは該抗原エピートプや、該抗原エピートプペプチドによる、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を有するCTLの誘導活性を増強するアジュバンドのスクリーニング方法や、前記CTL認識抗原若しくは該抗原エピートプ又はそれらのDNAを有効成分とする免疫応答誘導用ワクチン等に関する。

【0002】

【従来の技術】HTLV-Iは、ATL、HTLV-Iウイルス脊髄症/熱帯性慢性対麻痺(HAM/TSP)、その他の炎症性疾患などの発症に関与している(Blood 50,481-492, 1977、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7415-7419, 1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6476-6480, 1981、Lancet. 2, 407-410, 1985、Lancet.1, 1031-1032, 1986)。HTLV-Iは、そのenvと3'LTRの間にpXという特殊な配列を持ち、このpX領域は他の動物の発癌性レトロウイルスにはみられず、その産物のTax蛋白はHTLV-Iの多彩な病原性に重要な役割を演じていると考えられている。また、上記HTLV-IのTaxはウイルス調節タンパク質であり、インビトロでラット及びヒトの細胞を不死化させることができることが知られている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1071-1075, 1990、Blood 86, 4243-4249, 1995、J. Virol. 66, 4570-4575, 1992)。これらのことは、HTLV-IのTaxがHTLV-I誘導による白血病発症のメカニズムに関与していることを強く示唆しているが、インビボでのATL発症のメカニズ

ムは未だ明らかになっていない。

【0003】多くの研究からATL患者のHTLV-Iに対する宿主細胞性免疫のレベルは、HAM/TSP患者のものとは異なることが明らかになっており、HAM/TSP患者及び無症候性HTLV-Iキャリアからは、HTLV-I特異的CTLは見い出されるが、ATL患者からはCTLが見出されることはほとんどないことが報告されている(J. Immunol. 130, 2942-2946, 1983、J. Exp. Med. 158,994-999, 1983、J. Immunol. 133, 1037-1041, 1984、Nature 348, 245-248, 1990、Virology 188, 628-636, 1992、Int. J. Cancer 54, 582-588, 1993)。これらの報告から、宿主細胞の免疫がHTLV-I関連疾患の発症に影響を及ぼすと考えられている。

【0004】上記CTLは、一般的に、ウイルスを一掃するという重要な役割を果たすだけでなく、腫瘍根治の役割も担っている。HTLV-IキャリアにおけるHTLV-I特異的CD8⁺CTLにおいては、HTLV-IのTaxを認識し(Nature348, 245-248, 1990、Int. Immunol. 3, 761-767, 1991)、インビトロでATL細胞を溶解することが、本発明者らや他のグループによって報告されている(J. Immunol. 133, 1037-1041, 1984、Int. J. Cancer 54, 582-588, 1993)。これらのことから、HTLV-I特異的CTLsは、HTLV-Iの誘導による腫瘍細胞の増殖に対する宿主細胞の免疫監視機構における重要なエフェクターであることが示唆される。しかしながら、上記のCTLの役割は、インビボでHTLV-I腫瘍に対するものが、単に感染の結果によるものなのかは、未だ明らかにされていない。

【0005】インビボでのHTLV-I白血病発症におけるCTLの効果を明確にするため、本発明者らはATL様疾患の2種類の実験ラットモデル系を開発した(J. Virol. 73, 6031-6040, 1999、J. Virol. 74, 428-435, 2000、特願平10-315174)。一つは、HTLV-I不死化ラット細胞株を接種した無胸腺ラットのT細胞リンパ腫のモデルである(J. Virol. 73, 6031-6040, 1999)。このモデルでは、免疫T細胞を養子移入することによって、致死性のリンパ腫からラットを守った。もう一方のモデルにおいては、T細胞活性化に対する共刺激シグナルを阻害するために抗CD80及びCD86モノクローナル抗体を用いて、免疫正常ラットを処理することにより、T細胞リンパ腫の発達を誘導した(J. Virol.74, 428-435, 2000)。これらの結果から、インビボでのHTLV-I腫瘍の増殖を防ぐという宿主T細胞免疫応答の役割が強く示唆される。

【0006】HTLV-I感染患者や上記ラットモデルにおけるCTLの研究結果は、プレATL患者におけるHTLV-I特異的CTLが増強することにより、ATL発症から患者を守る可能性が示唆されている。ATLの治癒率は、化学療法に対して抵抗性を有することから

リンパ球増殖性疾患の中でも極端に低く、このことから疾患の早い段階における免疫学的アプローチによる治療法の開発が期待されている。効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、腫瘍抗原を正確に特定し、細胞性免疫が認識する強力な免疫原を宿主に投与しなければならない。特に、腫瘍を認識する主な細胞群の一つであるCD8⁺CTLの応答を誘導させるためには、抗原提示細胞のクラスII抗原と同じようにMHCクラスIによりプロセッシングされた適切なペプチドの提示が必要である(Nature 343, 692-696, 1989)。MHCクラスIによる抗原提示の経路が優先されることから、標的抗原をコードする外来性遺伝子の分泌や発現に用いることができる種々のウイルスベクターが提案されている(J. Natl. Cancer Inst. 90, 1894-1900, 1998)。無処理のDNAを直接投与しても、同様の効果が得られることが考えられている(Annu.Rev. Immunol. 18, 927-974, 2000)。また、DNAをベースとしたワクチンより安全なMHC分子に直接結合するCTLエピトープに相当するペプチドをベースとしたワクチンも考えられている(Int. J. Cancer 63, 883-885, 1995)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】ATLは、日本に多くの保有率を持つHTLV-Iの感染によって引き起こされる腫瘍性疾患であるが、化学療法剤に抵抗性であるため、極めて予後の悪い悪性腫瘍とされてきた。一方で種々の臨床的観察から、宿主細胞性免疫、特にCTLの抗腫瘍効果が示唆されている。本発明の課題は、ATL等のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法や、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原若しくは該抗原エピトープや、該抗原エピトープペプチド等による、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を有するCTLの誘導活性を増強するアジュバントのスクリーニング方法や、前記CTL認識抗原若しくは該抗原エピトープ又はそれらのDNAを有効成分とする免疫応答誘導用ワクチン等を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究し、nu/+ラット由来HTLV-I感染細胞株FPM1-V1AXで免疫した同系免疫正常ラット由来の脾臓T細胞を、ホルマリン固定FPM1-V1AXで2週間おきに刺激を繰り返すことによりHTLV-I特異的CTL細胞株を樹立し、HTLV-I特異的CTLの主要な認識エピトープを含むと考えられる各種合成ペプチドで感作した標的細胞G14に対する上記HTLV-I特異的CTL細胞株の細胞傷害活性を検討したところ、標的細胞が特に強いCTL感受性を示すペプチド、すなわちHTLV-I腫瘍に

対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原の主要エピトープを同定した。かかるエピトープの合成ペプチドを免疫原とし、アジュバントを用いることにより免疫正常ラットに腫瘍抗原エピトープ特異的CTLが誘導可能であることや、この誘導されたCTLが生体内におけるHTLV-I感染腫瘍細胞の増殖を強く抑制しうることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、被検物質によって誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)をHTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法(請求項1)や、HTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物が、成人T細胞白血病モデル非ヒト動物であることを特徴とする請求項1記載のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法(請求項2)や、非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項1又は2記載のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法(請求項3)や、被検物質によって誘導されたCTLと、HTLV-I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該CTLの細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法(請求項4)や、被検物質で感作した標的細胞又は被検物質を発現する標的細胞と、HTLV-I特異的CTL細胞株とを接触させ、該HTLV-I特異的CTL細胞株の細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法(請求項5)や、請求項1~5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とするHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープ(請求項6)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項6記載の抗原エピトープ(請求項7)に関する。

【0010】また本発明は、請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープと被検アジュバントとを用いて誘導したCTLをHTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法(請求項8)や、HTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物が、成人T細胞白血病モデル非ヒト動物であること

