

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-232697  
(P2006-232697A)

(43) 公開日 平成18年9月7日(2006.9.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/475 (2006.01)</b>	C07K 14/475 ZNA	4C085
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A61K 39/00 H	4H045
<b>A61P 7/06 (2006.01)</b>	A61P 7/06	
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	
<b>A61P 37/04 (2006.01)</b>	A61P 37/04	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-47267 (P2005-47267)	(71) 出願人 599045903 学校法人 久留米大学 福岡県久留米市旭町67番地
(22) 出願日 平成17年2月23日 (2005.2.23)	(74) 代理人 100068526 弁理士 田村 恭生
特許法第30条第1項適用申請有り 平成16年8月30日 日本血液学会事務局、日本臨床血液学会事務局発行の「第66回 日本血液学会総会、第46回 日本臨床血液学会総会 同時開催プログラム・抄録集」に発表	(74) 代理人 100103230 弁理士 高山 裕貢
	(74) 代理人 100087114 弁理士 齋藤 みの里
	(72) 発明者 伊東 恭悟 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
	(72) 発明者 竹田津 宏子 福岡県久留米市城南町8-10 ロフティ 一城南801号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロンボポエチン由来ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 トロンボポエチン(TPO)は化学療法に起因する血小板減少症の軽減に有用であるが、一部患者に逆に血小板減少を来す事がある。その処置および診断に有用な、TPO由来ペプチドを提供する。

【解決手段】 TPOに対する液性および細胞性免疫応答を誘導する、5種のTPO由来ペプチドを見出した。これらのペプチドを認識する抗体の有無を患者血漿において調べることにより、TPO投与の危険性の判断を行う。また、TPOに対する自己免疫応答を減弱させるため、そのペプチドを含む医薬組成物を用いる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫応答を誘導するトロンボポエチン由来ペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体。

## 【請求項 2】

免疫応答が液性免疫応答である、請求項 1 記載のペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体。

## 【請求項 3】

免疫応答が液性免疫応答および細胞性免疫応答である、請求項 1 記載のペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体。

10

## 【請求項 4】

配列番号：1 から 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体。

## 【請求項 5】

血小板減少症患者に対する T P O 投与の危険性を判断するためのデータを収集する方法であって、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドまたは誘導体を認識する抗体の存在を血小板減少症患者から採取した血漿において調べることを含む方法。

## 【請求項 6】

該データが、該抗体が存在する場合に T P O 投与が危険であると判断するためのデータとなる、請求項 5 記載の方法。

20

## 【請求項 7】

T P O に対する自己免疫応答を減弱させるための、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドまたは誘導体を含有する医薬組成物。

## 【請求項 8】

悪性腫瘍を処置するための、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドまたは誘導体を含有する医薬組成物。

## 【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドまたは誘導体を認識する抗体。

## 【請求項 10】

免疫応答を誘導するトロンボポエチン由来ペプチドを認識する抗体を検出するための、配列番号：1 から 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むトロンボポエチン由来ペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体を含むキット。

30

## 【請求項 11】

血小板減少症患者に対する T P O 投与の危険性を判断するための、請求項 10 記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血小板減少症の治療において有用なトロンボポエチン由来ペプチドに関する。詳細には、本発明は、免疫応答を誘導するトロンボポエチン由来ペプチド、そのペプチドを含む医薬組成物およびそのペプチドに対する抗体を検出するためのキット等に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

トロンボポエチン ( T P O ) は、血小板産生の重要な調節因子であり、血小板を産生する巨核球の成長および巨核球からの血小板の産生を刺激する ( 非特許文献 1 )。T P O は、肝臓において 3 5 3 アミノ酸の前駆タンパク質として合成され、2 1 アミノ酸のシグナルペプチドが切断されて成熟分子となる。その成熟分子は、エリスロポエチンと相同性の高い 2 つのドメインと、そのタンパク質の安定性に重要な高度にグリコシル化されたカル

50

ボキシ末端より構成される（非特許文献2）。ある種の血小板減少性障害の患者においてはTPOの産生が上昇することが観察されているが、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）の患者では上昇がみられない（非特許文献3、4）。これまでに、2種類の組換えTPOが大規模な臨床試験に用いられた。1つは、天然のTPOと同じアミノ酸配列を有するグリコシル化分子である組換えヒトTPO（rHuTPO）であり、もう1つは、天然のTPOの生物活性ドメインに相当する1-163アミノ酸を含む非グリコシル化分子であるポリエチレングリコール（PEG）結合組換えヒト巨核球成長および発達因子（PEG-rHuMGDF）である（非特許文献1、2、5）。両TPOはヒトにおける血小板産生の強力な刺激物質であり、化学療法に起因する血小板減少症を軽減する能力を有し、血小板輸血の必要性を減少させ得る点で有益である（非特許文献6、7）。しかしながら過去10年間に行われた臨床研究において、PEG-rHuMGDFが内生のTPOと交差反応する抗体を誘導し、健常人の4%および集中的な化学療法を受けた癌患者の0.6%において血小板減少症を誘発した（非特許文献5）。注目すべきは、健常人が2、3回のTPO投与後に血小板減少症を示したのに対して、癌患者はより多くの回数の投与を受けた後に血小板減少症を示したことである（非特許文献2）。言い換えれば、免疫機能が正常に維持されている被験者は、低用量のTPOにより血小板減少症を示すようであることである。このことは、自己免疫反応が血小板減少症に関与することを示唆する。しかしながら、被験者のT細胞に認識されるTPOの免疫原性エピトープはいまだ同定されていない。

10

20

30

40

50

#### 【0003】

【非特許文献1】Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998; 339:746-754.

【非特許文献2】Kuter DJ, and Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002; 100:3457-3469.

