

(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 - 365286

(P2002 - 365286A)

(43)公開日 平成14年12月18日(2002.12.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	K 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/00		A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 5
	31/12	31/12	
	35/00	35/00	

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 18数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 283413(P2001 - 283413)

(22)出願日 平成13年9月18日(2001.9.18)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 345094(P2000 - 345094)

(32)優先日 平成12年11月13日(2000.11.13)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 596094371

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 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 檜田 直也

福岡県久留米市東櫛原760 - 1 ネオポリス
江上B102号

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞性免疫検出法およびその医薬への応用

(57)【要約】

【課題】 比較的少量の血液を用いても複数の抗原ペプチドに対する特異的T細胞頻度を検定できる簡便な免疫モニターリング系を提供する。

【解決手段】 抗原特異的T細胞の検出方法であって、(1)末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を抗原で頻回刺激し、(3)刺激した末梢血単核球中、該抗原に特異的なT細胞を検出する、末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗原特異的T細胞の検出方法であって、

(1) 末梢血単核球を採取し、

(2) 採取した末梢血単核球を抗原で頻回刺激し、そして

(3) 刺激した末梢血単核球中、該抗原に特異的なT細胞を検出する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法。

【請求項2】 抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 頻回刺激が2回/週以上の頻度で複数回刺激するものである、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 頻回刺激が2-5日間隔で複数回刺激するものである、請求項1または2記載の方法。

【請求項5】 抗原特異的T細胞の検出を、当該T細胞が産生するサイトカイン量を指標に行う、請求項1-4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 サイトカインがIFN- γ である、請求項5記載の方法。

【請求項7】 頻回刺激をマイクロプレートのウエル中で行う、請求項1-6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 マイクロプレートがU底マイクロプレートである、請求項7記載の方法。

【請求項9】 96穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が 2.5×10^4 個/ウエル- 2×10^5 個/ウエルである、請求項7または8記載の方法。

【請求項10】 384穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が、 2.5×10^4 個/ウエル- 1×10^5 個/ウエルである、請求項7または8記載の方法。

【請求項11】 抗原特異的T細胞と反応する抗原の検出方法であって、

(1) 末梢血単核球を採取し、

(2) 採取した末梢血単核球を複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして

(3) いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法。

【請求項12】 抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである、請求項11記載の方法。

【請求項13】 頻回刺激が2回/週以上の頻度で複数回刺激するものである、請求項11または13記載の方法。

【請求項14】 頻回刺激が2-5日間隔で複数回刺激するものである、請求項11または13記載の方法。

【請求項15】 抗原特異的T細胞誘導の判定を、当該T細胞が産生するサイトカイン量を定量することにより行う、請求項11-14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 サイトカインがIFN- γ である、請求項15記載の方法。

【請求項17】 頻回刺激をマイクロプレートのウエル中で行う、請求項11-16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 マイクロプレートがU底マイクロプレートである、請求項17記載の方法。

【請求項19】 96穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が 2.5×10^4 個/ウエル- 2×10^5 個/ウエルである、請求項17または18記載の方法。

【請求項20】 384穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が、 2.5×10^4 個/ウエル- 1×10^5 個/ウエルである、請求項17または18記載の方法。

【請求項21】 患者における目的疾患に関連する抗原を含有する、該疾患を処置するための該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医薬組成物。

【請求項22】 患者における目的疾患に関連する抗原であって、

(1) 該患者から末梢血単核球を採取し、

(2) 採取した末梢血単核球を、該目的疾患に関連すると思われる複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして

(3) いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いない方法により選定される1つまたはそれ以上の抗原、を含有する、該疾患を処置するための該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医薬組成物。

【請求項23】 抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである、請求項21または22記載の医薬組成物。

【請求項24】 疾患が癌である、請求項21または22記載の医薬組成物。

【請求項25】 患者における目的疾患に関連する抗原の治療学的有効量を投与することを特徴とする、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法。

【請求項26】 患者における目的疾患に関連する抗原であって、

(1) 該患者から末梢血単核球を採取し、

(2) 採取した末梢血単核球を、該目的疾患に関連すると思われる複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして

(3) いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いない方法により選定

される1つまたはそれ以上の抗原、を投与することを特徴とする、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法。

【請求項27】 抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである、請求項25または26記載の方法。

【請求項28】 疾患が癌である、請求項25または26記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は免疫療法の分野に属し、細胞性免疫を検定するための方法およびそれを利用する処置に関する。生体による癌細胞やウイルス感染細胞の排除には細胞性免疫に関与するT細胞、特に抗原特異的T細胞が重要な役割を果たしている。また、多発性硬化症や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患にも抗原特異的T細胞の関与が知られている。抗原特異的T細胞は、T細胞受容体(TCR)を用いて、標的細胞表面に提示された抗原ペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の複合体を特異的に認識して反応する。それによって、細胞傷害性T細胞(CTL)は癌細胞やウイルス感染細胞を傷害し、あるいは自己反応性T細胞は自己免疫疾患を引き起こすと考えられている。従って、癌やウイルス感染に対して細胞傷害性T細胞(CTL)を増強し、また自己免疫疾患に対して自己反応性T細胞を抑制することを目的とする免疫療法を適切に行うには、抗原特異的T細胞の検出が必須である。それを検出しモニターすることにより、治療前にどのような抗原ペプチドが患者にとって効果的であるかを決定し、あるいは治療後には処置に使用した抗原ペプチドの患者における効果を

【0002】

【従来の技術】抗原特異的T細胞を検出するための従来の方法として、限界希釈法、ELISPOT法、MHCテトラマー法などが知られている。限界希釈法は、段階希釈したT細胞をプレートにて培養した後、それを、抗原をパルスして提示させた標的細胞に対して反応させ、次いで各プレートにおける陽性ウエル数をもとに統計学的な処理を行って抗原特異的T細胞の頻度を算出する(J. Immunol. 126:1614-1620, 1981)。この方法は定量性に優れるが、通常、数段階の希釈を設定し、希釈段階ごとに1プレート(60-96ウエル)を用意するため、1検体を解析するために多量のT細胞サンプルを用意しなければならない。また、この方法では、抗原特異的T細胞の検出感度を上げるため、通常、1週間に1回の頻度で複数回抗原ペプチドをパルスしたリンパ球を標的細胞として用いるため、操作が煩雑である。

【0003】ELISPOT法は、サイトカインに対する抗体をウエル底面にコートしたプレートにT細胞と抗原を加えて培養し、T細胞が産生するサイトカインをト

ラップさせた後、トラップされたサイトカインを酵素標識二次抗体と発色基質を用いて視覚化し、陽性スポット数をカウントして特異的T細胞の頻度を算出する(J. Immunol. Methods, 128: 65, 1990)。この方法では、バックグラウンドが高く、スポットの陽性と陰性の判定が難しい場合がある。

【0004】MHCテトラマー法は、抗原ペプチド、MHCおよび2ミクログロブリンをin vitroで会合させたHLA・抗原ペプチド複合体の末端をビオチン化した後、蛍光標識したストレプトアビジンに結合させて作製したMHCテトラマーを用いて抗原特異的T細胞を染色し、フローサイトメーター(FACS)にて解析する(Science 275:94, 1996)。この方法は、多数の検体の解析が可能であるが、TCRとMHCテトラマーの結合のみで検出されるので、機能していないT細胞も含めて検出される。また、各ペプチドごとのHLA・抗原ペプチド複合体の作製を必要とする。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】抗原特異的T細胞を検出するための従来方法はいずれも、採取すべき血液量、簡便さ、検出感度等、何らかの問題を有している。そこで、比較的少量の血液を用いても複数の抗原ペプチドに対する特異的T細胞頻度を検定できる簡便な免疫モニターリング系の確立が望まれている。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決する手段として新たな検出方法を提供する。即ち、本発明は、抗原特異的T細胞の検出方法であって、(1)末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を抗原で頻回刺激し、そして(3)刺激した末梢血単核球中、該抗原に特異的なT細胞を検出する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法に関する。また、本発明は上記工程(3)における抗原特異的T細胞の検出を所定の抗原提示細胞を用いて行う方法を包含する。