を特徴とする請求項8記載のHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法(請求項9)や、非ヒト動物が、ラットであることを特徴とする請求項8又は9記載のHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法(請求項10)や、請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープと被検アジュバントとを用いて誘導したCTLと、HTLV-I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該CTLの細胞傷害活性を測定・評価することを特徴とするHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法(請求項11)や、請求項6記載のCTL認識抗原又は該抗原エピトープとして、請求項7記載の抗原エピトープペプチドを用いることを特徴とする請求項8～11のいずれか記載のHTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法(請求項12)に関する。

【0011】さらに本発明は、請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られ、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープを有効成分として含有することを特徴とする免疫応答誘導用ワクチン(請求項13)や、請求項1～5のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープをコードするDNAを有効成分として含有することを特徴とする免疫応答誘導用ワクチン(請求項14)や、CTL認識抗原が、配列番号1に示されるHTLV-IのTaxタンパク質であることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項15)や、CTL認識抗原が、配列番号1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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるタンパク質であることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項16)や、CTL認識抗原エピトープが、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項17)や、CTL認識抗原エピトープが、配列番号2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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるペプチドであることを特徴とする請求項13又は14記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項18)や、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項13～18のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項19)や、アジュバントが、請求項8～12

のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントであることを特徴とする請求項19記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項20)や、請求項8～12のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる、HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントが、ISS-ODNであることを特徴とする請求項20記載の免疫応答誘導用ワクチン(請求項21)や、請求項13～21のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチンにより誘導されたHTLV-I認識CTL(請求項22)や、請求項22記載のHTLV-I認識CTLを有効成分として含有する医薬組成物(請求項23)に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのスクリーニング方法としては、ATL等のHTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物に、被検物質によって誘導されたCTLを投与し、かかる非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価する方法や、被検物質によって誘導されたCTLと、HTLV-I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該CTLの細胞傷害活性を測定・評価する方法や、被検物質で感作した標的細胞又は被検物質を発現する標的細胞と、HTLV-I特異的CTL細胞株とを接触させ、該HTLV-I特異的CTL細胞株の細胞傷害活性を測定・評価する方法を具体的に挙げるることができる。ここで、CTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープとは、インビボやインビトロにおいてCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープを意味する。

【0013】上記HTLV-I関連疾患モデル非ヒト動物としては、HTLV-Iを感染させることにより、ATL、HAM/TSP、HAAP、ブドウ膜炎、気管支肺炎、シェーグレン症候群類似の唾液腺炎等のHTLV-I関連疾患を起こす非ヒト動物であれば特に制限されるものではないが、再現性よく長期間にわたってHTLV-I感染腫瘍細胞を増殖させることができるものが好ましい。また本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット、モルモット、サル、ネコ、ウサギ等の非ヒト哺乳類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。以下、ATLモデル非ヒト動物の作製方法を、ATLモデルラットを例にとって説明する。

【0014】ATLモデルラットは、例えば、免疫正常ラットにHTLV-I感染腫瘍細胞株を投与することにより得ることができるが、T細胞機能を欠損した非ヒト動物の皮下、腹腔内、静脈内等にHTLV-I感染腫瘍細胞株を投与することによって得られるATLモデルラットの方が、再現性の点及び体内でHTLV-I感染腫

瘍細胞を増殖/継代させることができる点で好ましい。そして、評価の際に用いる野生型ラットとしては、A T Lモデルラットと同系の野生型ラットを用いることが好ましい。上記T細胞機能を欠損した非ヒト動物としては、ヌード非ヒト動物等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。また、上記H T L V - I感染腫瘍細胞株としては、公知の方法によりH T L V - Iを感染させた細胞株で、且つ野生型非ヒト動物とM H Cが一致しているものであればどのようなものでもよく、例えば、F P M 1 - V 1 A X等の細胞株を具体的に挙げるができる。

【0015】本発明のスクリーニング方法において用いる被検物質としては、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA等を具体的に挙げるができる。上記被検物質で感作した標的細胞、又は被検物質を発現する標的細胞としては、M H Cが一致している細胞であればどのような細胞でもよいが、C D 8⁺T細胞株であるG 1 4細胞(J. Virol. 74, 9610-9616, 2000)を好ましく例示することができる。

【0016】また、被検物質を発現する細胞を調製する際の発現系としては、上記被検物質を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、S V 40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もよい。また、読み枠を変えて翻訳することができる発現ベクターシリーズも有利に用いることができる。

【0017】また、かかる被検物質が組み込まれた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室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、D E A E - 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、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

【0018】本発明におけるH T L V - I特異的C T L細胞株としては、H T L V - Iを特異的に認識するC T

L細胞株であれば特に制限されるものではないが、M H CクラスIに拘束されるものが好ましく、かかるM H CクラスIに拘束されたH T L V - I特異的C T L細胞株は公知の方法、例えば、M H CクラスI分子を発現する非ヒト動物由来のT細胞にH T L V - Iを感染させた細胞を、T細胞機能が欠損した非ヒト動物(ヌード非ヒト動物)の体内で増殖させることによりH T L V - I感染腫瘍細胞株を樹立し、この樹立した細胞株で免疫した免疫正常非ヒト動物の脾臓T細胞を、ホルマリン固定H T L V - I感染腫瘍細胞株で刺激を繰り返すことにより得ることができる。

【0019】上記スクリーニング方法により得られる、H T L V - I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するC T Lを誘導することができるC T L認識抗原としては、配列番号1に示されるH T L V - IのT a xタンパク質や、配列番号1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、H T L V - I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するC T Lを誘導することができるタンパク質等を挙げることができ、上記スクリーニング方法により得られる、抗原エピトープとしては、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるペプチド、特に好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドや、これら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、H T L V - I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するC T Lを誘導することができるペプチド等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ない。

【0020】本発明における、H T L V - I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバント、すなわち、より効率よくH T L V - I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するC T L認識抗原又は該抗原エピトープ特異的なC T Lを誘導することができるアジュバントのスクリーニング方法としては、上記のC T L認識抗原又は該抗原エピトープ、好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる抗原エピトープペプチドと被検アジュバントとを用いて誘導したC T Lを、成人T細胞白血病モデル非ヒト動物等のH T L V - I関連疾患モデル非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物における腫瘍の変化を測定・評価する方法や、上記のC T L認識抗原又は該抗原エピトープ、好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる抗原エピトープペプチドと被検アジュバントとを用いて誘導したC T Lと、H T L V - I感染腫瘍細胞株とを接触させ、該C T Lの細胞傷害活性を測定・評価する方法であれば、特に制限されるものではなく、かかるスクリーニング方法により得られるアジュバントとして、例えば、効率よくペプチド特異的なC T Lを誘導することができるC p Gモチーフを含むI S S - O D N (Immunostimulatory DNA sequences-oligodeoxynucleotide; Nat.

Med. 3, 849-854, 1997)、細胞傷害性T細胞を刺激するQS21 (Quil1aia saponaria, Cambridge Biotech, Worcester, MAより商業的に入手可能)、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油性エマルジョン、サポニン、ビタミンE溶解物等を具体的に挙げる事ができる。

【0021】前記スクリーニング方法により得られる、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原若しくは該抗原エピトープ又はそれらをコードするDNAは、細胞性免疫や体液性免疫等の免疫応答誘導用ワクチンとして用いることができる。本発明の免疫応答誘導用ワクチンとしては、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原、例えば、配列番号1に示されるHTLV-IのTaxタンパク質や、配列番号1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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるタンパク質、又は、CTL認識抗原エピトープ、例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチドや、配列番号2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、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍作用を有するCTLを誘導することができるペプチドを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチンや、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができる上記CTL認識抗原又は該抗原エピトープをコードするDNAを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチンなどを挙げる事ができる。また、本発明の免疫応答誘導用ワクチンとしては、さらに細胞性の又は局所的な免疫を増強する種々のアジュバントを含むものがより好ましく、かかるアジュバントとしては、ISS-ODN等の前記HTLV-I腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強するアジュバントのスクリーニング方法により得られるアジュバントを例示することができる。アジュバントを用いる場合、アジュバントとなる種々の菌体成分や毒素等と、前記CTL認識抗原又は該抗原エピトープ、好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる抗原エピトープペプチドとを連続してコードするDNAから作製した組換え融合タンパクあるいは組換え融合ペプチドとして用いることもできる。

