

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/029475

発行日 平成17年1月20日 (2005. 1. 20)

(43) 国際公開日 平成15年4月10日 (2003. 4. 10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 38/16	A 6 1 P 31/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 72 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2003-532688 (P2003-532688)	(71) 出願人	595155107 株式会社ダイナベック研究所 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/009697	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(22) 国際出願日	平成14年9月20日 (2002. 9. 20)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(31) 優先権主張番号	特願2001-301290 (P2001-301290)	(72) 発明者	岩本 愛吉 東京都文京区千駄木5-16-10
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001. 9. 28)	(72) 発明者	立川 愛 東京都世田谷区弦巻1-8-21-208
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 エピトープ結合β2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用

(57) 【要約】

エピトープ結合β2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを構築し、哺乳動物細胞で該エピトープ結合β2mを大量に発現させることに成功した。本発明は、エピトープ結合β2マイクログロブリン(β2m)をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用を提供する。また、本発明は、該ベクターを用いたMHC class I/ペプチド複合体の製造方法を提供する。特に4量体化したMHC class I/ペプチド複合体は、エピトープ特異的なCD8陽性T細胞の検出に有用である。また本発明は、該ベクターが導入された細胞を提供する。また、本発明のベクターにより産生したエピトープ結合β2mを添加した標的細胞を提供する。これらの細胞は、抗原特異的細胞障害性T細胞(CTL)により認識された。本発明のベクターおよび該ベクターの発現により得られるポリペプチドは、感染症や癌などにおける免疫治療のために、また抗原特異的CTLの検出および定量のために有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エピトープ結合  $\beta 2 m$  を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター。

## 【請求項 2】

哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、請求項 1 に記載のウイルスベクター。

## 【請求項 3】

パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 2 に記載のウイルスベクター。

## 【請求項 4】

エピトープが抗原提示細胞により提示されたエピトープペプチドのアミノ酸配列またはその部分を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のウイルスベクター。 10

## 【請求項 5】

エピトープが HIV-1 のウイルス蛋白質の部分ペプチドである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のウイルスベクター。

## 【請求項 6】

エピトープが配列番号：24 または 26 に記載のアミノ酸配列またはその部分を含む、請求項 5 に記載のウイルスベクター。

## 【請求項 7】

エピトープが癌抗原の部分ペプチドである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のウイルスベクター。 20

## 【請求項 8】

エピトープと  $\beta 2 m$  の間に配列番号：13 に記載のアミノ酸配列またはその繰返しを含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のウイルスベクター。

## 【請求項 9】

エピトープ結合  $\beta 2 m$  の生産方法であって、

(a) 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、エピトープ結合  $\beta 2 m$  を回収する工程、を含む方法。 30

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法により生産されたエピトープ結合  $\beta 2 m$ 。

## 【請求項 11】

エピトープ結合  $\beta 2 m$  を含む、ヘテロダイマーの生産方法であって、

(a) 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したヘテロダイマーを回収する工程、を含む方法。

## 【請求項 12】

MHC class I 重鎖、およびエピトープ結合  $\beta 2 m$  を含む、MHC class I / ペプチド複合体の生産方法であって、 40

(a) 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成した MHC class I / ペプチド複合体を回収する工程、を含む方法。

## 【請求項 13】

前記哺乳動物細胞に、MHC class I 重鎖を発現するウイルスベクターを導入する工程をさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 14】

MHC class I 重鎖が分泌型である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

MHC class I重鎖がビオチン化基質ペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

MHC class I重鎖がA24拘束性HLA class I重鎖である、請求項13から15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

A24拘束性HLA class I重鎖がA\*2402由来である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ビオチン化基質ペプチドを含むMHC class I重鎖をビオチン化する工程、およびビオチン化MHC class I重鎖をアビジンの存在下で会合させる工程をさらに含む、請求項15に記載の方法。 10

【請求項19】

請求項12から18のいずれかに記載の方法により生産されたMHC class I/ペプチド複合体。

【請求項20】

4量体である、請求項19に記載のMHC class I/ペプチド複合体。

【請求項21】

請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクター、請求項10に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2m、あるいは請求項19または20に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤。 20