【0007】本発明は具体的には、抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである本発明方法；頻回刺激が2回/週以上の頻度または2-5日間隔で複数回刺激するものである本発明方法；抗原特異的T細胞の検出を、当該T細胞が産生するサイトカイン量、好ましくはIFN-量を指標に行う本発明方法；頻回刺激をマイクロプレート、好ましくはU底マイクロプレートのウエル中で行う本発明方法；96穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が 2.5×10^4 個/ウエル- 2×10^5 個/ウエル、または384穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が、 2.5×10^4 個/ウエル- 1×10^5 個/ウエルである本発明方法、に関する。

【0008】従来、抗原特異的T細胞を検出するには、まず患者から採取した末梢血単核球由来の抗原提示細胞

に抗原をパルスし、これを用いてT細胞を刺激した後、所定の検出手法によって行われていた。他方、本発明は、末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いずに、抗原そのものを用いて刺激する。従って、使用する患者の血液量が少なく、操作の煩雑さがなく、一度に多数の抗原ペプチドを評価できるようになった。よって、本発明は別の態様として、抗原特異的T細胞と反応する抗原の検出手法であって、(1)末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして(3)いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法に関する。また、本発明は上記工程(3)における抗原特異的T細胞の誘導判定を所定の抗原提示細胞を用いて行う方法を包含する。

【0009】本発明は具体的には、抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである本発明方法；頻回刺激が2回/週以上の頻度または2-5日間隔で複数回刺激するものである本発明方法；抗原特異的T細胞誘導の判定を、当該T細胞が産生するサイトカイン量、好ましくはIFN-量を定量することにより行う本発明方法；頻回刺激をマイクロプレート、好ましくはU底マイクロプレートのウエル中で行う本発明方法；9穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が 2.5×10^4 個/ウエル- 2×10^5 個/ウエル、または38穴マイクロプレートを用いた場合の末梢血単核球の細胞数が、 2.5×10^4 個/ウエル- 1×10^5 個/ウエルである本発明方法、に関する。

【0010】抗原特異的T細胞と反応する抗原が簡便に検出できれば、癌、AIDS等の処置に有益な手段を提供できる。そのような抗原をコードするDNAをDNAワクチンとして用いて初期免疫し、次いで追加免疫することによりAIDSウイルスの感染を良好に防御できたことが示されている(Science 292;69-74,2001)。しかし、これは防御ワクチンとしての効能を示すのみであり、当該DNAワクチンが治療ワクチンとして有用であることを明らかにするものではない。本発明は別の態様として、患者における目的疾患に関連する抗原を含有する、該疾患を処置するための該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医薬組成物を提供する。

【0011】この態様では好ましくは、患者における目的疾患に関連する抗原であって、(1)該患者から末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を、該目的疾患に関連すると思われる複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして(3)いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いない方法により選定される1つまたはそれ以

上の抗原、を含有する、該疾患を処置するための該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医薬組成物である。具体的には、抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである本発明組成物；疾患が癌である本発明組成物；頻回刺激が2回/週以上の頻度または2-5日間隔で複数回刺激するものである本発明組成物；抗原特異的T細胞誘導の判定を、当該T細胞が産生するサイトカイン量、好ましくはIFN-量を定量することにより行う本発明組成物、に関する。

【0012】さらなる態様として、本発明は患者における目的疾患に関連する抗原の治療学的有効量を投与することを特徴とする、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法に関する。あるいは、患者における目的疾患に関連する抗原であって、(1)該患者から末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を、該目的疾患に関連すると思われる複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして(3)いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いない方法により選定される1つまたはそれ以上の抗原、を投与することを特徴とする、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法に関する。好ましくは、この態様において、治療学的有効量を投与する方法に関する。

【0013】本発明は具体的には、抗原が抗原タンパク質または該抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドである本発明方法；疾患が癌である本発明方法；頻回刺激が2回/週以上の頻度または2-5日間隔で複数回刺激するものである本発明方法；抗原特異的T細胞誘導の判定を、当該T細胞が産生するサイトカイン量、好ましくはIFN-量を定量することにより行う本発明方法、に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明が目的とする抗原特異的T細胞とは、TCRを用いて標的細胞表面に提示された抗原ペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の複合体を特異的に認識して反応するT細胞であり、例えばCTL、ヘルパーT細胞などが挙げられる。以下、抗原特異的T細胞を検出する手法および処置方法を説明する。

(1)末梢血単核球の採取

末梢血単核球の採取は、採取した末梢血からFicoll Conray溶液等を用いる比重遠心法により行う。採取した末梢血単核球は通常のリンパ球培養液にて培養する。培養した末梢血単核球は同リンパ球培養液にて適当な濃度、好ましくは 5×10^5 個/mlに懸濁し、マイクロプレートに播種する。ここで使用するマイクロプレートはU底プレートが好ましい。各ウエルには末梢血単核球の細胞数が 2.5×10^4 個/ウエル- 2×10^5 個/ウエルとな

るような量の培養液を加える。

【0015】(2) 抗原による末梢血単核球の頻回刺激末梢血単核球を刺激する抗原には、抗原自体あるいはその部分が含まれる。例えば、抗原が腫瘍抗原の場合、腫瘍に特有のタンパク質、即ち腫瘍抗原タンパク質またはその抗原タンパク質に由来する抗原ペプチドが包含される。腫瘍抗原タンパク質としては、MAGE (Science, 254:1643, 1991)、gp100 (J.Exp.Med., 179:1005, 1994)、MART-1 (Proc.Natl.Acad.Sci.US A, 91:3515, 1994)、チロシナーゼ (J.Exp.Med., 178:489, 1993)、MAGE関連タンパク質群 (J.Exp.Med., 179:921, 1994)、 α -カテニン (J.Exp.Med., 183:1185, 1996)、CDK4 (Science, 269:1281, 1995)、HER2/neu (J.Exp.Med., 181:2109, 1995)、p53 (変異型) (Proc.Natl.Acad.Sci.US A, 93:14704, 1996)、CEA (J.Natl.Cancer.Inst., 87:982, 1995)、PSA (J.Natl.Cancer.Inst., 89:293, 1997)、HPV (J.Immunol., 154:5934, 1995)、EBV (Int.Immunol., 7:653, 1995)等が挙げられる。

【0016】腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原(HLA抗原)と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。腫瘍抗原ペプチドとしては、SART-1 (J.Exp.Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号)、SART-3 (国際公開第00/12701号)等が挙げられる。抗原ペプチドはアミノ酸配列が分かれば、通常的手法、例えばFmoc法により合成できる。

【0017】「末梢血単核球を抗原で刺激する」とは、本明細書においては末梢血単核球に抗原を加え、培養してリンパ球を反応させることを意味する。末梢血単核球の刺激は、通常マイクロプレート、好ましくはU底マイクロプレートのウェル中で行う。本発明方法は、末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴としている。「直接用いない」とは、末梢血単核球の刺激に際し、抗原提示細胞を直接末梢血単核球に加えないことを意味する。

【0018】刺激の回数として従来は、1週間に1回の頻度で複数回(3回程度)のペプチド刺激を行っており、それよりも頻繁に行う必要はないと考えられていた。しかし、本発明においてはペプチド刺激を頻繁に、例えば2-5日間隔で複数回行うことにより、抗原特異的T細胞が良好に誘導されることが明らかとなった。よって、本発明の頻回刺激における「頻回」とは、2回/週以上の頻度で複数回刺激、あるいは2-5日間隔で複数回刺激することを意味する。頻回刺激での抗原特異的T細胞の誘導により、従来と異なり比較的短期間、即ち~13日で検出可能であることが明らかとなった。よって、本発明における「複数回」とは、刺激する全期間が