【0022】また、本発明の免疫応答誘導用ワクチンは、医薬的に容認可能な担体または希釈剤、免疫賦活剤、添加剤等を含んでいてもよい。担体または希釈剤としては、例えば、SPGAなどの安定化剤や、ソルビトール、マンニトール、澱粉、スクロース、グルコース、デキストラン等の炭水化物や、アルブミン、カゼイン等のタンパク質や、ウシ血清、スキムミルク等のタンパク質含有物質や、リン酸緩衝液、生理食塩水、水等の緩衝

液などを具体的に挙げる事ができる。免疫賦活剤としては、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-12(IL-12)、腫瘍壊死因子(TNF-)等のサイトカインを具体的に例示することができる。添加剤としては、低分子量のポリペプチド(約10残基未満)、タンパク質、アミノ酸、グルコース又はデキストランを含む炭水化物、EDTAなどのキレート剤、蛋白質安定化剤、微生物増殖阻止若しくは抑制剤等を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。

【0023】本発明により提供される医薬品や医薬組成物としては、前記免疫応答誘導用ワクチンの他に、免疫応答誘導用ワクチンを非ヒト動物等に投与することにより誘導されるHTLV-I認識CTLを有効成分として含有するものを挙げる事ができ、これら医薬品や医薬組成物は、経口、静脈内、腹腔内、鼻腔内、皮内、皮下、筋肉内等により投与することができる形状のものが好ましい。投与すべき有効量は、医薬品や医薬組成物の種類・組成、投与方法、患者の年齢や体重等を考慮して適宜決定することができる。これらを1日あたり1~数回投与することが好ましい。また、経口投与する場合、通常、製剤用担体と混合して調製した製剤の形で投与される。この際、製剤に用いることができる担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドと反応しない物質が用いられる。

【0024】また、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等を具体的に例示することができる。これらの製剤は常法に従って調製され、特に液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形態とすることもできる。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドを水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。またこれらの製剤は、治療上価値のある他の成分を含有していてもよい。

【0025】本発明のHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープは、HTLV-Iの感染予防及び/又はHTLV-I関連疾患の症状改善用食品素材として、プリン、クッキー、パン、ケーキ、ゼリー、煎餅などの焼き菓子、羊羹などの和菓子、冷菓、チューインガム等のパン・菓子類や、うどん、そば等の麺類や、かまぼこ、ハム、魚肉ソーセージ等の魚肉練り製品や、ヨーグルト、ドリンクヨーグルト、ジュース、牛乳、豆乳、酒類、コーヒー、紅茶、煎茶、ウーロン茶、スポーツ飲料等の各種飲料や、みそ、しょう油、ドレッシング、マヨネーズ、甘味料等の調味料類や、豆腐、こんにゃく、その他佃煮、餃子、コロケ、サラダ等の各種総菜

へ配合し、機能性食品として摂取することもできる。

【0026】

【実施例】以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 (細胞株)

FPM1-V1AX (J. Virol. 73, 6031-6040, 1999) は、免疫正常ラットF344/N Jcl-rnu/(nu/+) (4週齢雌ラット; Clea Japan, Inc.社製) のT細胞にHTLV-Iを感染させて樹立した不死化ラットT細胞株FPM1を、ヌードラットF344/N Jcl-rnu/rnu(nu/nu)の体内で増殖させて樹立した(J. Virol. 73, 6436-6443, 1999)。FPM-SVは、nu/+ラット由来の腎臓細胞株にHTLV-I陰性SV40を形質転換することによって樹立した(J. Virol. 73, 6031-6040, 1999)。WKAHラットの脾臓細胞から樹立したHTLV-I感染T細胞株(TARS-1; J. Exp. Med. 159, 1105-1116, 1984)は、北海道大学のDr. T. Yoshikiから提供されたものを用いた。RT1.A¹/TARS-1は、RT1.A¹発現プラスミドであるpRep10をTARS-1細胞にトランスフェクションし、インピトロで400µg/mlのハイグロマイシンで選択することによって樹立した。なお、pRep10 (Immunogenetics 39, 447, 1994)は、Dr. S. Salgar (Miami Univ., FL) から提供されたものを用い、上記RT1.A¹/TARS-1細胞におけるRT1.A¹の発現は免疫蛍光分析により確認した。nu/+ラットから樹立したIL-2依存HTLV-I陰性CD8⁺T細胞株であるG14及びTax遺伝子を安定発現する細胞であるG14-Tax細胞株は、文献(J. Virol. 74, 9610-9616, 2000)記載の方法により調製した。また、使用した全細胞株は、10%の熱不活性FCS (Whittaker, Walkersville, MD)、ペニシリン、及びストレプトマイシンを含むRPMI 1640で保存し、上記G14及びG14-Taxにおいては、10U/mlの組換えヒトIL-2 (rhIL-2) (塩野義製薬社製)を添加したRPMI 1640培地で保存した。

【0027】実施例2 (免疫T細胞サブセットの調製) 4週齢のnu/+ラットの腹腔内に、 2×10^7 のFPM1-V1AX細胞を2週間の間隔をあけて2回投与して免疫した。最終免疫の1週間後、脾臓T細胞を単離し、ナイロンウールカラムで精製した後、さらに補体溶解法 (complement lysis method) によりリンパ球サブセットを精製した。簡潔に説明すると、脾臓T細胞の浮遊物を、抗ラットCD8モノクローナル抗体 (R1-10B5) 又は抗ラットCD4モノクローナル抗体 (RTH-7) と混合し、氷上で30分間インキュベーションした。1%FCS-PBSで洗浄した後、上記細胞を2%のウサギ血清 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada) を含むRPMI 1640培地中において

37℃で45分間インキュベーションし、10%FCS-RPMI 1640で2回洗浄した。その後、フローサイトメトリ分析によりCD8⁺又はCD4⁺T細胞が98%以上に濃縮されているかどうかを確認した。

【0028】実施例3 (CD4⁺又はCD8⁺T細胞の抗腫瘍効果)

本発明者らは、以前にHTLV-I感染腫瘍細胞株FPM1-V1AXを投与したF344/N Jcl-rnu/rnu(nu/nu)ラットに、HTLV-I感染細胞で免疫したラットの脾臓T細胞を養子移入することにより悪性リンパ腫の増殖を効果的に阻害できることを報告している(J. Virol. 73, 6031-6040, 1999)。そこで、インピボでの腫瘍の退行に直接必要とされる免疫T細胞のサブセットを明らかにするために、実施例2記載の方法により単離したCD4⁺又はCD8⁺細胞群を用いて、F344/N Jcl-rnu/rnu(nu/nu)ラットの各サブセットに対する抗腫瘍効果を調べてみた。4週齢のnu/nu雌ラット (Clea Japan, Inc.社製) に 2×10^7 のFPM1-V1AX細胞株を皮下接種すると同時に、実施例2により単離した 10^7 のCD4⁺T細胞()、CD8⁺T細胞() 又は全T細胞() を腹腔内投与し、それぞれの皮下腫瘍の大きさをカリパスで1日おきに測定し、腫瘍増殖の抑制効果を調べてみた。なお、腫瘍の大きさ (V; mm³) は、上記測定により最長表面長 (mm; a) と幅 (mm; b) を決定し、文献(J. Virol. 73, 6031-6040, 1999) 記載の公式 ($V = a b^2 / 2$) を用いて求めた。なお、FPM1-V1AX細胞株を単独で皮下接種した4週齢のnu/nuラットをコントロール() として用いた。

【0029】上記の結果を図1に示す。CD4⁺及びCD8⁺T細胞は共に、全T細胞と同様に、HTLV-I感染腫瘍細胞株の成長を阻害する効果を有しているのが確認できた。腫瘍ラットの肺及び縦隔洞リンパ節においては結節が明らかに確認できるのに対して、免疫T細胞のサブセットをトランスファーしたラットにおいては、転移性結節はみられなかった。