【請求項22】

請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクター、請求項10に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2m、あるいは請求項19または20に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物。

【請求項23】

請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞。

【請求項24】

請求項11に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2mを細胞表面に有する細胞。

【請求項25】

MHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入されている、請求項23または24に記載の細胞。 30

【請求項26】

MHC class I重鎖が膜結合型である、請求項25に記載の細胞。

【請求項27】

MHC class I重鎖が分泌型である、請求項25に記載の細胞。

【請求項28】

細胞が樹状細胞である、請求項23から27のいずれかに記載の細胞。

【請求項29】

請求項23から28のいずれかに記載の細胞を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤。 40

【請求項30】

請求項23から28のいずれかに記載の細胞を含む医薬組成物。

【請求項31】

請求項19または20に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的Tリンパ球の検出薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、エピトープ結合 $\beta$ 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用に関する。

背景技術

MHC (major histocompatibility complex) class I分子は重鎖 (heavy chain; HC) と $\beta 2$ ミクログロブリン ( $\beta 2$ -microglobulin;  $\beta 2m$ ) からなるヘテロダイマーであり、体内にあるほとんどの細胞がその細胞膜表面上に持つ。MHC class I分子はその重鎖によって作られるペプチド収容溝に10アミノ酸前後からなるペプチドを収容することができ、そのMHC class I/ペプチド複合体が細胞性免疫の担い手である細胞傷害性T細胞 (CTL) 上のT cell receptor (TCR) によって認識されることから、MHC class I分子によって提示されるペプチドは「エピトープ (epitope; 抗原決定基)」と呼ばれる。

細胞質内で作られた自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに由来するペプチド断片はTAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれる粗面小胞体上にあるトランスポーターを介して粗面小胞体へと運ばれ、そこでMHC class I重鎖および $\beta 2m$ とともに安定なMHC class I/ペプチド複合体を形成する。 $\beta 2$ -ミクログロブリン分子はMHC class Iの立体構造の安定性の確保とH鎖の細胞表面への輸送に役割を果たしている (日本分子生物学会編「免疫系: 認識・分化・増殖」本庶 佑、渡邊 武 編集、丸善株式会社、117-118ページ)。ペプチドを結合していない空のMHC class I分子は37℃の培養条件では非常に不安定であることが知られている。

MHC class I分子によって提示されるペプチドであるエピトープは、ある抗原に対する特異的な細胞性免疫を誘導するのに非常に重要な分子であり、HIVをはじめとするウイルス感染や、癌に対する免疫治療としてペプチドワクチンの開発が試みられている。しかしながら多くのウイルス抗原や腫瘍抗原由来の主要なエピトープは、MHC class I分子とペプチドとの結合は弱く、ペプチドのみをワクチンとして使用してもその安定性の低さから一般に効果が期待できない。1998年に抗原性を損なわずMHC class I分子との結合を高めるアミノ酸置換を行った人工のエピトープを用いた、メラノーマ患者に対する臨床研究では効果が認められているが、このような安定性、抗原性に優れたエピトープを同定、開発することは煩雑で困難であり、必ずしも目的のものが得られるわけではない。

また一方で $\beta 2m$ によるMHC class I分子上のペプチドの安定性の増加という現象が知られており、その $\beta 2m$ のアジュバント効果を利用した系の開発も行われている。

ところで近年、エピトープペプチドをMHC class IおよびII分子あるいは $\beta 2m$ に融合させたMHC class I/ペプチド複合体等の発現が試みられている (Uger, R. A. and Barber, B. H., 1998, J. Immunol. 160: 1598-1605; White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676; Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57: 202-205; Uger, R. A. et al., J. Immunol. 1999, 162: 6024-6028; 米国特許第5, 869, 270号)。