15日、好ましくは13日を越えない範囲にて所定の間隔で刺激することを意味する。しかし、15日を越える範囲で刺激の回数を増やしても本発明の効果に影響しない。複数回の例としては、3日間隔で刺激するならば、初日の刺激を含めて4回である。なお、頻回刺激を行う方法は、培養上清の一部を、抗原を含む新たなリンパ球培養液の同量と交換することにより行う。

【0019】(3) 刺激した末梢血単核球中、抗原に特異的なT細胞の検出

10 抗原特異的T細胞の検出は種々の方法により行うことができる。例えば、刺激した後の抗原特異的T細胞に対して適当な標的細胞を反応させ、それにより該T細胞が産生するサイトカイン、好ましくはIFN- γ を定量する方法である。標的細胞を作製するにはまず、抗原を発現していない各種細胞株に抗原特異的T細胞のHLAと適合するHLA遺伝子を導入して安定的に発現させる。これら細胞の代わりに、抗原特異的T細胞のHLAと適合するHLA遺伝子のcDNA発現プラスミドを導入した、抗原を発現していない細胞も標的細胞として用いることができる。また、標的細胞としては、抗原特異的T細胞のHLAと適合するHLAを発現しているが、抗原を発現していない各種細胞株を用いることもできる。

【0020】作製した細胞に、末梢血単核球の刺激に用いた抗原、あるいは抗原ペプチドをパルスして抗原提示細胞を作製する。ここで、末梢血単核球の刺激に用いた抗原または抗原ペプチド以外のペプチドをパルスし、対照としての標的細胞を作製する。これにより、培養した末梢血単核球との反応後のサイトカイン量をそれぞれELISA法等により定量し、対照との差を用いて目的の抗原特異的T細胞の産生を評価する。

【0021】(4) 抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかの判定

本発明は別の態様として、抗原特異的T細胞と反応する抗原の検出方法を提供する：(1)末梢血単核球を採取し、(2)採取した末梢血単核球を複数の抗原候補物質でそれぞれ頻回刺激し、そして(3)いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかを判定する、工程(2)における末梢血単核球の刺激に際し抗原提示細胞を直接用いないことを特徴とする方法である。末梢血単核球の採取、その抗原候補物質による頻回刺激は、候補物質の数だけ刺激操作が増える以外は上記と同様である。いずれの抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかの判定は上記と同様、例えば、刺激した後の抗原特異的T細胞に対して適当な標的細胞を反応させ、それにより該T細胞が産生するサイトカイン、好ましくはIFN- γ を定量し、その量を比較する方法により行う。

【0022】(5) オーダーメイド医薬組成物
本発明のオーダーメイド医薬組成物とは、個々の患者における処置しようとする個々の目的疾患に応じたそれを処置することのできる医薬組成物を意味する。例えば、

本発明医薬組成物が含有する抗原は、患者におけるHLAやワクチンとしての有効性に依りて患者間にて相違するのが通常である。本発明の抗原検出方法によれば、患者における目的疾患に固有の抗原を検出できるため、その抗原を用いればこのようなオーダーメイド医薬組成物を調製することが可能となる。この意味において本発明の「患者における目的疾患」とは患者におけるHLAに依りて患者間にて相違するある種の抗原がワクチンとして働いてそれを処置できるそのような疾患を意味する。

【0023】本発明のオーダーメイド医薬組成物には、1種のみならず、複数の異なる相当する抗原を含ませることができる。これは、全ての癌細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らないからであり、また一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることを考慮すると、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であると考えられることもその理由として挙げられる。實際上、メラノーマにおいて、単一の腫瘍抗原由来のペプチドのみでは効果が不十分であったことから、複数のペプチドのカクテル製剤の開発が試みられている (Int. J. Cancer, 66:162, 1996; Int. J. Cancer, 67:54, 1996)。

【0024】本発明のオーダーメイド医薬組成物は、癌、ウイルス疾患、感染症を予防または処置するための医薬組成物とすることができる。含有される抗原ペプチドを有効成分とする医薬組成物は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常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月に1回投与するのが好ましい。

【0025】(6) 処置方法

さらなる態様として、本発明は患者における目的疾患に関連する抗原の治療学的有効量を投与することを特徴とする、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法に関する。本発明においてオーダーメイド医療とは、個人における特定の特性に依りて個人ごとに異なり得るその個人に適合した医療である。本発明の抗原検出方法によれば、患者における目的疾患の処置に有効な固有の抗原を検出できるため、その抗原を用いればこのようなオーダーメイド医療を可能とする処置方法を行える。あるいは、患者における目的疾患に関連する抗原であって、本

発明の検出方法により選定される1つまたはそれ以上の抗原を投与する、該患者における該目的疾患に固有のオーダーメイド医療を可能とする該疾患を処置するための方法である。この方法により、さらに選定した抗原の中でより有効な抗原が臨床的に選定され得る。よって、本発明は上記処置方法において、選定された抗原の治療学的有効量を投与することを特徴とする方法をも包含する。「治療学的有効量」とは目的疾患を処置、即ち症状の予防、または発症した症状の改善または消失、またはそのような症状の特徴的徴候の軽減を可能とする投与量である。末梢血単核球の採取、その抗原候補物質による頻回刺激、抗原候補物質が抗原特異的T細胞を誘導したかの判定は上記と同様である。抗原の投与量および治療学的有効量は治療すべき疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常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月に1回投与するのが好ましい。投与方法は上記の通りである。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されない。

実施例1

EBウイルス由来抗原ペプチドを用いた抗原ペプチド特異的T細胞の検出

健康人の多くは過去のEBウイルス感染により比較的高い頻度のEBウイルス特異的T細胞プリカーサーを保持している。そこでEBウイルス感染歴のある血中抗EBウイルス抗体陽性の健康人の末梢血単核球(PBMC)からEBウイルス特異的T細胞の検出を試みた。HLA-A24陽性の健康人末梢血からFicoll Conray溶液を用いて、比重遠心法によりPBMCを分離した。PBMCは、45%RPMI1640培地、45%AIM-V (GIBCOBRL社製)、10%FCSに100U/mlインターロイキン-2、0.1mM NEAA(GIBCO BRL社製)を添加した培養液(以下、リンパ球培養液と呼ぶ)で培養した。PBMCはリンパ球培養液で 5×10^5 個/mlに懸濁し、96穴のU底プレートに200 μl /ウエルで播種した。ウエルにはEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド(アミノ酸配列: TYG PVFMCL) [J. Immunol. 158:3325-3334, 1997] を10 μg /mlになるように添加して抗原ペプチド刺激した。ウエルは3点用意した。PBMCは、インキュベーター(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂)で培養した。培養開始3日後に培養上清を100 μl 吸引して除き、新たに20 μg /mlの抗原ペプチドを含むリンパ球培養液を100 μl /ウエル添加して再刺激を行なった。培養開始6日後と培養開始9日後にも同様な培養液交換を行ない再刺激を行なった。培養開始11日後に抗原ペプチド特異的T細胞活性の検出を行なった。B細胞リンパ芽球細胞株C1R細胞にHLA-A24遺伝子を導入して安定的に発現させたC1R-A24細胞にEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドまたは陰性対照としてHIV由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド(アミノ酸配列: RYL RDQQLGI) [J. Immunol.