【0030】更に分析を実施するために、免疫T細胞 (CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、又は全T細胞) をトランスファーすることにより、腫瘍が完全に退行した28日目における各nu/nuラットから脾臓T細胞 (CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、全T細胞) をそれぞれ単離し、それぞれの標的細胞に対する細胞傷害活性を調べてみた。各ウエルにつき2mlの10%FCS-RPMI 1640が入った24ウエルプレート中で、上記各種脾臓T細胞 (5×10^6 細胞/ウエル) とホルマリンで固定したFPM1-V1AX細胞 (2×10^6 細胞/ウエル) とをそれぞれ6日間共培養し、かかる細胞 (E; エフェクター細胞) と標的細胞 (T; FPM1-V1AX、同系のT細胞株G14、又はG14-Tax) の割合 (E/T) を10として、文献 (Immunology 14, 181

-196, 1968) 記載のように⁵¹Cr 放出分析を6時間行
い、標的細胞に対する細胞傷害活性を測定し、次式によ
り計算した。なお、値(平均値±SD)は3回の実験か

ら求めた。

【0031】

【数1】

$$\frac{[\text{実験で得られた}^{51}\text{Cr放出量} - \text{自発性の}^{51}\text{Cr放出量}]}{[\text{最大}^{51}\text{Cr放出量} - \text{自発性の}^{51}\text{Cr放出量}]} \times 100\%$$

【0032】上記の結果を図2に示す。この結果から、
各種T細胞はFPM1-V1AX及びG14-Taxに
対して高い細胞傷害活性を示したが、HTLV-I陰性
G14細胞に対する細胞傷害活性はみられなかった。な
お、上記各種免疫T細胞(CD4⁺又はCD8⁺免疫T細胞)
をトランスファーしたnu/nuラットから単離され
た脾臓T細胞においては、フローサイトメトリーによ
りそれぞれCD4又はCD8に対して陽性であることが
顕著に確認できた。これらの結果は、CD4⁺又はCD
8⁺T細胞のHTLV-I特異的細胞傷害活性がインビ
ボにおけるHTLV-I感染腫瘍細胞の直接の排除に強
く関与していることを示唆している。

【0033】実施例4(組換えワクシニアウイルス)
次に、HTLV-I特異的CTLsが認識するウイルス
性抗原を調べてみるために、北海道大学のDr. H. Shida
から提供された4種類のHTLV-I遺伝子を含む組換
えワクシニアウイルス(rvv; Embo J. 6, 3379-338
4, 1987; J. Virol. 62, 3718-3728, 1988; Cell 55, 1
97-209, 1988)、すなわち、HTLV-Iのenv遺伝
子を含むrvv(WR-env)、HTLV-Iのgag
遺伝子を含むrvv(WR-gag)、及びHTLV
-IのpX遺伝子を含むrvv(WR-40X及びWR
-27X)を用いた。WR-27Xはp21X、p27
rex及びp40taxを、WR-40Xはp21X及
びp40taxを、発現する組換えワクシニアウイルス
である。10m.o.i(multiplicity of infection)で上
記各HTLV-I-rvv(WR-40X、WR-27
X、WR-env、WR-gag)をFPM-SV細胞
に37で1時間感染させた。インキュベーション後、
10%FCS-RPMI1640で細胞を1回洗浄し、
10%FCS-RPMI1640で37で12時間培
養した。かかる感染細胞を以下の実施例に用いるため
に放射性同位元素により標識した。

【0034】実施例5(ラットCTLsが認識するHT
LV-I抗原)
FPM1-V1AXを腹腔内投与したnu/+ラットか
ら単離した脾臓T細胞を、ホルマリンで固定したFPM
1-V1AXで6日間刺激したものをエフェクター細胞
として以下の実施例に用いた。標的細胞としては、FPM
1-V1AX、FPM-SV、及び、実施例4により
調製した各種HTLV-I-rvv感染FPM-SV細胞
(WR-40X、WR-27、WR-env、WR-
gag)を用いた。なお、HTLV-I遺伝子を含まな
いrvvをFPM-SV細胞に感染させたもの(WR-

HA)をコントロールとして用いた。上記HTLV-I
-rvv感染FPM-SV細胞に対して免疫蛍光分析を
行ったところ、これらの細胞はMHCクラスIに対して
陽性を示すが、MHCクラスII抗原に対しては陰性であ
ったことから、これらの細胞はMHCクラスIに限定さ
れた抗原を選択的に発現していると考えられる。

【0035】実施例3記載の方法と同様に、上記エフ
ェクター細胞(E)と標的細胞(T)とを図3に示す各E
/Tの割合で用いることにより⁵¹Cr 放出分析を行っ
た。なお、測定値(平均値±SD)は3回の実験から求
めた。その結果を図3に示す。これらの結果から、エフ
ェクター細胞は、FPM1-V1AXに対しては高い傷
害性を有するが、FPM-SV細胞に対しては傷害性を
示さなかった。また、HTLV-I-rvv感染FPM
-SV細胞のうち、HTLV-IのTaxを発現するWR
-40X感染細胞とWR-27X感染細胞はエフェク
ター細胞に対して最も高い感受性を示した。HTLV-I
のenv(エンベロープ)を発現する標的細胞もまた
感受性を示していたが、その度合いはHTLV-IのT
ax発現細胞より低かった。しかし、HTLV-Iのg
agを発現するFPM-SV細胞に対する細胞傷害活性
は、コントロールとしての標的細胞(WR-HA)に對
する細胞傷害活性と同様に低かった。

【0036】次に、非標識細胞による、標的細胞に對
するHTLV-I特異的CTL細胞株の細胞傷害性の阻害
を調べた。長期間培養することによって得られたHTLV
-IのTaxに対してより特異的なCD8⁺CTL細
胞株と、標的細胞([³H]-TdR標識FPM1-V
1AX: 5×10³細胞/ウエル)とを、E/Tの割合
が10となるように96ウエルのU底プレートに移し、
さらに競合物と標的細胞との割合が図4に示される値に
なるように競合物[非標識化FPM1-V1AX
(), G14-Tax(), 又はG14()]を
加え、37で6時間インキュベーションした。その
後、Micro96Harvester (Skatron社
製)を用いて細胞を回収した後、残存した標的細胞量を
マイクロプレート -カウンター(microplate -coun
ter; Micro Beta Plus社製)により測定し、特異的な細
胞傷害活性(%)を次式により計算した。値(平均値±
SD)は3回の実験から求めた。なお、上記標的細胞
は、あらかじめ10⁶細胞あたり3.7MBqの[³H]
-TdRと共に37で12時間インキュベーションし
た後、3回洗浄したものをを用いた。

【0037】

【数2】

$$\frac{[\text{エフェクター非存在下でのcpm} - \text{エフェクター存在下でのcpm}]}{[\text{エフェクター非存在下でのcpm}]} \times 100$$

【0038】上記の結果を図4に示す。このことから、FPM1-V1AXに対するCTL細胞株の細胞傷害活性は、非標識化G14-Taxを増加させることにより顕著に阻害されたが、G14細胞では阻害されなかった。以上のことから、HTLV-IのTaxが、インビボで同系のHTLV-I感染細胞を投与したnu/+ラット由来のCTLが特異的に認識する主な抗原であることがわかった。

【0039】実施例6(nu/+ラットにおけるHTLV-I特異的細胞傷害活性のMHCクラスI拘束)

長期培養でHTLV-I特異的CTL細胞株(2種類のCD8⁺CTL細胞株及びCD4⁺CTL細胞株)を誘導するために、2.5×10⁶細胞/ウエルの脾臓T細胞を、20U/mlのrhIL-2が添加された10%FCS-RPMI1640中で同数のホルマリン固定化FPM1-V1AX細胞といっしょに共培養し、2週間毎にホルマリン固定化FPM1細胞で定期的に刺激することにより2種類のCD8⁺CTL細胞株(CD8⁺CTL-1及びCD8⁺CTL-2)及びCD4⁺CTL細胞株を樹立し、これらの誘導されたHTLV-I特異的CTL細胞株を用いて細胞傷害活性に対するMHCクラスI拘束性を実施例5の方法と同様に調べてみた。なお、標的細胞としては、実施例5の方法と同様に[³H]-TdRで標識化された4つの細胞株、ラットMHCクラスI分子であるRT1.A¹を発現するnu/+ラット由来のFPM1-V1AXと、RT1.A¹を発現しないWKAHラット由来のW7KSVと、RT1.A¹を発現しないWKAHラット由来のTARS-1と、TARS-1細胞にRT1.A¹cDNAを安定的にトランスフェクションすることにより樹立した細胞株RT1.A¹/TARS-1とを用いた。