これらの系では、 $\beta 2m$ のN末端にリンカーを介してエピトープのペプチド配列を融合させること (エピトープ結合 $\beta 2m$ ; epitope-linked- $\beta 2m$ ) ("e/ $\beta 2m$ "とも表記する) によって、特にMHC class I分子との結合力の弱いエピトープに関してペプチド単独に比して安定性が増加しCTLによる認識も高まることが報告されている。しかし、これらの報告では主として大腸菌発現ベクターが用いられており、哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを用いた例は知られていない。大腸菌において外来蛋白質を大量発現させると、封入体 (inclusion body) を形成し不溶化する場合がしばしば認められる。不溶化した蛋白質は尿素などの変性剤で可溶化し、蛋白質の再フォールディングが行われるが、必ずしも全ての蛋白質が可溶化するわけではなく、操作も煩雑である。また、大腸菌由来の煩雑物の混入も懸念される。

また、哺乳動物発現プラスミドを用いた遺伝子導入は効率が悪く十分な発現が期待できない。さらにプラスミドベクターの発現のためには、プラスミドが核に移行することが必要

であるため、核膜の消失する細胞が分裂しているタイミングでなければペクターを発現させることができない欠点を持っている。

MHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLのアッセイにも有用である。個体内での抗原特異的CTLの頻度の定量には従来、限界希釈アッセイ (limiting dilution assay) という方法が用いられてきたが、これはインビトロでの長期の培養が必要であることと、感度が悪いことから、1996年に簡便で感度のよい”MHC class I/ペプチド・テトラメリック複合体 (テトラマー)” [MHC class I/peptide tetrameric complex (tetramer)] が開発された (Altman J. D. et al., Science 274:94-96 (1996))。これはMHC class I/ペプチド複合体をbiotin-avidinの結合を用いて4量体化し、さらに蛍光標識を付加したもので、FACSによる解析に利用される。この方法は個体から分離した末梢血単核球をそのまま用いて測定することができるため、簡便で個体内の頻度を直接反映する上、非常に感度がよく、さらに特異性も高いことが確認されている (Wilson, J. D. K. et al., J. Exp. Med. 188:785-790 (1998); Kuroda, M. J. et al., J. Exp. Med. 187:1373-1381 (1998))。現在ヒトのMHC class I分子について用いられているMHC class I/ペプチド複合体は、大腸菌にて重鎖 (HC) および $\beta 2m$ 蛋白質を別々に発現させ、精製し、さらに合成ペプチドを用いた3者によるインビトロフォールディングにてMHC class I/ペプチド複合体を作製している。

それに対してマウスのMHC class I分子についてバキュロウイルスペクターを用い、昆虫細胞由来のMHC class I/ペプチド複合体の作製が報告されている (White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162:2671-2676)。この系ではMHC class I重鎖、エピトープ結合 $\beta 2m$ を各々発現するバキュロウイルスを重感染させることによって、その細胞内でMHC class I/ペプチド複合体が作られる。しかし、哺乳動物細胞感染性のウイルスペクターを用いた例は知られていない。バキュロウイルスペクターは昆虫細胞 (例えばSf9細胞) で有効なプロモーターの下流で外来遺伝子を発現するシステムで (特表平6-502990) あるため、哺乳類由来の細胞を利用することができない。また、PunnonenらはDNAシャッフリングに用いる遺伝子ワクチンペクターを開示しているが、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスペクターについては知られていない (Punnonen, J. 他、Genetic Vaccine Vector Engineering、米国特許出願第20010006950号)。

#### 発明の開示

本発明は、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスペクターおよびその利用を提供する。

本発明者らは、エピトープ結合 $\beta 2m$ およびMHC class I/ペプチド複合体を哺乳動物細胞で大量発現させる系を確立するため、哺乳動物細胞感染性のウイルスペクターを用いた発現系の構築を試みた。この目的のために、広い哺乳動物種に感染可能であり、導入遺伝子の極めて高い発現を得ることができる組み換えセンダイウイルス (rSeV) を用いて、SeVによるMHC class I/ペプチド複合体、及びエピトープ結合 $\beta 2m$ の発現系を構築した。