【非特許文献3】Yang C, Li YC, and Kuter DJ. The physiological response of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat. *Br J Haematol* 1999; 105:478-485.

【非特許文献4】Kappers-Klunne MC, de Haan M, Struijk PC et al. Serum thrombopoietin levels in relation to disease status in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001; 115:1004-1006.

【非特許文献5】Kuter DJ. Future directions with platelet growth factors. *Semin Hematol* 2000; 37:41-49.

【非特許文献6】Vadhan-Raj S, Verschraegen CF, Bueso-Ramos C et al. Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer. *Ann Intern Med* 2000; 132:364-368.

【非特許文献7】Vadhan-Raj S, Patel S, Bueso-Ramos C et al. Importance of predosing of recombinant human thrombopoietin to reduce chemotherapy-induced early thrombocytopenia. *J Clin Oncol* 2003; 21:3158-3167.

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0004】

本発明は、血小板減少症の分子機構を解明して血小板減少症の治療に寄与し得るTPO由来ペプチドを同定することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

本発明者らは上記目的を達成するために、HLA-A2抗原結合モチーフに基づいて18個のTPO由来ペプチドを作成し、それらペプチドに特異的な抗体が血小板減少症患者および健常人の血漿中に存在するかについて検討した。その結果、液性免疫応答を誘導するTPO由来ペプチドが同定された。次に、液性免疫応答を誘導するTPO由来ペプチドが、血小板減少症患者および健常人由来の末梢血単核球からペプチド特異的な細胞傷害性

T細胞を誘導し得るかについて検討し、液性免疫および細胞性免疫応答の両方を誘導する5つのペプチド(TPO-89、-101、-109、-162および-164)を同定した。更に、これらのペプチドにより誘導されたCTLが、TPOを産生する肝細胞癌細胞株を傷害することを見出した。また、本発明者らは、血小板減少症患者は健常人と比較してTPOに対する自己抗体保有率が高く、自己抗体を有する被験者では抗ペプチド抗体が多く検出されることを見出した。これらの結果に基づいて、本発明が完成した。

#### 【0006】

即ち、本発明は以下のものを提供する；

(1) 免疫応答を誘導するトロンボポエチン由来ペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体；特に、免疫応答が液性免疫応答であるペプチドまたは誘導体、あるいは、免疫応答が液性免疫応答および細胞性免疫応答であるペプチドまたは誘導体；具体的には、配列番号1から5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体；

10

(2) 血小板減少症患者に対するTPO投与の危険性を判断するためのデータを収集する方法であって、(1)記載のペプチドまたは誘導体を認識する抗体の存在を血小板減少症患者から採取した血漿において調べることを含む方法；特に、該データが、該抗体が存在する場合にTPO投与が危険であると判断するためのデータとなる方法；

(3) TPOに対する自己免疫応答を減弱させるための、(1)記載のペプチドまたは誘導体を含有する医薬組成物；

(4) 悪性腫瘍を処置するための、(1)記載のペプチドまたは誘導体を含有する医薬組成物；

20

(5) (1)記載のペプチドまたは誘導体を認識する抗体；および、

(6) 免疫応答を誘導するトロンボポエチン由来ペプチドを認識する抗体を検出するための、配列番号：1から5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むトロンボポエチン由来ペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体を含むキット；特に、血小板減少症患者に対するTPO投与の危険性を判断するためのキット。

#### 【発明の効果】

#### 【0007】

本発明のTPO由来ペプチドに対する免疫応答の有無を血小板減少症患者において調べることにより、TPO投与時に自己免疫応答によりTPO中和抗体である自己抗体を産生し血小板減少を来す危険性について判断することができる。また、本発明のTPO由来ペプチドは、減感作療法によりTPOに対する自己免疫応答を減弱させることができる。更に、TPO産生癌細胞を標的とする悪性腫瘍を処置することができる。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0008】

##### 1. ペプチド

本発明は、免疫応答を誘導するTPO由来ペプチドを提供する。本発明において「TPO由来ペプチド」とは、TPOのアミノ酸配列(配列番号：6)の一部である連続したアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。「TPOのアミノ酸配列の一部である連続したアミノ酸配列」は、HLA抗原との結合モチーフに基づき、例えば Bioinformatics and Molecular Analysis Section (NIH, Bethesda, MD) 等のコンピューター解析により決定される。本発明のTPO由来ペプチドは、抗原提示細胞表面のHLA抗原と結合して提示される長さ、好ましくは8から11残基、より好ましくは9から10残基である。また、本発明のペプチドは、細胞内のプロテアソームで分解されて抗原提示細胞表面のHLA抗原と結合して提示される長さとなるより長いペプチド、例えば8から50残基、好ましくは8から30残基、より好ましくは8から15残基の長さのペプチドであってもよい。本発明のTPO由来ペプチドは、好ましくは配列番号：1から5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むペプチドであり、より好ましくは配列番号：1から5のいずれかに示されるアミノ酸配列であるペプチドである。

40

#### 【0009】

50

本発明のTPO由来ペプチドが誘導する免疫応答には、液性免疫応答および細胞性免疫応答が含まれる。好ましい態様において、本発明のTPO由来ペプチドは液性免疫応答を誘導し、より好ましくは、液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘導する。本発明において、「液性免疫応答を誘導する」か否かは、被験者の血漿中にそのペプチドに特異的なIgGが存在するか否かにより判断することができる。血漿中のIgGは、常套的ELISA法により検出することができる。「細胞性免疫応答を誘導する」か否かは、そのペプチドが末梢血単核球(PBMC)からペプチド特異的細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導するか否かにより判断することができる。例えば、インビトロにおいて候補ペプチドで刺激したPBMCがペプチド提示標的細胞に反応して産生する種々のサイトカイン(例えばIFN-)をELISA法等で検出することによりCTLの誘導を調べ、さらにそのCTLの細胞傷害性を<sup>51</sup>Cr放出アッセイにより検討する。