【0040】上記の結果を図5に示す。2種類のCD8⁺CTL細胞株(CD8⁺CTL-1及びCD8⁺CTL-2)は、TARS-1細胞ではなくRT1.A¹/TARS-1細胞を著しく溶解したが、FPM1-V1AX細胞で免疫したnu/+ラット由来のCD4⁺CTL細胞株では溶解が確認できなかった。これらのことから、nu/+ラット由来のHTLV-IのTaxに対して特異的なCD8⁺CTL細胞株の細胞傷害活性は、ラットMHCクラスIのRT1.A¹によって拘束されることがわかった。

【0041】実施例7(HTLV-I特異的CTLの認識エピトープの同定)

FPM1-V1AXで免疫したnu/+ラットから得たHTLV-IのTax特異的CD8⁺CTLが認識する標的エピトープを同定するため、ペプチドマッピング分

析を行った。ラットMHCクラスI(RT1.A¹)に拘束されるHTLV-I特異的CTL細胞株は、nu/+ラット由来HTLV-I感染細胞株FPM1-V1AXで免疫した同系免疫正常ラット由来の脾臓T細胞を、ホルマリン固定FPM1-V1AXで2週間おきに繰り返し刺激を行うことにより樹立した。また、図6、7及び8に示される、HTLV-IのTaxのアミノ酸配列に相当する一連の合成ペプチドのいくつかは、製造者が指定する化学物質やプログラムサイクルを用いて、自動ペプチド合成機(model PSSM-8; Shimazu Corporation, Kyoto, Japan)による固相ペプチド合成法により合成し、フッ化水素で樹脂から分離させた後、HPLCシステム(Model SPRINT; PE Biosystems Japan, Tokyo, Japan)の逆相クロマトグラフィーにより95%以上の純度で精製した。なお、9merオリゴペプチド(Tax179-187, 180-188, 181-189, 182-190, 183-191, 184-192, 185-193, 186-194, 187-195及びインフルエンザMatrix58-66)は、Hokudo Co.(北海道、日本)に委託合成したものを用了。

【0042】細胞傷害活性分析に用いる標的細胞を感作するために、放射性同位元素[³H]-TdRでラベルした同系ラット由来の標的細胞(G14細胞; 5×10³細胞/ウエル)に、29個の部分的に重なる合成ペプチド(15~24mers; 図6及び7に示されるTaxタンパク質における部分ペプチド)をそれぞれ10μMの濃度となるように加えて37℃で1時間培養した後、HTLV-I特異的CTL細胞株に対する感受性を6時間の[³H]-TdR遊離法で測定し、値(平均値±SD)を3回の実験から求めた。なお、E/Tは10にて行った。その結果を図6及び7に示す。これらの結果から、HTLV-I特異的CTL細胞株は、ペプチドTax177-200又はTax181-195で感作した標的細胞を効果的に溶解し、また、ペプチドTax17-40、Tax33~56、Tax81-104、又はTax97-120で感作した標的細胞に対して低い細胞傷害活性を示した(図6)。長期培養したCTL株を用いた場合においても、Tax177-200又はTax181-195で感作した標的細胞を顕著に溶解するのが確認できた(図7)。Tax177-200又はTax181-195以外の合成ペプチドで感作した標的細胞では、有意の傷害性は確認できなかった。

【0043】以上のことから、Tax177-200の領域に含まれる10種の異なる9アミノ酸合成ペプチド(9mペプチド)を合成し、上記と同様の方法によりHTLV-IのTax特異的CTLエピトープの詳細なマ

ッピングを行った。使用した合成ペプチドのアミノ酸配列を表1に、これら9アミノ酸合成ペプチドを用いた細胞傷害活性分析の結果を図8に示す。その結果、ペプチドTax180-188、Tax181-189で感作した標的細胞が特に強いCTL感受性を示し、次いでTax179-187、Tax182-190で感作した標的細胞がCTLに対して感受性を示していたが、Ta*

*x179~187においては、複数の実験で異なる結果が得られた。以上の結果からTax180-188~Tax182-190に、HTLV-I特異的CTLの認識する主要エピトープが存在する可能性が示唆された。

【0044】

【表1】

ペプチド	アミノ酸配列
Tax 177-200	GQLGAFLTNVPYKRIEELLYKISL
Tax 181-195	AFLTNPYKRIEELL
Tax 179-187	LGAFLTNVP
Tax 180-188	GAFLTNPY
Tax 181-189	AFLTNPYK
Tax 182-190	FLTNPYKR
Tax 183-191	LTNPYKRI
Tax 184-192	TNPYKRIE
Tax 185-193	NPYKRIEE
Tax 186-194	VPYKRIEEL
Tax 187-195	PKRIEELL
Tax 190-198	RIEELLYKI
Tax 11-19 (コントロールペプチド)	LLFGYPVYV

【0045】次に、主要な認識エピトープを明らかにするためCTLの傷害活性誘導に必要なTax180-188、Tax181-189、Tax182-190のペプチド濃度を検討した。段階希釈した各ペプチドであらかじめ1時間処理した標的細胞G14をHTLV-I特異的CTL細胞株と共培養し、標的細胞のCTL感受性を検討した。なお、E/Tの割合は10で行い、値(平均値±SD)は3回の実験から求めた。その結果を図9に示す。これらの結果から、Tax180-188()で感作した標的細胞で強いCTL感受性が認められ、10⁻³pMという極めて低いペプチド濃度においてもCTLに対して感受性を示すことが明らかとなった。一方、Tax180-188と同程度の細胞傷害活性を誘導するために、Tax181-189()は1μM、Tax182-190()は10μMの濃度が必要であることがわかった。また、コントロールとして用いたTax11-19()ではいかなる濃度においてもCTL感受性は認められなかった。以上の結果から、RT1.A¹に拘束されるHTLV-I特異的CTLの主要な認識エピトープは9アミノ酸からなるペプチド、Tax180-188(GAFLTNPY:配列番号2)であることが明らかとなった。

【0046】実施例8(HTLV-IのTax特異的CTLによるTax180-188の認識)
HTLV-I特異的CTL細胞株が認識するHTLV-IのTaxの標的エピトープ中で、ペプチドTax180-188が主要なものであるかどうかについて調べるために、非標識化競合物である、無処理のG14細胞

()、10μMのTax180-188()又はTax11-19()であらかじめ感作したG14細胞、非標識化G14-Tax細胞()の存在下で、HTLV-IのTax特異的CTL細胞株の[³H]-TdR標識G14-Tax細胞に対する細胞傷害活性を測定した。なお、E/Tの割合は10で行い、値(平均値±SD)は3回の実験から求めた。その結果を図10に示す。このことから、10μMのTax180-188()で処理したG14細胞を用いた場合、放射標識したG14-Taxに対する細胞傷害活性は競合物/標的細胞(competitor/Target)の割合が40のときに完全に阻害されることがわかった。また、Tax180-188で処理されたG14細胞による競合効果は、非標識化G14-Tax()による競合効果と同程度であった。無処理のG14細胞()又は10μMの各種ペプチド[Tax181-189、Tax182-190、及びTax11-19()]で処理したG14細胞は、HTLV-IのTax特異的CTL細胞株の細胞傷害活性に対してほとんど影響がなかった。これらの結果は、エピトープTax180-188が、HTLV-IのTax特異的CTL細胞株が認識する主要エピトープであることを示唆している。

【0047】実施例9(生体内におけるTax180-188認識CTL細胞株のHTLV-I感染腫瘍細胞増殖抑制効果)
Tax180-188認識CTL細胞株が、ラット生体内におけるHTLV-I感染腫瘍細胞FPM1-V1AXの増殖を抑制しうるかどうかを調べてみた。nu/n