本発明者らは、HIV-1 NefおよびEnvタンパク由来のエピトープを例に、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するSeVペクターを構築した。これを哺乳動物に導入し、分泌型蛋白質の形でエピトープ結合 $\beta 2m$ を大量に回収することに成功した。回収されたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、細胞表面上のMHC class I重鎖と結合してMHC class I/ペプチド複合体を形成し、CTLに効率良く抗原を提示できることが判明した。このことから動物感染性ウイルスペクターにより産生されるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、タンパク製剤として有用であることが示された。ペクター導入細胞から産生されたエピトープ結合 $\beta 2m$ を回収・精製すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を

得ることが可能である。

また、本発明者らは、MHC class I重鎖を発現するSeVベクターを構築し、これとエピトープ結合 $\beta$ 2m発現SeVベクターを哺乳動物細胞に重感染させてMHC class I/ペプチド複合体を回収・精製した。さらに、MHC class I重鎖の膜結合領域を欠失させた分泌型MHC class I重鎖にビオチン化基質ペプチドを付加した分子をSeVベクターにより発現させ、得られたMHC class I/ペプチド複合体をビオチン化した後、RPE標識アビジンを介して結合させ、MHC class I/ペプチドテトラマーを製造した。このMHC class I/ペプチドテトラマーは、CTLの検出および定量に好適に用いられる。このテトラマーは動物細胞由来であるため糖鎖が付加され、大腸菌由来のテトラマーに比して感度の向上などが期待される。

10

HLA-A\*2402を発現するSeVとHIV-1 Nefタンパク由来のエピトープが結合している $\beta$ 2mを発現するSeVベクターを共導入した細胞は、HIV-1 Nefタンパク由来の合成エピトープペプチドをパルス投与した場合と同等またはそれ以上の効率で抗原特異的CTLに認識されることが判明した。また、SeVベクター導入細胞から回収したエピトープ結合 $\beta$ 2mの効果を調べたところ、エピトープ結合 $\beta$ 2mを標的細胞の培養液に添加することによって、標的細胞に対する抗原特異的CTLの反応を誘導することに成功した。これらの知見は、エピトープ結合 $\beta$ 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが、抗原特異的な免疫反応を誘導するためのインビボまたはエクスピボにおける遺伝子治療に有用であることを示している。目的のMHC class I/ペプチド複合体を個体内で産生させることができれば、単なるペプチドワクチンなどに比して効果の高い免疫治療を実現することが可能と考えられる。

20

このように本発明者らは、哺乳動物細胞において効率的にエピトープ結合 $\beta$ 2mを産生させる方法を確認し、このエピトープ結合 $\beta$ 2mを含む分泌型および膜結合型のMHC class I/ペプチド複合体を製造した。さらに本発明者らは、個体内での抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の検出および定量に有用なMHC class I/ペプチドテトラマーの作製において新しいシステムを開発した。また本発明者らは、上記の生産系を用いて調製したエピトープ結合 $\beta$ 2m蛋白質を細胞表面のMHC class Iと結合させ抗原特異的CTLへの抗原提示を行った。さらに、エピトープ結合 $\beta$ 2m発現ウイルスベクターおよびMHC class I重鎖発現ウイルスベクターを標的細胞に重感染させ、抗原特異的CTLによる認識を誘導する系を確認した。

30

本発明において提供されるベクターを使用すれば、哺乳動物細胞で所望のエピトープ結合 $\beta$ 2mを大量に発現させることが可能であり、得られるエピトープ結合 $\beta$ 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLの検出および定量のために、またエピトープ結合 $\beta$ 2m精製蛋白質を用いたMHC class Iによる抗原提示のために、さらにはインビボおよびエクスピボでのベクター導入を介して、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために極めて有用である。特に本発明のベクターは、ウイルスや細菌等感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などに好適に用いられる。

本発明は、エピトープ結合 $\beta$ 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用に関し、より具体的には、