159:6242-6252, 1997] を10 μ g/mlの濃度で2時間パルスして抗原提示させた細胞を96穴プレートに1 \times 10⁴個/ウエル播種し、標的細胞とした。培養したPBMCを半量ずつそれぞれのペプチドをパルスした標的細胞に添加して、18時間混合培養した。培養上清を回収し、培養上清中のIFN- γ 量をELISA法により定量した。その結果、EBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドをパルスした標的細胞に対するPBMCの反応性と陰性対照のHIV由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドをパルスした標的細胞に対するPBMCの反応性との差はIFN- γ 産生量で300pg/ml以上であった。なお、本検討に用いた抗原ペプチドは、Fmoc法により作製した。以上の検討により96穴U底プレートで1 \times 10⁵個/ウエルのPBMCを2日おきに4回EBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドで刺激しながら培養することにより、抗原ペプチド特異的なT細胞が良好に誘導されることが示された。

【0027】実施例2

EBウイルス由来抗原ペプチド特異的T細胞頻度の解析
 実施例1の手法により、EBウイルス由来抗原ペプチド特異的T細胞頻度が増加していることを限界希釈法で確認した。実施例1と同一の健康人から同じ方法でPBMCを調製し、一部は抗原ペプチド刺激を行わないで、下記の抗原特異的T細胞頻度測定を行なった。また、一部のPBMCは、実施例1と同様に96穴U底プレートで1 \times 10⁵個/ウエル播種し、3日ごとに計4回EBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドで刺激しながら培養した後、下記の抗原特異的T細胞頻度測定を行なった。

【0028】抗原特異的T細胞頻度測定は以下の方法で行なった。PBMCをウエル当たり細胞数400、200、100、50、25、12.5を播種した96穴プレートを各細胞数ごとに1枚ずつ用意した。この時、フィーダー細胞(feeder cell)として放射線照射済みの同種異型(allogenic)PBMC(2 \times 10⁵細胞/ウエル)を添加し、クローニング用培養液(25%RPMI 1640と55%AIM-Vを混合したベースに20%FC *

刺激間隔(日) 刺激回数(回) 培養期間(日) EBウイルス特異的IFN- γ 産生量

				(pg/ml)
1	10	11		0
2	6	11		59
3	5	13		400
4	4	13		319

【0032】実施例4 抗原ペプチド刺激に用いるPBMCの細胞数の検討

培養に用いるPBMC細胞数の抗原特異的T細胞検出感度への影響を調べた。PBMCをウエル当たり細胞数2 \times 10⁵、1 \times 10⁵、5 \times 10⁴、2.5 \times 10⁴、1.25 \times 10⁴、0.63 \times 10⁴、0で播種した。放射線照射したPBMCを添加することにより細胞総数はすべて2 \times 10⁵個/ウエルとして培養を開始した。その他の条件は実施例1と同様にした。結果を図1

*S、1%NEAA、100U/ml IL-2、10 μ g/ml PHAを添加したもの)を用いた。13日間培養した後、各ウエル中の抗原特異的T細胞の存在の可能性を、抗原特異的T細胞がEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドパルス標的細胞と反応し産生するIFN- γ 量と陰性対照のHIV由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドパルス標的細胞と反応し産生するIFN- γ 量との差を指標に検討した。培養したPBMCと標的細胞を18時間混合培養して産生された培養上清中のIFN- γ 量はELISA法を用いて測定し、標的細胞間での差異が100pg/ml以上のウエルを陽性とし、それ以外を陰性とした。こうして得られたデータを95%の信頼区間条件で最小二乗法で解析した。抗原特異的T細胞頻度は37%のウエルが陰性な状態での細胞濃度を決定することにより計算を行った(J. Immunol. 126:1614-1620, 1981)。

【0029】その結果、抗原ペプチド刺激を行わなかったPBMC中のEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞頻度は検出限界の1/30000以下であり、実施例1の方法で抗原ペプチド刺激したPBMC中のEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞頻度は、1/5639であった。以上の検討により、実施例1の手法が抗原ペプチドに特異的なT細胞を良好に誘導することが示された。

【0030】実施例3

抗原ペプチド刺激回数の検討

抗原特異的T細胞の検出における抗原ペプチド刺激回数の影響について検討した。EBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドによる刺激回数、刺激間隔および培養期間を変更させた以外は、実施例1と同様に試験を実施した。各実験群の条件と結果を次表に示す。この結果より、2日-5日ごとの抗原ペプチド刺激により抗原ペプチド特異的T細胞が検出できることが示された。

【0031】

【表1】

に示す。培養したPBMC数に比例して、IFN- γ 量の増加が認められ、2.5 \times 10⁴個/ウエルでも検出可能であった。

図1から明らかのように、培養するPBMC細胞数とIFN- γ 産生量とは比例しており、これは最終的なIFN- γ 産生量が培養開始時の抗原特異的T細胞数を反映していることを意味する。このことは、本試験が抗原特異的T細胞頻度の定量は困難であるが、半定量的な測定は可能であることを示している。

【0033】実施例5

複数の健常人PBMCからの抗原特異的T細胞検出

HLA-A24陽性の健常人10名の末梢血からPBMCを回収し、培養開始時の細胞数を1.5×10⁵/ウエルとして、実施例1と同様の手法でEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞の検出を試みた。結果を図2に示す。IFN- γ 産生量に差はあるが、測定した10名全員でEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞が検出された。

【0034】実施例6

試験法のマイクロ化の検討

実施例1-5では、96穴U底プレートを用いて検討を行なったが、さらに多数のサンプルを測定できるシステムの構築のために384穴プレートを用いた検討をおこなった。HLA-A24陽性の健常人のPBMCを384穴プレートに培養液80 μ l/ウエルで、5×10⁴個/ウエル播種し、培養液を半量交換する時にペプチド刺激を行い(計5回のペプチド刺激)、実施例1と同様の手法によりEBウイルス由

*来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞の検出を試みた。その結果、EBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドをパルスした標的細胞に対する反応性と陰性対照のHIV由来HLA-A24拘束性抗原ペプチドをパルスした標的細胞に対する反応性の差はIFN- γ 産生量で2775pg/mlであった。このことから、アッセイシステムをマイクロ化しても抗原特異的T細胞を検出可能であることが示された。

【0035】実施例7

10 子宮頸癌患者に対する癌ワクチン治療(その1)

(1) 投与ペプチドの選択

HLA-A2陽性の子宮頸癌患者から末梢血単核球を分離し、実施例1と同様の方法により表2に示す16種類の抗原ペプチドの内、13種類の抗原ペプチドを用いて頻回刺激し、それぞれの抗原に対する特異的T細胞の反応性を調べた。

【表2】

	抗原ペプチド名称	アミノ酸配列	参考文献
①	SART3 ₃₀₂	LLQAEAPRL	Int. J. Cancer 88:633-39, 2000
②	SART3 ₃₀₉	RLAEYQAYI	Int. J. Cancer 88:633-39, 2000
③	CypB ₁₂₉	KLKHYGPGWV	Jap. J. Cancer 92:762-767, 2001
④	CypB ₁₂₇	VLEGMEVV	Jap. J. Cancer 92:762-767, 2001
⑤	Ick ₂₄₆	KLVERLGAA	Int. J. Cancer 2001, in press
⑥	Ick ₄₂₂	DVWSFGILL	Int. J. Cancer 2001, in press
⑦	EIF4E-BP ₅₁	RIIYDRKFL	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑧	ppMAPkkk ₂₉₄	GLLFLHTRT	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑨	ppMAPkkk ₄₉₂	DLLSHAFFA	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑩	WHSC2 ₁₀₃	ASLSDPWV	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑪	WHSC2 ₁₄₁	ILGELREKV	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑫	UBE2V ₄₃	RLQEWCSVI	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑬	UBE2V ₈₅	LIADFLSGL	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑭	UBE2V ₂₀₈	ILPRKHHRI	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑮	MNRPL ₁₄₁	ALVEFEDVL	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001
⑯	HNRPL ₅₀₁	NVLHFFNAPL	Cancer Res. 61:2038-2046, 2001