30

40

50

u雌ラットにHTLV-I感染腫瘍細胞FPM1-V1AX (2×10^7)のみを皮下接種したものを()をポジティブコントロールとし、FPM1-V1AXを皮下接種すると同時にTax180-188を認識するCTL細胞株 (10^7)を腹腔内投与したラット()における腫瘍増殖の抑制効果を観察した。なお、腫瘍増殖の変化は実施例3と同様にそれぞれの皮下腫瘍の大きさをカリパスで1日おきに測定し、腫瘍の大きさ ($V; \text{mm}^3$)を計測した。これら皮下腫瘍増殖の時間経過を図11に示す。この結果、FPM1-V1AXのみを接種したラット()では皮下腫瘍は増殖を続けたのに対し、CTLを同時に移入したラット()では速やかに拒絶されることが確認できた。以上のことから、Tax180-188認識CTL細胞株がHTLV-I感染腫瘍細胞の生体内増殖を抑制しうること、つまりTax180-188ペプチドが腫瘍拒絶抗原として重要なエピトープである可能性が示唆された。

【0048】実施例10 (Tax180-188及びISS-ODNによるワクチン効果)

上記決定された抗原ペプチドが実際に生体内において単独で腫瘍拒絶抗原になっているかは、この抗原ペプチドが腫瘍ワクチンモデルとしてどの程度応用しうるかを考える上で極めて重要である。そこで、次にペプチドワクチンによってTax180-188特異的CTLが生体内で誘導可能であるか、また、誘導されたCTLが生体内において抗腫瘍効果を示しうるかを検討した。より効率良くTax180-188特異的CTLを誘導するためにアジュバンドとしてCpGモチーフを含むISS-ODN (Immunostimulatory DNA sequences-oligodeoxynucleotide)を用いた (Nat. Med. 3, 849-854, 1997)。なお、ISS-ODN [ESPEC OLIGO SERVICE社製; 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' (配列番号5)]としては、モノチオリン酸塩 (Phosphorothioate) の一本鎖オリゴヌクレオチドとして合成したものをを用いた。100 μg のTax180-188合成ペプチド()、10 nmolのISS-ODN()、100 μg のTax180-188及び10 nmolのISS-ODN()、あるいは100 μg のインフルエンザA型マトリックス (Influenza A matrix) の58~66番目のアミノ酸配列からなるペプチド (GILGFVFTL; 配列番号6) 及び10 nmolのISS-ODN()をそれぞれ200 μl の生理食塩水に混合したものを4週齢の雌nu/+ラットに皮下投与し、2週間後再び同条件で免疫を行った。なお、生理食塩水のみ (naive T cells) を皮下投与した *

*ものをコントロール()とした。最終免疫から2週間後、各ラットより脾臓T細胞 (10^7 個)を分離し、4週齢のnu/nu雌ラットの腹腔内に投与した。また、腹腔内投与と同時にHTLV-I感染腫瘍細胞FPM1-V1AX (2×10^7 個)を皮下投与し、接種部位における腫瘍増殖抑制効果を実施例3と同様にそれぞれの皮下腫瘍の大きさをカリパスで1日おきに測定し、腫瘍の大きさ ($V; \text{mm}^3$)を計測した。

【0049】上記の結果を図12に示す。その結果、Tax180-188及びISS-ODN()で免疫したラット由来の脾臓T細胞を移入した群でのみ強い腫瘍増殖抑制が認められたが、Tax180-188ペプチドのみ()、ISS-ODNのみ()、あるいはInfluenza A matrix 58-66及びISS-ODN()で免疫したラット由来の脾臓T細胞を移入した群では、そのような腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。以上の結果から適当なアジュバンドを用いることによって免疫正常ラットにTax180-188特異的なCTLが誘導可能であること、また、誘導されたCTLは生体内におけるHTLV-I感染腫瘍細胞の増殖を強く抑制しうるということが明らかとなった。これらの結果は、Tax180-188が単独で腫瘍拒絶抗原として働きうること、また、Tax180-188ペプチドとISS-ODNを共に使用したワクチンにより、T細胞免疫が効果的に誘導され、生体内でのHTLV-I感染腫瘍から防御したこと、さらに、本実験系がワクチンの開発モデルとして、極めて有用であることを示している。

【0050】

【発明の効果】本発明のスクリーニング方法により得られたHTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのタンパク質、ペプチド、核酸等を免疫原とし、アジュバンドを用いて誘導したCTLは生体内におけるHTLV-I感染腫瘍細胞の増殖を強く抑制しうることから、HTLV-I腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるCTL認識抗原又は該抗原エピトープのタンパク質、ペプチド、核酸等は、成人T細胞白血病(ATL)等のHTLV-I関連疾患に対するワクチンとして有用であり、またかかるタンパク質、ペプチド、核酸等によって誘導されたCTLは、上記HTLV-I関連疾患の予防・治療薬として有用である。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Anti-tumor antigens or their epitopes against HTLV-I tumor

<130> A031P76

<140>
 <141>
 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Human T-cell lymphotropic
 virus type 1
 <400> 1
 Met Ala His Phe Pro Gly Phe Gly Gln Ser
 Leu Leu Phe Gly Tyr Pro
 1 5 10 15

 Val Tyr Val Phe Gly Asp Cys Val Gln Gly
 Asp Trp Cys Pro Ile Ser
 20 25 30
 Gly Gly Leu Cys Ser Ala Arg Leu His Arg
 His Ala Leu Leu Ala Thr
 35 40 45
 Cys Pro Glu His Gln Ile Thr Trp Asp Pro
 Ile Asp Gly Arg Val Ile
 50 55 60
 Gly Ser Ala Leu Gln Phe Leu Ile Pro Arg
 Leu Pro Ser Phe Pro Thr
 65 70 75 80

 Gln Arg Thr Ser Lys Thr Leu Lys Val Leu
 Thr Pro Pro Ile Thr His
 85 90 95
 Thr Thr Pro Asn Ile Pro Pro Ser Phe Leu
 Gln Ala Met Arg Lys Tyr
 100 105 110
 Ser Pro Phe Arg Asn Gly Tyr Met Glu Pro
 Thr Leu Gly Gln His Leu
 115 120 125
 Pro Thr Leu Ser Phe Pro Asp Pro Gly Leu
 Arg Pro Gln Asn Leu Tyr
 130 135 140
 Thr Leu Trp Gly Gly Ser Val Val Cys Met
 Tyr Leu Tyr Gln Leu Ser
 145 150 155 1
 60
 Pro Pro Ile Thr Trp Pro Leu Leu Pro His
 Val Ile Phe Cys His Pro
 165 170 175
 Gly Gln Leu Gly Ala Phe Leu Thr Asn Val
 Pro Tyr Lys Arg Ile Glu
 180 185 190
 Glu Leu Leu Tyr Lys Ile Ser Leu Thr Thr
 Gly Ala Leu Ile Ile Leu
 195 200 205
 Pro Glu Asp Cys Leu Pro Thr Thr Leu Phe

Phe Asn Glu Lys Glu Ala Asp Asp Asn Asp
 His Glu Pro Gln Ile Ser
 325 330 335
 Pro Gly Gly Leu Glu Pro Pro Ser Glu Lys
 His Phe Arg Glu Thr Glu
 340 345 350

Val
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human T-cell lymphotropic
 virus type 1
 <400> 2
 Gly Ala Phe Leu Thr Asn Val Pro Tyr
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human T-cell lymphotropic
 virus type 1
 <400> 3
 Ala Phe Leu Thr Asn Val Pro Tyr Lys
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human T-cell lymphotropic
 virus type 1
 <400> 4
 Phe Leu Thr Asn Val Pro Tyr Lys Arg
 1 5

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: ISS-ODN
 <400> 5
 tgactgtgaa cgttcgagat ga
 23 22

24

【図面の簡単な説明】
 【図1】インビボでの腫瘍の退行に直接必要とされる免疫T細胞のサブセットを調べる結果を示す図である。
 【図2】腫瘍が完全に退行したマウス由来の各種脾臓T細胞の標的細胞に対する細胞傷害活性についての結果を示す図である。