40

- (1) エピトープ結合 $\beta$ 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター、
- (2) 哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、(1)に記載のウイルスベクター、
- (3) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(2)に記載のウイルスベクター、
- (4) エピトープが抗原提示細胞により提示されたエピトープペプチドのアミノ酸配列またはその部分を含む、(1)から(3)のいずれかに記載のウイルスベクター、
- (5) エピトープがHIV-1のウイルス蛋白質の部分ペプチドである、(1)から(4)

50

- ) のいずれかに記載のウイルスベクター、
- (6) エピトープが配列番号：24または26に記載のアミノ酸配列またはその部分を含む、(5)に記載のウイルスベクター、
- (7) エピトープが癌抗原の部分ペプチドである、(1)から(4)のいずれかに記載のウイルスベクター、
- (8) エピトープと $\beta$ 2mの間に配列番号：13に記載のアミノ酸配列またはその繰返しを含む、(1)から(7)のいずれかに記載のウイルスベクター、
- (9) エピトープ結合 $\beta$ 2mの生産方法であって、
- (a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、 10
- (b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、エピトープ結合 $\beta$ 2mを回収する工程、を含む方法、
- (10) (9)に記載の方法により生産されたエピトープ結合 $\beta$ 2m、
- (11) エピトープ結合 $\beta$ 2mを含む、ヘテロダイマーの生産方法であって、
- (a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、
- (b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したヘテロダイマーを回収する工程、を含む方法、
- (12) MHC class I重鎖、およびエピトープ結合 $\beta$ 2mを含む、MHC class I/ペプチド複合体の生産方法であって、 20
- (a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、
- (b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したMHC class I/ペプチド複合体を回収する工程、を含む方法、
- (13) 前記哺乳動物細胞に、MHC class I重鎖を発現するウイルスベクターを導入する工程をさらに含む、(12)に記載の方法、
- (14) MHC class I重鎖が分泌型である、(13)に記載の方法、
- (15) MHC class I重鎖がビオチン化基質ペプチドを含む、(14)に記載の方法、
- (16) MHC class I重鎖がA24拘束性HLA class I重鎖である 30
- 、(13)から(15)のいずれかに記載の方法、
- (17) A24拘束性HLA class I重鎖がA\*2402由来である、(16)に記載の方法、
- (18) ビオチン化基質ペプチドを含むMHC class I重鎖をビオチン化する工程、およびビオチン化MHC class I重鎖をアビジンの存在下で会合させる工程をさらに含む、(15)に記載の方法、
- (19) (12)から(18)のいずれかに記載の方法により生産されたMHC class I/ペプチド複合体、
- (20) 4量体である、(19)に記載のMHC class I/ペプチド複合体、
- (21) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクター、(10)に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2m、あるいは(19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤、 40
- (22) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクター、(10)に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2m、あるいは(19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物、
- (23) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞、
- (24) (10)に記載のエピトープ結合 $\beta$ 2mを細胞表面に有する細胞、
- (25) MHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入されている、(23)または(24)に記載の細胞、 50

- (26) MHC class I重鎖が膜結合型である、(25)に記載の細胞、
- (27) MHC class I重鎖が分泌型である、(25)に記載の細胞、
- (28) 細胞が樹状細胞である、(23)から(27)のいずれかに記載の細胞。
- (29) (23)から(28)のいずれかに記載の細胞を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤、
- (30) (23)から(28)のいずれかに記載の細胞を含む医薬組成物、
- (31) (19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的Tリンパ球の検出薬、に関する。

本発明において「エピトープ」とは、免疫細胞により認識され得るペプチドを言う。免疫細胞としては、T細胞、B細胞、NK細胞、またはNK T細胞などが挙げられる。本発明において好ましいエピトープは、T細胞により認識されるペプチドである。エピトープは、抗原提示細胞により提示されたペプチドのみならず、免疫細胞により認識され得る限り所望のペプチドであってよく、例えば、人工的に作製したアミノ酸配列からなるペプチドをエピトープとして用いることもできる。より好ましくは、エピトープは抗原提示細胞(APC)により提示されたペプチドまたはその部分を含むペプチドである。本発明においてエピトープとなる蛋白質またはペプチドの「部分」は、通常、連続した8アミノ酸以上を含む部分である。好ましくは、連続した9アミノ酸以上、より好ましくは連続した10以上、12以上、または15以上のアミノ酸を含む部分である。