10

#### 【0010】

本発明のペプチドの「誘導体」とは、本発明のペプチドのアミノ酸配列に対して1または数個のアミノ酸の欠失、置換および/または付加などを含む改変されたアミノ酸配列を有し、かつそのペプチドの有する免疫応答誘導能を備えるペプチドを意味する。

#### 【0011】

本発明のペプチドおよび誘導体は、通常のペプチド合成により調製することができる。そのような方法として、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善(株)、1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)、1985; 医薬品の開発続 第十四巻・ペ

20

#### 【0012】

本発明のTPO由来ペプチドに対する免疫応答が観察される被験者は、既に内因性のTPOの抗原性部分で感作されていると考えられる。従って、本発明のペプチドおよび誘導体は、被験者がTPO投与を受けた場合にTPOに対する自己抗体を産生し血小板減少を来す危険性、即ちTPO投与の危険性を判断するために使用することができる。また、本発明のペプチドおよび誘導体は、以下に記載する医薬組成物の製造に用いることができる。

#### 【0013】

##### 2. データ収集方法

本発明は、血小板減少症患者に対するTPO投与の危険性を判断するためのデータを収集する方法を提供する。本方法は、血小板減少症患者から採取した血漿に存在する、本発明のペプチドまたは誘導体を認識する抗体を調べることを含む。本発明の方法には、本発明のTPO由来ペプチドおよび誘導体から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上のペプチドおよび/または誘導体について抗体の存在を調べることが包含される。特に、配列番号：1から5に示される5つのTPO由来ペプチドまたはその誘導体を認識する抗体の存在を調べるのが好ましい。抗体の存在は、常套的ELISA法により調べることができる。上記抗体が1つでも存在すれば既に内因性のTPOの抗原性部分に感作されていると考えられ、TPO投与が危険であると判断できる。

30

#### 【0014】

##### 3. 医薬組成物

本発明は、本発明のペプチドまたは誘導体を含有する医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドまたは誘導体を1つ、2つまたはそれ以上含むことができ、更に、製薬的に許容される担体、および/または賦形剤等の添加剤を含むことができる。本発明の医薬組成物は通常の製剤化技術により製造することができ、その剤型には、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤など、外因性のペプチドをHLA抗原へ効率良く抗原提示させ得る製剤が含まれる。

40

#### 【0015】

本発明の医薬組成物は、減感作療法によりTPOに対する自己免疫応答を減弱させることができる。減感作療法とは、免疫応答を誘導する物質をはじめは少量、低濃度で投与し

50

、徐々に大量、高濃度に変化させてその物質に対する過敏性を減弱させることを目的とした治療法である。本発明のTPO由来ペプチドは、TPOの抗原性を決定している部分の一部である可能性がある。従って、内因性のTPOに対する自己免疫応答を示す被験者では、上記の「免疫応答を誘導する物質」として本発明のTPO由来ペプチドを用いて、TPOに対する免疫応答を減弱できる可能性がある。医薬組成物の投与方法としては、皮内投与、皮下投与または静脈注射が挙げられる。その投与量は、処置対象の疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、医薬組成物中の本発明のペプチドまたは誘導体の量として通常0.0001mg~1000mg、好ましくは0.0001mg~100mg、より好ましくは0.001mg~10mgの範囲内で投与量を変化させ、数日、数週または数ヶ月に1回の投与を1~3年継続することが好ましい。

10

## 【0016】

また、本発明の医薬組成物は、例えば癌ワクチンとして、TPO産生癌細胞を標的とした悪性腫瘍の処置に用いることができる。TPO産生癌細胞としては、肝癌細胞、腎癌細胞が挙げられる。本発明の医薬組成物は、液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を効率的に誘導するように、アジュバントとともに投与することができる。その投与方法としては、皮内投与、皮下投与または静脈注射が挙げられる。医薬組成物の投与量は、処置対象の疾患の状態、個々の患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、医薬組成物中の本発明のペプチドまたは誘導体の量で通常0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~1000mg、より好ましくは0.1mg~10mgであり、これを数日ないし数週に1回投与するのが好ましい。

20

## 【0017】

## 4. 抗体

本発明は、本発明のペプチドまたは誘導体を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が含まれる。本発明はまた、本発明のペプチドまたは誘導体を認識するFab、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvのような抗体断片をも包含する。本発明の抗体は、例えば"Antibodies: A Laboratory Manual", Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989に記載される方法に従い容易に調製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドまたは誘導体の精製に使用することができ、本発明のペプチドまたは誘導体を認識する抗体の検出において、標準品として使用することもできる。

30

## 【0018】

## 5. キット

本発明は、免疫応答を誘導するTPO由来ペプチドを認識する抗体を検出するのに用いる、配列番号：1から5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むTPO由来ペプチドまたは機能的に同等の性質を有するその誘導体を含むキットを提供する。本発明のキットはまた、適当な緩衝液、発色剤、反応停止剤等を含むことができる。本発明のキットは、血小板減少症患者から採取した血漿を試料として、TPO投与の危険性を判断するために用いることができる。

## 【実施例】

## 【0019】

本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、本発明はいかなる意味においてもこれら実施例に限定されない。

40

## 【0020】

## 1. 方法

## 1.1 ペプチド合成

コンピューター解析(Bioinformatics and Molecular Analysis Section, NIH, Bethesda, MD)により、HLA-A0201分子に結合する能力に基づいて18個のTPO由来ペプチドを合成した(株式会社バイオロジカ、名古屋、日本)。これらペプチドを表2に示す。HLA-A2結合モチーフを有するHIVペプチド(SLYNTVATL)を陰性対照として使用した(11)。ペプチドは全て、ジメチルスルホキシドに濃度10mg/