【0036】各ペプチドに対してリンパ球を4ウエルずつ培養し、IFN- γ 産生量の測定の時に各wellの細胞を2等分することにより8サンプルを測定した。そして培養したリンパ球が、各抗原ペプチドをパルスしたHLA-A2陽性のT2細胞(ATCCナンバー、CRL-1992)(以下、抗原ペプチド-T2細胞という)およびHLA-A2拘束性のHIV由来の

抗原ペプチド(アミノ酸配列: SLYTYATL) [J. Exp. Med. 180: 1283-1293, 1994]をパルスしたT2細胞(以下、HIV-T2細胞という)に対して反応して産生したIFN- γ 量を定量し、その差が有意であるかをt検定で調べた。結果を表3に示す。

【表3】

抗原ペプチド	IFN- γ 産生量 (pg/well)			
	第1well	第2well	第3well	第4well
SART3 ₃₀₂	<0 <i>p=0.612</i>	<0 <i>p=0.265</i>	8 <i>p=0.887</i>	<0 <i>p=0.612</i>
SART3 ₃₀₉	<0 <i>p=0.008</i>	<0 <i>p=0.618</i>	9 <i>p=0.255</i>	28 <i>p=0.414</i>
CypB ₁₇₂	22 <i>p=0.220</i>	<0 <i>p=0.557</i>	<0 <i>p=0.054</i>	<0 <i>p=0.285</i>
lck ₂₄₈	19 <i>p=0.724</i>	<0 <i>p=0.271</i>	<0 <i>p=0.141</i>	<0 <i>p=0.286</i>
lck ₄₂₂	<0 <i>p=0.916</i>	<0 <i>p=0.400</i>	<0 <i>p=0.279</i>	8 <i>p=0.885</i>
ppMAPkkk ₂₉₄	133 <i>p=0.062</i>	<0 <i>p=0.373</i>	<0 <i>p=0.361</i>	<0 <i>p=0.325</i>
ppMAPkkk ₄₃₂	137 <i>p=0.022</i>	12 <i>p=0.429</i>	<0 <i>p=0.164</i>	<0 <i>p=0.861</i>
WHSC2 ₁₀₃	74 <i>p=0.007</i>	<0 <i>p=0.950</i>	<0 <i>p=0.300</i>	<0 <i>p=0.922</i>
WHSC2 ₁₄₁	10 <i>p=0.134</i>	<0 <i>p=0.830</i>	<0 <i>p=0.858</i>	<0 <i>p=0.748</i>
UBE2V ₄₃	13 <i>p=0.617</i>	11 <i>p=0.728</i>	<0 <i>p=0.988</i>	<0 <i>p=0.074</i>
UBE2V ₈₅	7 <i>p=0.735</i>	34 <i>p=0.331</i>	<0 <i>p=0.512</i>	<0 <i>p=0.393</i>
HNRPL ₁₄₀	24 <i>p=0.452</i>	<0 <i>p=0.423</i>	13 <i>p=0.670</i>	40 <i>p=0.372</i>
HNRPL ₅₀₁	24 <i>p=0.214</i>	<0 <i>p=0.079</i>	<0 <i>p=0.093</i>	18 <i>p=0.035</i>

【0037】表中のIFN- γ 産生量は、リンパ球が、各抗原ペプチド-T2細胞に対して反応して産生されたIFN- γ 量からHIV-T2細胞に対して反応して産生されたIFN- γ 量を差し引いた値の2ウエル分の平均値である。また、差が0pg/mlより小さい場合は、<0pgと表記している。癌ワクチンとして投与するペプチドを選定する判定基準は次の通りである。各抗原ペプチド-T2細胞に反応して産生されたIFN- γ 量がHIV-T2細胞に対して反応して産生されたIFN- γ 量よりも大きくかつ有意差検定で $p < 0.05$ のウエルが1個以上存在した抗原ペプチド、または抗原ペプチド-T2細胞に反応して産生されたIFN- γ 量がHIV-T2細胞に対して反応して産生されたIFN- γ 量より大きくてその差が100pg/ml以上のウエルが存在した抗原ペプチドを、癌ワクチンとして投与するペプチドとして選択した。この子宮頸癌患者の場合、抗原ペプチド特異的T細胞の存在頻度が高く、反応性が良好なペプチド4種類ppMAPkkk₂₉₄、ppMAPkkk₄₃₂、WHSC2₁₀₃およびHNRPL₅₀₁を上記判定基準に基づいて選定した。

【0038】(2)臨床での治療効果
選定した上記4種類のペプチドについてMontanide ISA51 20

(Seppic社)を用いてW/Oエマルジョンを作製し、子宮頸癌患者に各3mgを約2週間おきに計5回、皮下投与した。投与前と投与後の腫瘍マーカーの癌胎児性抗原(CEA)と扁平上皮癌関連抗原(SCC)の測定値の推移を図3、図4に示した。また、腫瘍の縮小率を図5に示した。癌ワクチンの投与により、CEA値は低下して安定し、SCC値は上昇傾向が押さえられ、高値ながら安定する傾向が認められた。また、ワクチン投与に伴い、腫瘍が70%程度縮小するのが観察された。これらの結果より本発明の新細胞性免疫定性法により選択された抗原ペプチドを用いた癌ワクチンは癌の治療に有効であることが示された。

【0039】実施例8

子宮頸癌患者に対する癌ワクチン治療(その2)

(1)投与ペプチドの選択

HLA-A24陽性の子宮頸癌患者から末梢血単核球を分離し、実施例7と同様の方法により表4に示す14種類の抗原ペプチドの内、13種類の抗原ペプチドに対する反応性を調べた。

【表4】

	抗原ペプチド名称	アミノ酸配列	参考文献
①	SART1 ₆₉₀	EYRGFTQDF	Int. J. Cancer 81:459-466, 1999
②	SART2 ₉₃	DYSARWNEI	J. Immunol. 164:2565-2574, 2000
③	SART2 ₁₆₁	AYDFLYNYL	J. Immunol. 164:2565-2574, 2000
④	SART2 ₈₈₉	SYTRLFLIL	J. Immunol. 164:2565-2574, 2000
⑤	SART3 ₁₀₉	VYDYNCHVDL	Cancer Res. 59:4056-4063, 1999
⑥	SART3 ₃₁₅	AYIDFEMKI	Cancer Res. 59:4056-4063, 1999
⑦	CypB ₈₄	KFHRVIKDF	J. Immunol. 163:4994-5004, 1999
⑧	CypB ₉₁	DFMIQGGDF	J. Immunol. 163:4994-5004, 1999
⑨	lck ₂₀₈	HYTNASDGL	Eur. J. Immunol. 31:323-332, 2001
⑩	lck ₄₈₆	TFDYLRSVL	Eur. J. Immunol. 31:323-332, 2001
⑪	lck ₄₈₈	DYLRSVLEDF	Eur. J. Immunol. 31:323-332, 2001
⑫	ART4 ₁₇₀	AFLRHAAL	Cancer Res. 60:3550-3558, 2000
⑬	ART4 ₁₃	DYPSLSATDI	Cancer Res. 60:3550-3558, 2000
⑭	ART1 ₇₅	EYCLKFTKL	Cancer Res. 60:4830-4837, 2000

【0040】各ペプチドに対してリンパ球を3ウエルずつ培養し、IFN- γ 産生量の測定の時に各ウエルの細胞を3等分することにより9サンプルを測定した。そして培養したリンパ球が、各抗原ペプチドをパルスしたHLA-A24陽性のC1R-A24細胞（以下、抗原ペプチド-C1R-A24細胞という）およびHLA-A24拘束性のHIV由来の抗原ペプチド*

*（アミノ酸配列：RYLRDQQLGI）[前掲]をパルスしたC1R-A24細胞（以下、HIV-C1R-A24細胞という）に対して反応して産生したIFN- γ 量を定量し、かつその差が有意であるかをt検定で調べてp値を求めた。結果を表5に示す。