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5

【図3】HTLV-I特異的CTLsが認識するウイルス性抗原を調べた結果を示す図である。
 【図4】競合物存在下におけるHTLV-I特異的CTL細胞株の標的細胞に対する細胞傷害性の阻害についての結果を示す図である。
 【図5】HTLV-I感染腫瘍細胞株FPM1-V1A

Xにより誘導された各種CTLの細胞傷害活性の結果を示す図である。

【図6】HTLV-I特異的CTL細胞株認識ペプチドのスクリーニングによる結果を示す図である。

【図7】長期培養したCTL株を用いた場合のHTLV-I特異的CTL細胞株認識ペプチドのスクリーニングによる結果を示す図である。

【図8】HTLV-I特異的CTL細胞株が認識する9アミノ酸合成ペプチドのスクリーニングによる結果を示す図である。

*【図9】各種ペプチド濃度で感作した標的細胞に対するCTLの細胞傷害活性を調べた結果を示す図である。

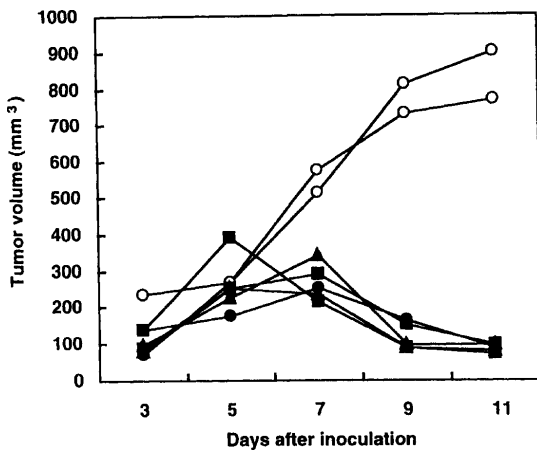
【図10】HTLV-I特異的CTL細胞株の合成ペプチドTax180-188に対する特異性を示す図である。

【図11】Tax180-188認識CTL細胞株の生体内におけるHTLV-I腫瘍増殖抑制効果の結果を示す図である。

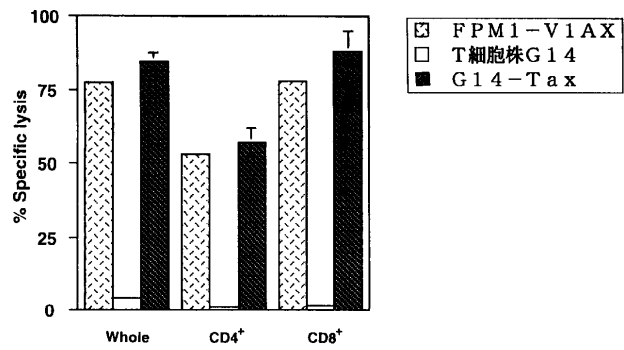
【図12】Tax180-188及びISS-ODNのワクチンとしての有効性を示す図である。