50

ml で溶解した。

【0021】

1.2 被験者

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染が陰性である血小板減少症患者24人および健康人(HD)24人が本研究に参加した。血小板減少症患者およびHDの特性を表1に示す。

【表1】

表1: 患者および特性

疾患	患者			合計	HD
	ITP	AA	その他		
患者数	14	6	4	24	24
年齢中央値(範囲)	53.5(24-85)	60.2(32-79)	67(49-76)	57.4	36.9(26-60)
男性比率(対女性)	0.4	0.5	1	0.5	1.2
血小板数中央値	6.45	5.15	4.45	5.79	22.9
TPO中央値(fmol/ml)	1.27	21.3	2.66	6.5	1.72

血小板減少症患者は、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)患者14人、再生不良性貧血患者(AA)6人、骨髄異形成症候群患者(MDS)2人、前立腺癌関連骨転移患者1人および原発性脾腫患者1人であり(表1)、平均年齢は57.4歳であった。血小板数および疾患分類に関して有意な差異は存在しなかった。ITPおよびAAの群では通常通り女性の割合が大きかった。AA患者では他の患者および健康人と比較して血清TPOレベルが高かったが、これも既報の観察結果から予想されることであった(Emmons RV, Reid DM, Cohen RL et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. Blood 1996; 87:4068-4071)。患者およびHDから血液を採取し、ヘパリン処理した血液20mlからFicoll-Conray密度勾配遠心法により血漿および末梢血単核細胞(PBMC)を得た。PBMC上のHLA-A2分子の発現は、既報のように(Matsueda S, Kobayashi K, Nonaka Y et al. Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2(+) patients with hormone-refractory prostate cancer. Cancer Immunol Immunother 2004; 53:479-489)フローサイトメトリーにより測定した。

【0022】

1.3 抗ペプチド抗体の検出

血漿中の抗ペプチド抗体(IgG)は、既報のように(Ohkouchi S, Yamada A, Imai N et al. Non-mutated tumor-rejection antigen peptides elicit type-I allergy in the majority of healthy individuals. Tissue Antigens 2002; 59:259-272)ELISAにより測定した。具体的には、ペプチド(20µg/ウェル)を固定化したプレートをブロックエース(雪印、東京、日本)によりブロックし、0.05%Tween20-PBSにより洗浄した。0.05%Tween20-ブロックエースで希釈した血漿を、100µl/ウェルにてそのプレートの添加した。37℃で2時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、さらに1:1000希釈ウサギ抗ヒトIgG抗体(鎖特異的:DAKO, Glostrup, Denmark)と2時間インキュベートした。そのプレートを再び洗浄し、1:100希釈ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIg抗体(DAKO)100µlを各ウェルに添加し、プレートを40分間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、テトラメチルベンジン基質溶液(KPL, Guildford, UK)を100µl/ウェルでプレートの添加し、その後1Mリン酸を添加して反応を停止させた。抗ペプチド抗体のレベルを評価するため、各試料の吸光度(OD)を段階希釈した標準試料と比較した。その値をODユニットで示す。カットオフ値は、HDの抗HIVペプチドIgGの平均+2S

10

20

30

40

50

Dが0.02 + 0.04であることに基づき、血漿希釈1:100でOD値0.06(平均+2標準偏差)とした。抗ペプチド抗体のペプチド特異性を確認するため、ペプチドをコートしたウェル中で試料100 $\mu$ lをインキュベートしてペプチド特異的な抗ペプチドIgGを吸収し、得られた試料中の抗ペプチドIgGのレベルを測定した。抗ペプチド抗体が完全長のTPOを認識するか否かについては、組換えヒトTPO(rhTPO)およびヒトアルブミン(陰性対照)を用いて吸収試験により検討した。

#### 【0023】

##### 1.4 TPO由来ペプチドによるペプチド反応性CTLの誘導

PBMC(1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェル)を各ペプチド(10 $\mu$ M)とU底96ウェルマイクロカルチャープレート(Nunc, Roskilde, Denmark)にて培養培地200 $\mu$ l中でインキュベートした。培地は、45%RPMI-1640、45%AIM-V(Invitrogen, Carlsbad, California)、10%FCS、100U/ml IL-2および0.1mM MEM非必須アミノ酸溶液(Invitrogen)より構成された。第3、6および9日目に、培地の半分を除去し、同じペプチド(20 $\mu$ g/ml)を含有する新しい培地と置き換えた。培養第12日目に細胞を回収し、対応ペプチドまたは陰性対照のHIVペプチドのいずれかを事前にロードしたHLA-A2発現T2細胞に应答してIFN- $\gamma$ を産生する能力について試験した。各ペプチドにつき4つのウェルを準備し、デュプリケートでアッセイを行った。データでは、得られた値からHIVペプチドに対するバックグラウンドのIFN- $\gamma$ 産生を差し引いた。ペプチド反応性CTLの誘導は、対応ペプチドに应答してペプチド刺激PBMCより産生されたIFN- $\gamma$ の平均値が、HIVペプチドに应答して産生されたものより有意に(P<0.05)高かった場合に、CTLの誘導が陽性とした。IFN- $\gamma$ の産生は、既報のように(Matsueda S, Kobayashi K, Nonaka Y et al. Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2(+)  
patients with hormone-refractory prostate cancer. Cancer Immunol Immunother 2004; 53:479-489) ELISAにより検討した。