【表5】

抗原ペプチド	IFN- γ 産生量 ¹⁾ (pg/well)		
	第1well	第2well	第3well
SART1 ₆₉₀	<0 <i>p=0.159</i>	N.D*	133 <i>p=0.284</i>
SART2 ₉₃	<0 <i>p=0.074</i>	33 <i>p=0.500</i>	99 <i>p=0.416</i>
SART2 ₁₆₁	<0 <i>p=0.002</i>	<0 <i>p=0.795</i>	84 <i>p=0.040</i>
SART2 ₈₈₉	<0 <i>p=0.167</i>	<0 <i>p=0.261</i>	49 <i>p=0.009</i>
SART3 ₁₀₉	275 <i>p=0.251</i>	<0 <i>p=0.585</i>	N.D
SART3 ₃₁₅	38 <i>p=0.163</i>	7 <i>p=0.830</i>	424 <i>p=0.092</i>
CypB ₈₄	<0 <i>p=0.140</i>	<0 <i>p=0.896</i>	20 <i>p=0.314</i>
CypB ₉₁	N.D	2 <i>p=0.923</i>	<0 <i>p=0.776</i>
lck ₂₀₈	<0 <i>p=0.067</i>	<0 <i>p=0.244</i>	76 <i>p=0.014</i>
lck ₄₈₆	<0 <i>p=0.001</i>	<0 <i>p=0.979</i>	31 <i>p=0.111</i>
lck ₄₈₈	<0 <i>p=0.150</i>	<0 <i>p=0.657</i>	25 <i>p=0.153</i>
ART4 ₁₇₀	<0 <i>p=0.754</i>	22 <i>p=0.678</i>	<0 <i>p=0.166</i>
ART4 ₁₃	30 <i>p=0.028</i>	<0 <i>p=0.106</i>	35 <i>p=0.144</i>

*) N.D.は測定不能

【0041】表中のIFN- γ 産生量は、リンパ球が、各抗原ペプチド-C1R-A24細胞に対して反応して産生したIFN-

量を差し引いた値の3ウエル分の平均値を示した。

また、差が0pg/mlより小さい場合は、<0pgと表記した。癌ワクチンとして投与するペプチドを選定する判定基準は実施例7におけるそれと同じである。この子宮頸癌患者の場合、上記の判定基準に基づいてSART2₁₆₁、SART2₈₈₉、lck₂₀₈およびART4₃₄の4種類の抗原ペプチドを選定した。更にこれらの抗原ペプチドを用いた癌ワ*

*クチンの投与を5回以上行った後に患者の抹消血単核球を分離し、上記と同様の方法にて表4の14種類の抗原ペプチドに対する反応性を調べた。その結果を表6に示す。

【0042】

【表6】

抗原ペプチド	IFN-γ 産生量 ¹⁾ (pg/well)		
	第1well	第2well	第3well
SART1 ₆₉₀	34 <i>p=0.486</i>	148 <i>p=0.092</i>	329 <i>p=0.225</i>
SART2 ₉₃	12 <i>p=0.714</i>	58 <i>p=0.355</i>	21 <i>p=0.122</i>
SART2 ₁₆₁	12 <i>p=0.551</i>	<0 <i>p=0.291</i>	76 <i>p=0.471</i>
SART2 ₈₈₉	75 <i>p=0.231</i>	N.D.*	<0 <i>p=0.787</i>
SART3 ₁₀₉	325 <i>p=0.334</i>	N.D.	N.D.
SART3 ₃₁₅	84 <i>p=0.078</i>	<0 <i>p=0.112</i>	446 <i>p=0.121</i>
CypB ₈₄	58 <i>p=0.58</i>	<0 <i>p=0.878</i>	60 <i>p=0.155</i>
CypB ₉₁	24 <i>p=0.419</i>	168 <i>p=0.474</i>	N.D.
lck ₂₀₈	41 <i>p=0.209</i>	1473 <i>p=0.275</i>	N.D.
lck ₄₈₈	2 <i>p=0.972</i>	24 <i>p=0.568</i>	<0 <i>p=0.739</i>
lck ₄₈₈	25 <i>p=0.098</i>	99 <i>p=0.038</i>	N.D.
ART4 ₁₃	187 <i>p=0.088</i>	<0 <i>p=0.361</i>	30 <i>p=0.131</i>
ART4 ₇₅	9 <i>p=0.768</i>	2 <i>p=0.834</i>	60 <i>p=0.078</i>
ART1 ₁₇₀	3 <i>p=0.877</i>	48 <i>p=0.052</i>	53 <i>p=0.250</i>

*) N.D.は測定不能

この結果よりSART1₆₉₀、SART3₁₀₉、lck₂₀₈、lck₄₈₈の4種類の抗原ペプチドを選択して、8回目以降の癌ワクチンの投与に使用した。

【0043】(2)臨床での治療効果

4種類のペプチドは、実施例7と同様にMontanide ISA51 (Seppic社)を用いてW/Oエマルションを作製して、子宮頸癌患者に各3mgを約2週間おきに皮下投与した。1投与前と12回投与までの腫瘍マーカーの癌胎異性抗原(CE

A)の測定値の推移を図6に示した。癌ワクチンの投与により、CEA値は上昇傾向が押さえられ、高値ながら安定する傾向が認められた。また、ワクチン投与前、3回投与後、6回投与後における患者末梢血単核球のワクチン投与に用いた抗原ペプチドに対する反応性をそれぞれ、実施例1の方法に準じた方法にて測定した。その結果を表7に示す。

【表7】

抗原ペプチド	IFN-γ 産生量 (pg/ml)		
	ワクチン投与前	ワクチン3回投与後	ワクチン6回投与後
SART2 ₁₆₁	364	423	495
SART2 ₈₈₉	702	589	697
lck ₂₀₈	602	676	745
ART4 ₁₃	262	580	565

【0044】4種類の抗原ペプチドの中で、SART2₈₈₉に対する反応性に変化がなかったが、SART1₁₆₁、lck

208、及びART4₇₅に対する反応性の向上が認められ、ワクチン投与により抗原ペプチド特異的なT細胞の頻度

が高くなっていることが示唆された。このように本発明の細胞性免疫検出法は、癌ワクチンに使用する抗原ペプチドの選定のみならず、投与した抗原ペプチドに対する特異的なT細胞誘導のモニターリングやワクチン治療開始後に更に有効な抗原ペプチドを選択して投与する抗原ペプチドを変更するためデータを取得する場合にも有用であることが示された。

【0045】実施例9

抗原ペプチド	IFN- γ 産生量 (pg/well)			
	第1well	第2well	第3well	第4well
SART3 ₃₀₂	<0 <i>p=0.126</i>	<0 <i>p=0.099</i>	<0 <i>p=0.246</i>	<0 <i>p=0.070</i>
SART3 ₃₀₉	<0 <i>p=0.065</i>	<0 <i>p=0.350</i>	<0 <i>p=0.755</i>	<0 <i>p=0.206</i>
CypB ₁₇₂	<0 <i>p=0.342</i>	0 <i>p=0.989</i>	<0 <i>p=0.154</i>	<0 <i>p=0.285</i>
lck ₂₄₆	<0 <i>p=0.084</i>	<0 <i>p=0.543</i>	<0 <i>p=0.141</i>	<0 <i>p=0.055</i>
lck ₄₂₂	1 <i>p=0.929</i>	<0 <i>p=0.676</i>	<0 <i>p=0.196</i>	<0 <i>p=0.040</i>
ppMAPkkk ₂₉₄	<0 <i>p=0.562</i>	34 <i>p=0.462</i>	<0 <i>p=0.174</i>	<0 <i>p=0.365</i>
ppMAPkkk ₄₃₂	43 <i>p=0.056</i>	64 <i>p=0.008</i>	<0 <i>p=0.140</i>	5 <i>p=0.509</i>
WHSC2 ₁₀₃	3 <i>p=0.629</i>	0 <i>p=0.990</i>	<0 <i>p=0.250</i>	<0 <i>p=0.077</i>
WHSC2 ₁₄₁	6 <i>p=0.678</i>	14 <i>p=0.513</i>	<0 <i>p=0.495</i>	9 <i>p=0.438</i>
UBE2V ₄₃	<0 <i>p=0.572</i>	<0 <i>p=0.396</i>	<0 <i>p=0.633</i>	<0 <i>p=0.338</i>
UBE2V ₈₅	0 <i>p=0.999</i>	<0 <i>p=0.475</i>	7 <i>p=0.540</i>	<0 <i>p=0.158</i>
HNRPL ₁₄₀	16 <i>p=0.582</i>	<0 <i>p=0.745</i>	<0 <i>p=0.528</i>	<0 <i>p=0.032</i>
HNRPL ₆₀₁	<0 <i>p=0.965</i>	7 <i>p=0.756</i>	<0 <i>p=0.093</i>	<0 <i>p=0.035</i>