*10

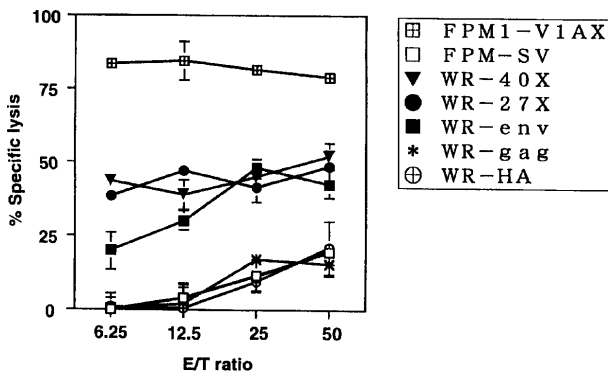
【図1】



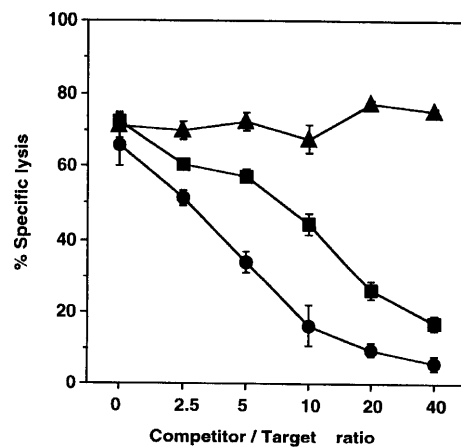
【図2】



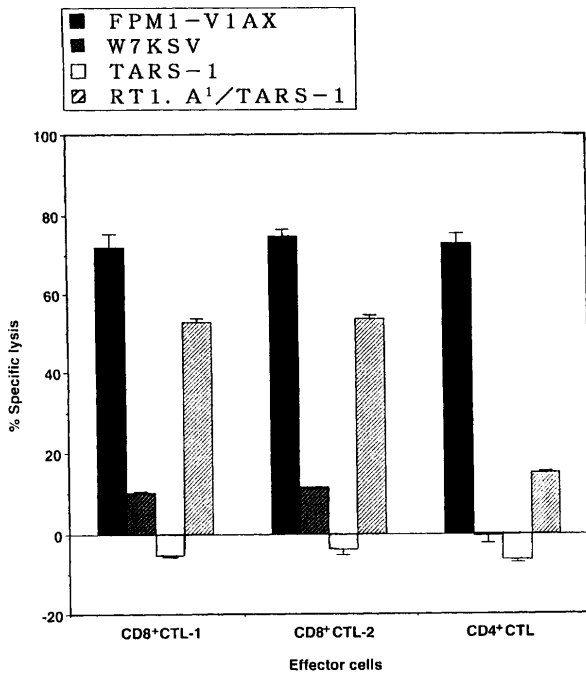
【図3】



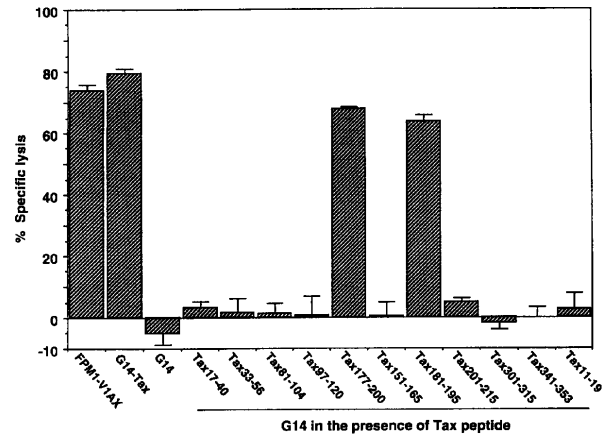
【図4】



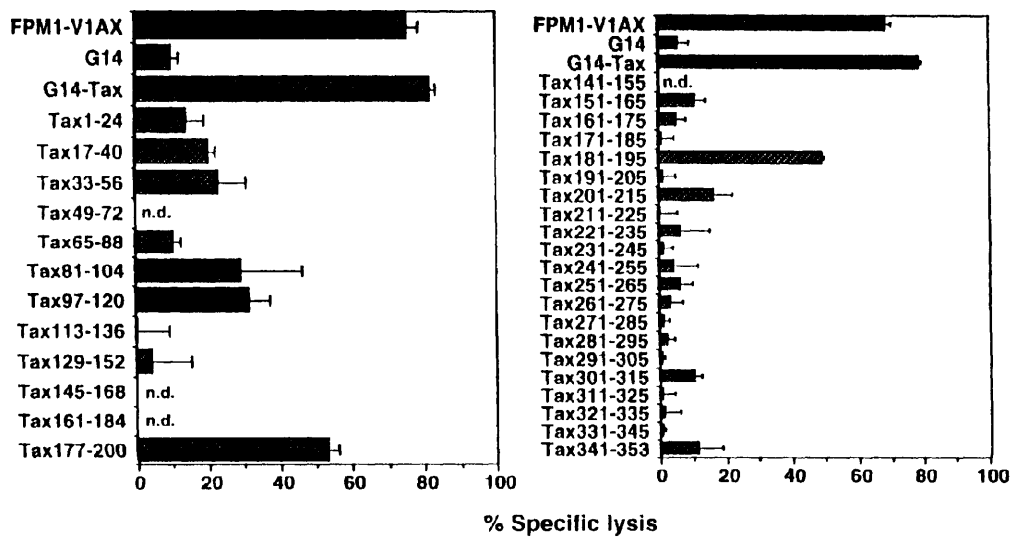
【図5】



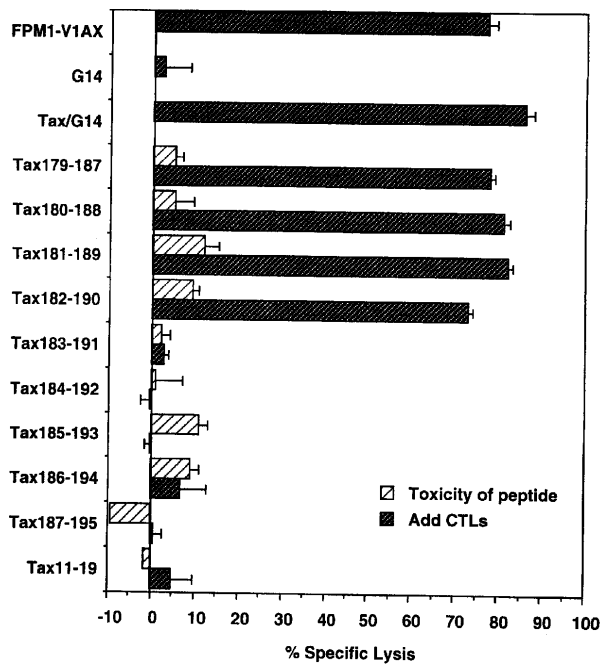
【図7】



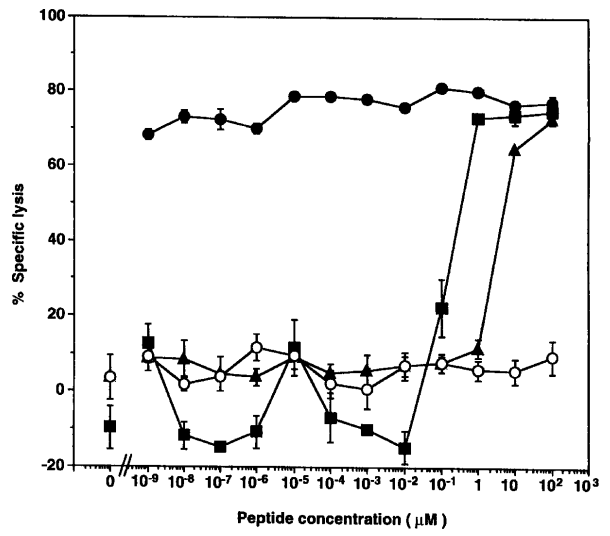
【図6】



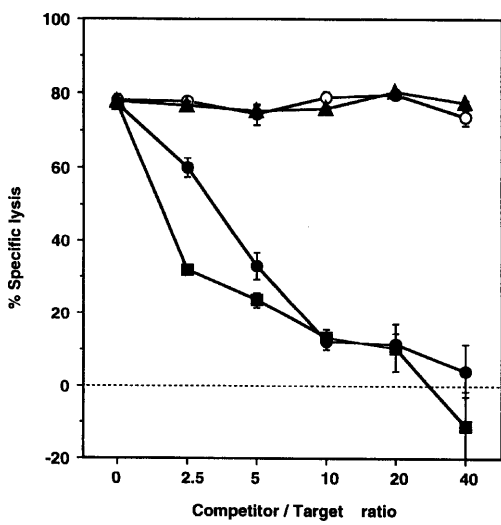
【図8】



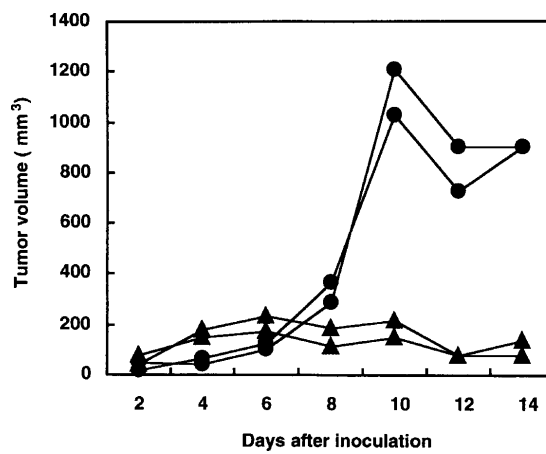
【図9】



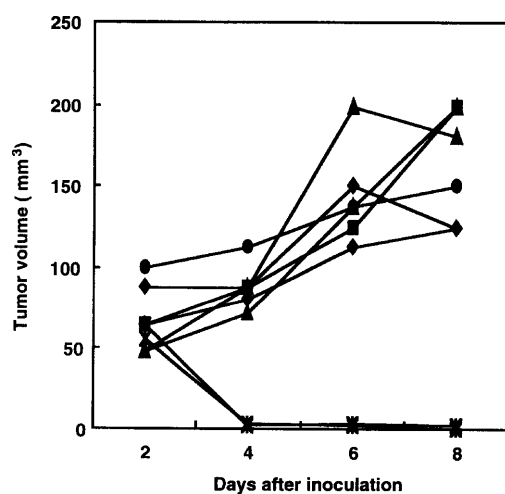
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 P 37/04
 C 0 7 K 7/06
 C 1 2 N 5/06
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/00
 33/15
 33/53
 33/566
 33/574

識別記号

Z N A

F I

A 6 1 P 37/04
 C 0 7 K 7/06
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/00
 33/15
 33/53
 33/566
 33/574
 C 1 2 N 5/00

テーム(参考)

Z N A

D

Z

D

M

C

E

(72)発明者 神奈木 真理

東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯
 科大学内

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13

DA14 DA36 FB02

4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR77 QX07

4B065 AA90X CA24 CA45 CA46

4C085 AA03 BA68 BB01 CC01 CC08

CC21 EE01 GG01 GG08

4H045 AA11 AA30 BA15 CA41 DA86

EA28 EA50 FA20

专利名称(译)	针对HTLV-1肿瘤的抗肿瘤抗原或其抗原表位		
公开(公告)号	JP2002372532A	公开(公告)日	2002-12-26
申请号	JP2001137526	申请日	2001-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	花渊志野 大橋貴 神奈木真理		
发明人	花渊 志野 大橋 貴 神奈木 真理		
IPC分类号	A61K35/12 A61K39/00 A61K39/21 A61K49/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 C07K7/06 C07K14/15 C12N5/06 C12N5/07 C12N5/0783 C12N5/09 C12Q1/02 G01N33/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/0011 A61K49/0008 A61K2035/124 A61K2039/515 A61K2039/53 A61K2039/57 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 C07K14/005 C12N2740/14022 G01N33/505 G01N33/6878 G01N2333/15		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K39/00.H A61K39/21 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 C07K7/06 C12Q1/02.ZNA G01N33/00.D G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.C C12N5/00.E C12N5/00.202.L C12N5/00.202.U C12N5/0783 C12N5/09		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QX07 4B065/AA90X 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA68 4C085/BB01 4C085/CC01 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/CA41 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA20		
其他公开文献	JP3536039B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：免疫对HTLV-1肿瘤具有抗肿瘤作用的CTL识别抗原，例如ATL或其抗原表位，并获得获得的CTL识别抗原或其抗原表位或编码该DNA的DNA作为活性成分。提供用于诱导反应的疫苗。解决方案：用福尔马林固定的HTLV-I感染细胞系刺激源自经HTLV-I感染细胞系免疫的免疫正常大鼠的脾T细胞，以建立HTLV-I特异性CTL细胞系，测量HTLV-1特异性CTL细胞系对合成肽致敏的靶细胞G14的细胞毒活性，以鉴定主要表位GAFLTNVPY。用这种表位合成肽和佐剂免疫正常大鼠，以诱导肿瘤抗原表位特异性CTL并体内抑制HTLV-1感染的肿瘤细胞的生长。

【图 1】