#### 【0024】

##### 1.5 細胞傷害性アッセイ

ペプチド反応性CTLを上記培地中でペプチドなしでさらに培養し、細胞傷害性アッセイを行うのに十分な数の細胞を得た。これら細胞の細胞傷害性について、既報のように(Matsueda S, Kobayashi K, Nonaka Y et al. Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2(+)  
patients with hormone-refractory prostate cancer. Cancer Immunol Immunother 2004; 53:479-489)標準的<sup>51</sup>Cr放出アッセイにより試験した。ペプチド反応性CTLの細胞傷害性を調べるため、標的細胞として事前に対応ペプチドまたはHIVペプチドをロードしたT2細胞(ATCC番号: CRL-1992)を使用した。また、細胞内機構により分解されMHCクラスI分子に提示された内因性のTPOに由来するペプチドに対する反応性を検討するため、2種類のTPO産生肝細胞癌細胞株、Hep-G2細胞(HLA-A 0201/2402、B 35/5105、C 0401/1602、DR 1302/1602、DQA1 0102、DQB1 0604/0502)(ATCC番号: HB-8065)およびKYN-1細胞(HLA-A 2402、B 5401、C 0102、DRB1 0405、DQA1 0301、DQB1 0401)、および陰性対照としてHLA-A0201陽性HD由来のPHA刺激PBMC(PHA幼若化T細胞)を使用した。既報のように(Sasaki Y, Takahashi T, Miyazaki H et al., Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. Blood 1999; 94:1952-1960)、培養細胞の上清を回収し、ELISAによりTPOレベル(Fmol/ml)を調べた。TPO産生肝細胞癌細胞株のTPOレベルは、Hep-G2細胞およびKYN-1細胞でそれぞれ1.36および0.83Fmol/mlであった。また、ペプチド反応性CTLによる細胞傷害性の機構を検討するため、Hep-G2細胞を標的細胞として使用して、既報のように(Matsueda S, Kobayashi K, Nonaka Y et al. Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2(+)  
patients with hormone-refrac

tory prostate cancer. Cancer Immunol Immunother 2004; 53:479-489) 遮断試験および非放射性阻害試験 (cold inhibition assay) を行った。

#### 【0025】

##### 1.6 抗TPO抗体の検出

血小板減少症患者およびHDの血漿中に存在するTPOに対する自己抗体をDot blot法により検出した。既報の結果(非特許文献1、2および5)に基づき、TPO1-163を認識する抗体を検出した。はじめに、PDVFメンブラン(Millipore, MA, USA)を100%メタノールに15秒間浸した。そのメンブランを超純水で洗浄し、PBS中で15分間平衡化した。メンブランをPBSで湿らした3MM紙上に置き、組換えヒトTPO(rhTPO Kirin、0.4mg/ml)を2μlずつドットプロットした。メンブランを乾いた3MM紙上に置き、2時間乾燥させた。メタノールで15秒間再び湿らし、超純水ですすぎ、そしてBlock Ace(雪印、東京、日本)で一晩ブロッキングした。その後ブロック溶液を吸引し、血清試料100μl(洗浄液6mlおよびBlock Ace 4ml中)を加え、振盪しながら3時間インキュベートした。メンブランをPBS-Tで簡単に2回すすぎ、洗浄パットに入れ、パット中でPBS-T 30mlにより3回洗浄した(15分-5分-5分)。ウサギ抗ヒトIgG抗体10μl(洗浄液6mlおよびBlock Ace 4ml中)を加え、振盪しながら3時間インキュベートした。その後上記と同様にして4回(15分-5分-5分-5分)洗浄した。ECLプラス(RPN 2132、Amersham Biosciences)の検出液(A液5ml+B液125μl/メンブラン)を調製し、メンブランにのせて1分間放置した。メンブランをラップで包み、30秒から1分間露出し、写真を撮影した。

10

20

#### 【0026】

##### 1.7 統計学的解析

両測スチューデントt検定を使用し、抗体レベル、IFN- $\gamma$ 産生および標的細胞の溶解(%)を比較した。0.05未満のP値を有意と判断した。

#### 【0027】

##### 2. 結果

##### 2.1 抗TPO由来ペプチド抗体の検出

18種類のTPO由来ペプチドに反応する抗体(IgG)のレベルを患者およびHDにおいて検討した結果を表2に示す。

30

【表 2】

表2: 血漿中のTPOペプチド特異的IgGの検出

TPO	配列	ITP	AA	その他	合計	HD	
35	KLLRDSHVL					3	
60	VLLPAVDFSL	2			2	3	
84	ILGAVTLLL						
89	TLLLEGVMAA	3	1	1	5	1	
90	LLLEGVMAA						10
94	GVMAARGQL	2		1	3		
101	QLGPTCLSSL	6	1	1	8	7	
109	SLLGQLSGQV	4	1	1	6		
147	AIFLSFQHLL			1	1		
162	FLMLVGGSTL	3	1	1	5	2	
164	MLVGGSTLCV	3	2	2	7	2	
187	SLVLTNLNEL	1		1	2	1	20
191	TLNELPNRT	2		1	3	1	
201	GLLETNFTA	2		1	3		
246	YLNRIHELL	1		1	2		
305	TLFPLPPTL						
312	TLPTPVVQL	1		2	3		
323	LLPDPSAPT	1		1	2		
	合計	31	6	15	52	20	
	平均数/人	2.2	1.0	3.8	2.2	0.8	30

ペプチド特異的IgGが検出された血小板減少症患者またはHDの数を示す。

## 【0028】

TPO-101 (アミノ酸位置101-110)に反応するIgGが、患者8人(33%)およびHD7人(29%)において有意なレベルで検出された。TPO-89(同89-98)、TPO-109(109-118)、TPO-162(162-171)およびTPO-164(164-173)に反応するIgGは、それぞれ5、6、5および7人の患者において検出され、HDではそれぞれ1、0、2および2人で見られた。他のペプチドに反応するIgGもまた、数人の患者においてHDよりも高い頻度で検出された。TPO-35に対するIgGはHDにおいてのみ検出され、患者では検出されなかった。IgGが検出されたTPO由来ペプチドの患者あたりの平均数は、ITP患者で2.2、AA患者で1.0、他の血小板減少性障害の患者で3.8およびHDで0.8であった。代表的結果を図1に示す。ELISAの吸光度(OD)と血漿希釈との間に直線性相関が観察され、結果が妥当であることが示された。この結果に基づき、以下の実験では、TPO-35、-89、101、-109、-162および-164の6つのペプチドについて検討した。