このケースでは、抗原ペプチドに対する反応性は全体的に低値であったが、ppMAPkkk₄₃₂のみを投与のための抗原ペプチドとして選択した。

【0047】(2) 臨床での治療効果

ペプチドは、実施例7と同様にMontanide ISA51 (Seppic社)を用いてW/Oエマルションを作製し、前立腺癌患者に3mgを約2週間おきに皮下投与した。腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) の測定値の推移を図7に示した。上昇傾向にあったPSA値はワクチン投与2回目以降、減少傾向に転じ、ワクチン投与5回目以降では治療開始前よりも低値となった。このように本発明の新細胞性免疫定性法で多数の候補ペプチドから患者の治療に有効な患者体内に存在頻度の高いT細胞を容易に選択できる有用な方法であることが示された。

【0048】

【発明の効果】本発明方法は、従来方法のように「定量

*前立腺癌患者に対する癌ワクチン治療

(1) 抗原ペプチドの選択

HLA-A2陽性の前立腺癌患者から末梢血単核球を分離し、実施例7の方法により上記表2に示す16種類の抗原ペプチドの内、13種類の抗原ペプチドに対する反応性を調べた。結果を表8に示す。

【0046】

【表8】

的」ではないが、実施例4にて検討したように「半定量的」な方法である。しかしながら、本発明方法は使用する患者の血液 (リンパ球) の量が少なく済み、しかも多くの抗原ペプチドを短時間で評価することができるので、患者の治療前 (ワクチン投与前) に、治療に用いるべきペプチドを決定する際に非常に有効である。

【0049】特に、本発明の抗原特異的T細胞と反応する抗原の検出方法は、全ての癌細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らず、また一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることから複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であることを考慮すると、非常に有益な方法である。さらに、ワクチン投与前後の抗原特異的T細胞の変動をモニターする、即ち投与した抗原ペプチドが有効であるか否かを検討する際にも非常に有効である。本発明方法は、システムチックに抗原特異的T細胞を検出す

るためのマイクロ手法を可能とする。

【0050】また、本発明では、新細胞性免疫定性法により癌患者の末梢血T細胞中の各種癌抗原ペプチドに対するCTL前駆体の頻度を測定し、反応性の良い抗原ペプチドを選択すれば、癌ワクチンとして癌患者に投与する治療を実施して良好な成績が得られる。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Itoh, Kyogo

<120> Assay based on cellular immunity and therapeutic application thereof

<130> 178241

<140>

<141> 2001-09-18

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<303> Int. J. Cancer

<304> 88

<306> 633-639

<307> 2000

<400> 1

Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<303> Int. J. Cancer

<304> 88

<306> 633-639

<307> 2000

<400> 2

Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<303> Jpn. J. Cancer Res.

<304> 92

<306> 762-767

<307> 2001

<400> 3

Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro

Gly Trp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

10 <303> Jpn. J. Cancer

Res.

<304> 92

<306> 762-767

<307> 2001

<300>

<303> Jpn. J. Cancer

Res.

<304> 92

<306> 762-767

20 <400> 4

Val Leu Glu Gly Met Glu Val

Val

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<303> Int. J. Cancer

30

<307> 2001

<400> 5

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly

Ala Ala

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <300>

<303> Int. J. Cancer

<307> 2001

<400> 6

Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile

Leu Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<303> Cancer Res.

1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 8
 Gly Leu Leu Phe Leu His Thr
 Arg Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 9
 Asp Leu Leu Ser His Ala Phe
 Phe Ala
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 10
 Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro
 Trp Val
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 11
 Ile Leu Gly Glu Leu Arg Glu
 Lys Val
 1 5

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 12
 10 Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser
 Val Ile
 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 20 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 13
 Leu Ile Ala Asp Phe Leu Ser
 Gly Leu
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 14
 Ile Leu Pro Arg Lys His His
 Arg Ile
 1 5
 <210> 15
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 15
 Ala Leu Val Glu Phe Glu Asp
 50 Val Leu
 1 5
 <210> 16
 <211> 10

<213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 61
 <306> 2038-2046
 <307> 2001
 <400> 16
 Asn Val Leu His Phe Phe Asn
 Ala Pro Leu
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Int. J. Cancer

 <304> 81
 <306> 459-466
 <307> 1999
 <400> 17
 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln
 Asp Phe
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> J. Immunol.
 <304> 164
 <306> 2565-2574
 <307> 2000
 <400> 18
 Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn
 Glu Ile
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> J. Immunol.
 <304> 164
 <306> 2565-2574
 <307> 2000
 <400> 19
 Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Asn
 Tyr Leu
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT

<303> J. Immunol.
 <304> 164
 <306> 2565-2574
 <400> 20
 Ser Tyr Thr Arg Leu Phe Leu
 Ile Leu
 1 5
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 59
 <306> 4056-4063
 <307> 1999
 <400> 21
 Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His
 Val Asp Leu
 20 1 5 10
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 <304> 59
 <306> 4056-4063
 <307> 1999
 <400> 22
 Ala Tyr Ile Asp Phe Glu Met
 Lys Ile
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> J. Immunol.
 40 <304> 163
 <306> 4994-5004
 <307> 1999
 <400> 23
 Lys Phe His Arg Val Ile Lys
 Asp Phe
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> J. Immunol.
 <304> 163

<307> 1999
 <400> 24
 Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly
 Asp Phe
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Eur. J. Immuno
 l.
 <304> 31
 <306> 323-332
 <307> 2001
 <400> 25
 His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp
 Gly Leu
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Eur. J. Immuno
 l.
 <304> 31
 <306> 323-332
 <307> 2001
 <400> 26
 Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser
 Val Leu
 1 5
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Eur. J. Immuno
 l.
 <304> 31
 <306> 323-332
 <307> 2001
 <400> 27
 Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu
 Glu Asp Phe
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.