本発明は、エピトープ結合 $\beta 2 m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを提供する。哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターとしては特に制限はなく、所望のウイルスベクターを利用することができる。本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞以外の細胞に感染する能力を有していてもよい。ベクターとしては、宿主に対する毒性が低く、導入遺伝子の高い発現が得られるものが好ましい。本発明のベクターとして用いられ得るウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限されない。これらのベクター系を用いて、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現する組み換えウイルスベクターを構築することができる。なお、本明細書において、「組み換え」ウイルスベクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスベクターを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。「組み換え」ウイルスベクターは、例えば遺伝子操作により構築されたウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるウイルスベクターが含まれる。組み換えウイルスベクターは、例えば、組み換えウイルスcDNAを宿主細胞で発現させ、ウイルス粒子を再構成して生成することができる。

組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法(Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニユアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社)に従い、例えばアデノウイルス(Ad)5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw(鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁)を、適当な制限酵素例えばSwaI等で切断し、ゲル濾過等にて適宜脱塩精製し、外来遺伝子発現ユニットをT4リガーゼ等による連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行う。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断する。その一部についてギガバックXLキット(ストラタジーン社、米国)等によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入し得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制

10

20

30

40

50

制限酵素消化によりその構造を調べ、外来遺伝子発現ユニットが目的の方向 (E1A、E1Bの転写と逆方向) に挿入された組換えコスミドを単離する。一方で、E1及びE3領域を欠くアデノウイルス5型 (Ad5 d1X株) のDNA-末端蛋白質複合体 (DNA-TPC) を斎藤らの方法 (鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社) により調製する。これを例えば、制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過等により脱塩精製する。該コスミドとEcoT22I消化断片を混合し、セルフェクトキット (ファルマシア社、スウェーデン) 等を用いて、293細胞に導入する。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液 (293細胞懸濁液にて希釈) を96穴プレートに撒く。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウイルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出す。それを数回凍結融解し、アデノウイルス粒子を細胞から放出させる。その遠心上清液 (1次ウイルス液) を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させる。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウイルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得る (2次ウイルス液)。残りの培養液を遠心し、細胞を得る。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウイルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択する。その2次ウイルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させ、その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウイルス液を得る。3次ウイルス液について、斎藤らの方法 (鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社) により、力価を測定し、ベクターとして利用できる (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci, USA、93巻、1320-1324頁; Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁)。

他にも、例えばレトロウイルスベクター (脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁)、アデノ随伴ウイルスベクター (玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁) などを用いることができる。これらは既に確立された方法で、効率的にベクターを生産できることが公知となっている。

哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のベクターを製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られている。

得られたウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入することにより、エピトープ結合 $\beta 2m$ が発現し、この細胞または培養上清から目的のエピトープ結合 $\beta 2m$ を得ることができる。回収されたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために有用である。例えば、エピトープ結合 $\beta 2m$ を抗原提示細胞に添加し、このエピトープを提示させることができる。また、抗原提示細胞にエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターを導入すれば、効率的に所望のエピトープを提示させることができる。エピトープは $\beta 2m$ の所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後の $\beta 2m$ 分子のN末端となるようにエピトープを結合させることが好ましい。このためには、 $\beta 2m$ の分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサー配列を介して、 $\beta 2m$ 蛋白質を連結した融合蛋白質を製造すればよい。用いられる $\beta 2m$ としては特に制限はなく、所望の哺乳動物の $\beta 2m$ 分子を用いることができる。ヒトへの適用のためにはヒト $\beta 2m$ が好ましい。ヒト $\beta 2m$ 遺伝子は例えば実施例に記載したようにして単離することができる。