## 【0029】

図2は、抗ペプチド抗体の特異性を検討した代表的結果を示す。6つのペプチド(TPO-35、-89、-101、-109、-162および-164)に反応するIgGは

対応ペプチドで吸収されたが、無関係な対照ペプチド（HIVペプチド）では吸収されなかった。他のペプチド（TPO-60、-94、-119、-191および-201）に反応するIgGも、対応ペプチドにより吸収されたが対照ペプチドでは吸収されなかった（データ非提示）。これにより抗ペプチド抗体のペプチド特異性が確認された

【0030】

図3は、上記の抗ペプチド抗体が親タンパク質であるTPOを認識するか否かについて検討した結果を示す。抗TPO抗体はrhTPOにより吸収され、陰性対照であるヒトアルブミンによっては吸収されなかった（図3A）。一方、抗ペプチド抗体は、未変性のrhTPO（Dot plot法）および変性したrhTPO（ウェスタンブロット法）のいずれとも反応せず（データ非提示）、さらに吸収試験においては、対応ペプチドによっては吸収されたが、rhTPOによっては吸収されなかった。6つのペプチド（TPO-35、-89、-101、-109、-162および-164）を認識するIgGの代表的結果を図3Bに示す。以上のように、本研究においては、抗ペプチド抗体は完全長のTPOを認識しなかった。

【0031】

2.2 TPO由来ペプチドによるペプチド反応性CTLの誘導

6つのペプチド（TPO-35、-89、-101、-109、-162および-164）のペプチド反応性CTL誘導能を、血小板減少症患者およびHDにおいて検討した結果を表3および4に示す。

【表3】

表3: 血小板減少症患者におけるTPOペプチド反応性CTLの誘導

	配列	#1	#2	#3	#4	#5	#6	合計
HIV	SLYNTVATL	1	49	93	28	0	0	0 /6
TPO35	KLLRDSHVL	18	0	64	31	11	NT	0 /5
TPO89	TLLLEGVMAA	13	31	18	27	31	0	0 /6
TPO101	QLGPTCLSSL	<u>106</u>	10	66	61	24	NT	1 /5
TPO109	SLLGQLSGQV	8	<u>208</u>	45	8	50	NT	1 /5
TPO162	FLMLVGGSTL	0	88	<u>242</u>	3	23	NT	1 /5
TPO164	MLVGGSTLCV	28	27	<u>176</u>	17	7	20	1 /6

値は、対応ペプチドをパルスしたT2細胞に反応したエフェクターPBMCによるIFN- $\gamma$ 産生を示す。

HIVペプチドに対するバックグラウンドIFN- $\gamma$ 応答を差し引き、4ウェルの内、最良の応答の結果を示す。

有意な値（ $P < 0.05$ ）に下線を付した。NT：試験せず。

10

20

30

【表 4】

表4：HDIにおけるTPOペプチド反応性CTLの誘導

配列		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	合計
HIV	SLYNTVATL	0	13	0	0	1	1	12	0	0	31	0 /10
TPO35	KLLRDSHVL	41	0	0	25	25	44	30	13	30	45	0 /10
TPO89	TLLLEGVMAA	3	0	5	0	<u>805</u>	<u>396</u>	29	31	116	<u>128</u>	3 /10
TPO101	QLGPTCLSSL	<u>165</u>	0	17	0	15	<u>148</u>	24	23	0	70	2 /10
TPO109	SLLGQLSGQV	43	0	32	4	<u>104</u>	<u>192</u>	26	77	11	34	2 /10
TPO162	FLMLVGGSTL	0	0	0	0	<u>970</u>	42	22	0	25	7	1 /10
TPO164	MLVGGSTLCV	5	10	4	8	32	<u>307</u>	39	<u>122</u>	<u>102</u>	23	3 /10

値は、対応ペプチドをパルスしたT2細胞に反応したエフェクターPBMCIによるIFN- $\gamma$ 産生を示す。

HIVペプチドに対するバックグラウンドIFN- $\gamma$ 応答を差し引き、4ウェルの内、最良の応答の結果を示す。

有意な値 (P<0.05) に下線を付した。NT：試験せず。

TPO-89、-101、-109、-162および-164ペプチドは、6人の血小板減少症患者のうち0人または1人において、および10人のHDのうち1から3人においてペプチド反応性CTLを誘導した。一方、TPO-35ペプチドは、いずれの血小板減少症患者およびHDからもCTLを誘導しなかった。HIVペプチドに反応した患者およびHDはいなかった。

#### 【0032】

これらペプチド反応性CTLの細胞傷害性について調べた結果を図4に示す。ペプチド反応性CTLは、対応ペプチドをパルスしたT2細胞に対して、HIVペプチドをパルスしたT2細胞に対してよりも高レベルの細胞傷害性を示した(図4A)。また、Hep-G2細胞(HLA-A2<sup>+</sup>、TPO<sup>+</sup>)に対して強い細胞傷害性を示したが、KYN-1細胞(HLA-A2<sup>-</sup>、TPO<sup>+</sup>)に対しては細胞傷害性は見られないかまたは弱かった(図4B)。図5は、ペプチド反応性CTLの細胞傷害性の機構について、遮断試験および非放射性阻害試験により検討した結果を示す。Hep-G2細胞(HLA-A2<sup>+</sup>、TPO<sup>+</sup>)に対する細胞傷害性は、抗HLAクラスIモノクローナル抗体および抗CD8モノクローナル抗体の添加によって有意に遮断されたが、試験した他のモノクローナル抗体(抗HLAクラスII、抗CD4および抗CD14モノクローナル抗体)によっては遮断されなかった(図5A)。また、その細胞傷害性は、対応ペプチドをロードした非標識T2細胞によって有意に遮断されたが、HIVペプチドをロードした非標識T2細胞(陰性対照)によっては遮断されなかった(図5B)。以上の結果は、ペプチド反応性CTLの細胞傷害性はペプチド特異的であり、主としてHLA-A2拘束性にCD8<sup>+</sup>T細胞によって仲介されたことを示唆する。