Ala Phe Leu Arg His Ala Ala
 Leu
 1 5
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Cancer Res.
 10 <304> 60
 <306> 3550-3558
 <307> 2000
 <400> 29
 Asp Tyr Pro Ser Leu Ser Ala
 Thr Asp Ile
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <300>
 <303> Int. J. Cancer

 <304> 88
 <306> 633-639
 <307> 2000
 <400> 30
 Glu Tyr Cys Leu Lys Phe Thr
 Lys Leu
 30 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> EB Virus
 <300>
 <303> J. Immunol.
 <304> 158
 <306> 3325-3334
 <307> 1997
 40 <400> 31
 Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met
 Cys Leu
 1 5
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunod
 efficiency virus
 <300>
 50 <303> J. Immunol.
 <304> 159
 <306> 6242-6252
 <307> 1997

【図面の簡単な説明】

【図1】 抗原刺激に用いる末梢血単核球の細胞数に対する抗原特異的T細胞検出感度の影響を示すグラフである。

【図2】 HLA-A24陽性の健康人10名由来末梢血単核球からのEBウイルス由来HLA-A24拘束性抗原ペプチド特異的T細胞の検出結果を示すグラフである。

【図3】 子宮頸癌患者を本発明方法により選定した抗原ペプチドにて処置した前後の癌胎児性抗原(CEA)の測定値の推移を示すグラフである。

【図4】 子宮頸癌患者を本発明方法により選定した抗*

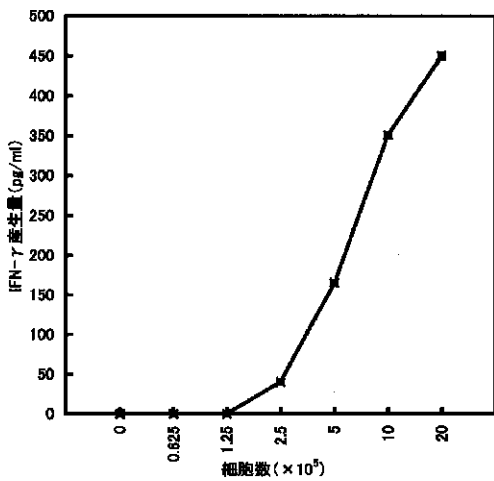
*原ペプチドにて処置した前後の扁平上皮癌関連抗原(SCC)の測定値の推移を示すグラフである。

【図5】 子宮頸癌患者を本発明方法により選定した抗原ペプチドにて処置した前後の腫瘍の縮小率を示すグラフである。

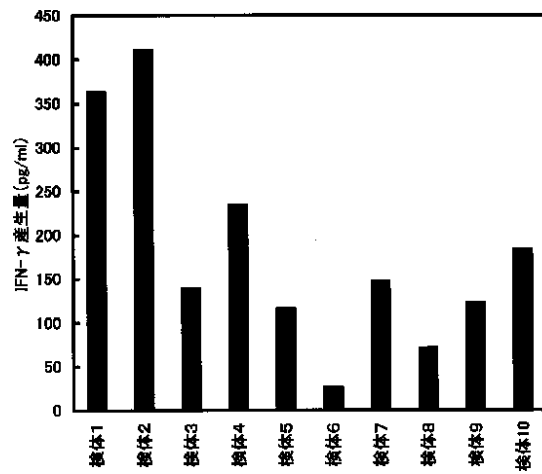
【図6】 子宮頸癌患者を本発明方法により選定した抗原ペプチドにて処置した前後の癌胎児性抗原(CEA)の測定値の推移を示すグラフである。

【図7】 前立腺癌患者を本発明方法により選定した抗原ペプチドにて処置した前後の前立腺特異抗原(PSA)の測定値の推移を示すグラフである。

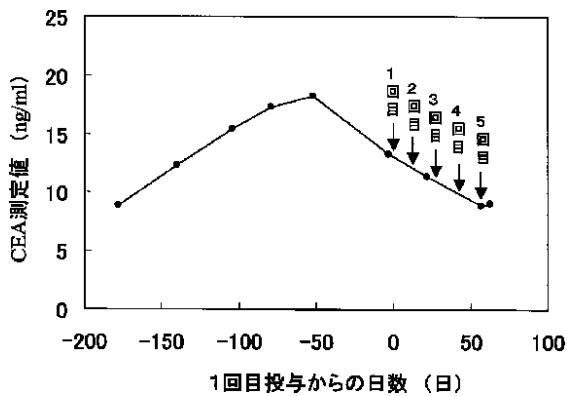
【図1】



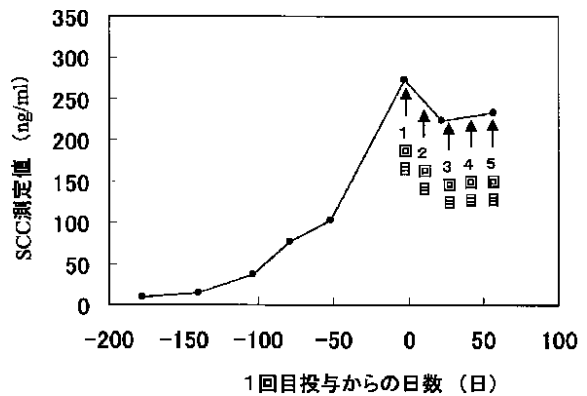
【図2】



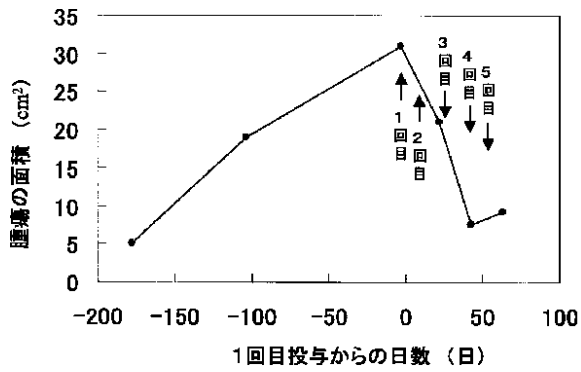
【図3】



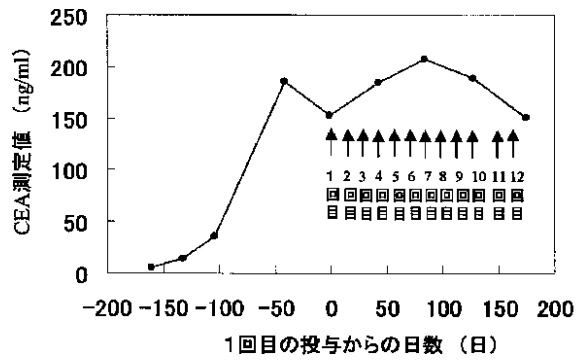
【図4】



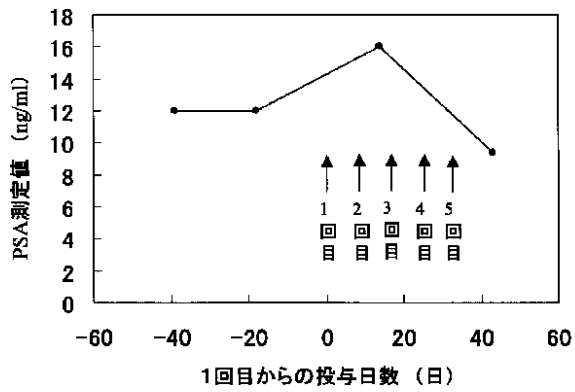
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/02	Z N A	C 1 2 Q 1/02	Z N A
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
			P
			Y
33/574		33/574	D

Fターム(参考) 2G045 BB20 CB01 FB03 GC22 JA01
 4B063 QA19 QQ08 QQ79 QQ96 QR48
 QS33
 4C085 AA03 BB01 CC12

专利名称(译)	细胞免疫检测及其在医学中的应用		
公开(公告)号	JP2002365286A	公开(公告)日	2002-12-18
申请号	JP2001283413	申请日	2001-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	伊东恭悟		
申请(专利权)人(译)	伊藤KyoSatoru		
[标]发明人	伊東恭悟 檜田直也		
发明人	伊東 恭悟 檜田 直也		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/50.K A61K39/00.H A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 C12Q1/02.ZNA G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/53.Y G01N33/574.D		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/FB03 2G045/GC22 2G045/JA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS33 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC12		
优先权	2000345094 2000-11-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单的免疫监测系统，即使使用相对少量的血液，也能够分析多种抗原肽的特定T细胞频率。一种抗原特异性T细胞检测方法，包括：（1）收集外周血单核细胞，（2）经常用抗原刺激收集的外周血单核细胞，和（3）刺激。本发明涉及一种检测外周血单核细胞中对抗原特异性的T细胞的方法，其特征在于抗原呈递细胞不直接用于刺激外周血单核细胞。