#### 【0033】

#### 2.3 TPOに対する自己抗体と抗ペプチド抗体との相関

血小板減少症患者およびHDの血漿中に存在するTPOに対する自己抗体(抗TPO抗体)をDot plot法により調べた結果を図6に示す。抗TPO抗体を有するHDは23人中1人(4%)であったのに対して、血小板減少症患者では23人中6人(26%)が抗TPO抗体陽性であり、血小板減少症患者はHDと比較して抗TPO抗体陽性率が高かった。また、抗TPO抗体陽性および陰性被験者それぞれの、抗TPO由来ペプチド抗体数を表5-1および2に示す。

10

20

30

40

【表 5 - 1】

## 抗TPO抗体陽性

ID	疾患	ペプチド抗体数
2	ITP	1
6	ITP	0
10	MDS	0
11	ITP	3
16	MDS	11
17	ITP	8
26	HD	0
	合計	23
	平均	3.29

10

【表 5 - 2】

## 抗TPO抗体陰性

ID	疾患	ペプチド抗体数
1	ITP	0
4	脾腫	1
5	ITP	0
7	AA	0
8	ITP	12
9	MDS	0
12	AA	5
13	ITP	0
14	AA	0
15	ITP	0
18	ITP	0
19	ITP	2
20	ITP	0
21	AA	0
22	ITP	0
23	AA	1
24	ITP	6
26~	HD 合計	22
	合計	49
	平均	1.26

20

30

40

抗TPO抗体陰性被験者における抗ペプチド抗体の平均数は1.26であったのに対して、陽性被験者では平均数は3.29であった。抗TPO抗体を有する被験者はより多くの抗ペプチド抗体を有することから、TPO由来ペプチドはTPOに対する自己抗体の産生と何らかの関係がある可能性がある。

【0034】

50

### 3. 結論

本研究により、免疫応答を誘導する T P O 由来ペプチドが同定された。T P O 由来ペプチドにより P B M C から誘導されたペプチド特異的 C T L は、T P O 産生癌細胞株を傷害した。また、T P O 由来ペプチドと T P O に対する自己抗体との関係が示唆された。これらペプチドに対する免疫応答を示す被験者は、既に内因性 T P O の抗原性部分に感作されているといえることができる。従って、T P O 由来ペプチドに対する免疫応答は、T P O に対する自己免疫応答を示唆する。また、免疫応答を誘導する T P O 由来ペプチドは T P O の抗原性を決定する部分の一部である可能性があり、減感作療法による T P O に対する免疫応答の減弱に用いることで、抗 T P O 抗体を有する患者またはペプチド抗体を有し自己免疫応答誘導の可能性のある患者の治療に役立つと考えられる。また、本発明者らは以前に、ある種の C T L エピトープペプチドが液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を *i n v i v o* で誘導する能力を有し、ペプチドワクチン投与後の癌患者の血漿中のペプチド特異的 I g G のレベルが患者の全体的生存率とよく一致することを報告した ( Mine T , Sato Y, Noguchi M et al. Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. Clin Cancer Res 2004; 10:929-937 )。よって、免疫応答を誘導する T P O 由来ペプチドは、癌ワクチンとして T P O 産生癌細胞を処置することが示唆される。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

20

【図 1】図 1 は、血小板減少症患者および H D 由来の血漿中の抗ペプチド抗体を E L I S A により検討した結果を示す。

【図 2】図 2 は、吸収試験により、抗ペプチド抗体の特異性を検討した結果を示す。抗ペプチド抗体は、対応ペプチドでは吸収されたが、陰性対照である H I V ペプチドでは吸収されなかった。

【図 3】図 3 は、完全長の T P O に対する抗ペプチド抗体の反応性について検討した結果を示す。抗ペプチド抗体は対応ペプチドでは吸収されたが、r h T P O では吸収されなかった。

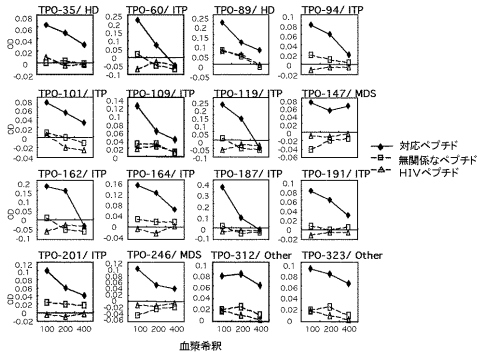
【図 4】図 4 は、T P O 由来ペプチドにより P B M C から誘導されたペプチド反応性 C T L の細胞傷害性について検討した結果を示す。ペプチド反応性 C T L は、対応ペプチドをパルスした T 2 細胞 ( A ) および H L A 適合 T P O 産生癌細胞株 ( B ) に対して細胞傷害性を示した。

30

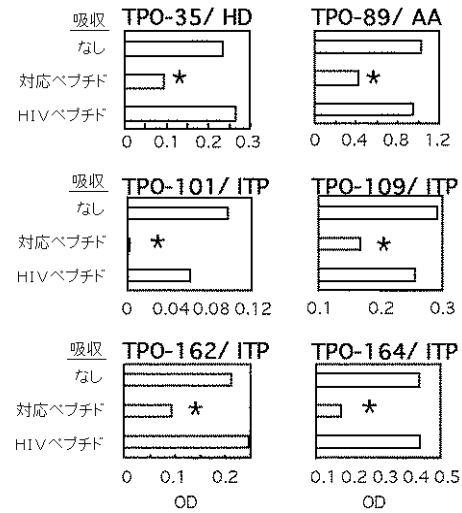
【図 5】図 5 は、ペプチド反応性 C T L による細胞傷害性の機構について、遮断試験 ( A ) および非放射性阻害試験 ( B ) を用いて検討した結果を示す。ペプチド反応性 C T L の細胞傷害性は、ペプチド特異的に、H L A クラス I 拘束性に C D 8 <sup>+</sup> T 細胞により仲介されていることがわかった。

【図 6】図 6 は、血小板減少症患者および H D の血漿中の抗 T P O 抗体を D o t p l o t 法により調べた結果を示す図面代用写真である。矢印は抗 T P O 抗体が検出されたことを表す。血小板減少症患者は、H D と比較して抗 T P O 抗体陽性率が高かった。

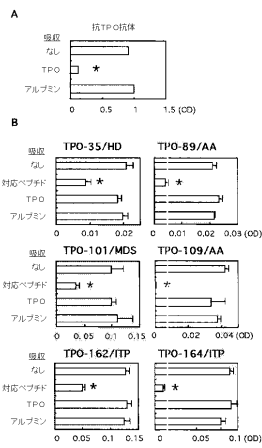
【 図 1 】



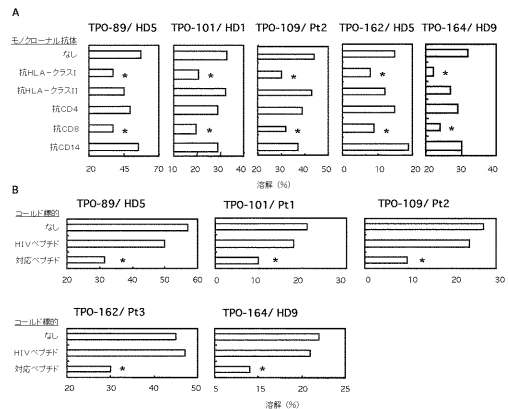
【 図 2 】



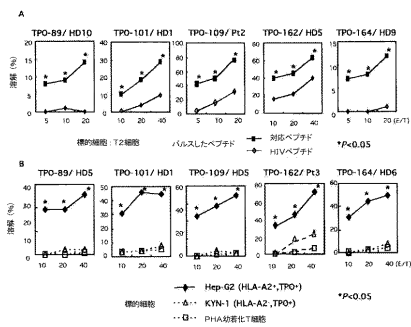
【 図 3 】



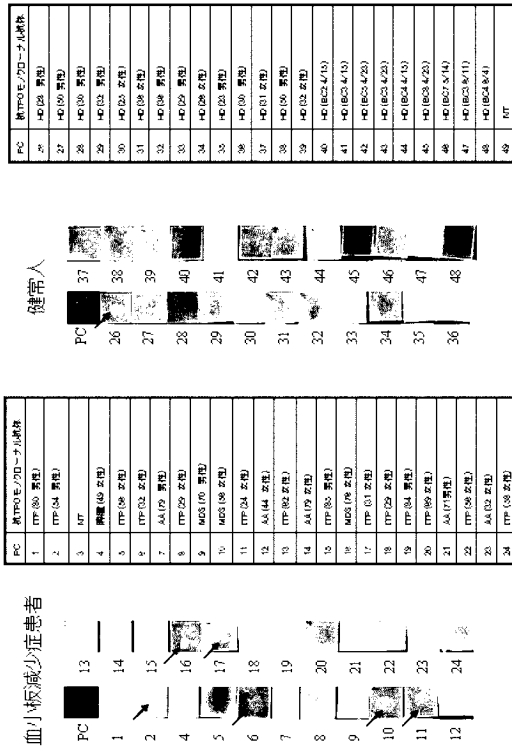
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2006232697000001.app

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 16/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	16/22	
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	N

Fターム(参考) 4C085 AA03 BB07 CC21 CC32 DD51 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA42 DA01 DA75 EA24 EA50 FA20

专利名称(译)	血小板生成素衍生肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006232697A</a>	公开(公告)日	2006-09-07
申请号	JP2005047267	申请日	2005-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	久留米大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人 久留米大学		
[标]发明人	伊東恭悟 竹田津宏子		
发明人	伊東 恭悟 竹田津 宏子		
IPC分类号	C07K14/475 A61K39/00 A61P7/06 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/22 G01N33/53		
FI分类号	C07K14/475.ZNA A61K39/00.H A61P7/06 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/22 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BB07 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD51 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA20		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：血小板生成素 ( TPO ) 可用于减少化疗引起的血小板减少症，但在某些患者中可能引起血小板减少症。提供了在它们的治疗和诊断中有用的TPO衍生的肽。已发现五种TPO衍生肽，可诱导针对TPO的体液和细胞免疫应答。通过检查患者血浆中是否存在识别这些肽的抗体来判断TPO给药的风险。另外，为了减少对TPO的自身免疫应答，使用了含有该肽的药物组合物。 [选择图]无

表1: 患者および特性

疾患	患者			HD	
	TTP	AA	その他	合計	
患者数	14	6	4	24	24
年齢中央値 (範囲)	53.5 (24-85)	60.2 (32-79)	67 (49-76)	57.4	36.9 (26-60)
男性比率 (対女性)	0.4	0.5	1	0.5	1.2
血小板数中央値	6.45	5.15	4.45	5.79	22.9
TPO中央値 (fmol/ml)	1.27	21.3	2.66	6.5	1.72