また、哺乳動物細胞にエピトープ結合 $\beta 2m$ と分泌型 (または可溶型とも言う) のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれば、培養上清にMHC class I/ペプチド複合体が分泌され容易に回収することができる。分泌型MHC class I重鎖は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導入してもよいし、細胞の染色体DNAにこれをコードする遺伝子を組み込んだ上で発現させてもよい。分泌型のMHC c

10

20

30

40

50

class I重鎖にビオチン化基質ペプチドを付加しておけば、ビオチン化したMHC class I/ペプチド複合体を、アビジンを用いて4量体化することが可能である。このようなテトラマーは、特にCTLの検出および定量に有用である。

エピトープ結合 $\beta 2m$ と膜結合型のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれば、細胞表面上に大量のMHC class I/ペプチド複合体が発現される。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対し、優れた抗原提示能を有している。

ウイルスベクターを用いてMHC class I重鎖を発現させる場合、用いるベクターとしては、上記のエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターと同様、特に制限はなく、所望のウイルスベクターを用いることができる。また、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターにMHC class I重鎖をコードする遺伝子を組み込み、同一のベクターからエピトープ結合 $\beta 2m$ とMHC class I重鎖を共発現させることもできる。本発明のベクターには、エピトープ結合 $\beta 2m$ に加え他の外来遺伝子を発現する共発現ベクターも含まれる。MHC class I重鎖としては、特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子(HLA)が好ましい。実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。その中でHLA-A\*2402という遺伝子型は日本人の約7割が持つ。本発明において用いられるMHC class I重鎖としては、A24拘束性HLA class I重鎖、特にHLA-A\*2402が、日本人への適用を考えた場合に好ましい。患者のMHC型に合わせて $\beta 2m$ に融合させるエピトープおよび/またはMHC class I分子を選択することにより、テーラーメイドの医療が可能となると考えられる。

本発明者らは、また、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いると、細胞において所望の分泌型のマルチマー(多量体)蛋白質複合体を極めて効率的に製造することが可能であることを見出した。特に、本発明に従い哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて、分泌型のホモまたはヘテロダイマーおよびホモまたはヘテロトライマーを高い効率で製造することが可能である。例えば内因的には細胞膜上に存在するヘテロマー蛋白質であっても、実施例で行ったように、その膜貫通領域を欠失させた蛋白質を該ウイルスベクターで発現させることにより、細胞外に分泌させることが可能である。本発明に従ってダイマーまたはトライマー等の分泌型マルチマーの製造を行う場合には、マルチマーの成分となる蛋白質を、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて発現させる。これらの成分蛋白質は全てを哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターで発現させてもよいし、細胞において内因性に幾つかの成分が十分量発現している場合などにおいては、発現量の少ない成分など一部の成分蛋白質のみを哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて発現させてもよい。この方法を用いて製造する分泌性マルチマーとして最も好ましいものの1つはMHC class I I複合体である。これは、 $\alpha$ および $\beta$ の2本鎖の重鎖からなるヘテロダイマーで、 $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖のどちらかに、上記のエピトープ結合 $\beta 2m$ またはエピトープ結合MHC class I重鎖と同様にエピトープを融合させ、エピトープ結合 $\beta 2m$ またはエピトープ結合MHC class I重鎖の場合と同様の方法に従って複合体を製造することが可能である。また、本方法を用いて製造する分泌性マルチマーとしてはT細胞受容体なども好ましい。これらの他には、例えばヘテロまたはホモダイマーあるいはヘテロまたはホモトライマーの形態をとる種々のサイトカインおよびケモカイン等が挙げられる。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-3、IL-5、およびGM-CSFなどのヘテロダイマーまたはヘテロトライマー、およびNK受容体のようなホモダイマーなどが挙げられるが、これらに制限されない。すなわち本発明は以下の発明も提供する。

<1>分泌性マルチマーの成分を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター。

10

20

30

40

50

〈2〉哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、〈1〉に記載のウイルスベクター。

〈3〉パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〈2〉に記載のウイルスベクター。

〈4〉分泌性マルチマーが、分泌性ホモまたはヘテロダイマーまたは分泌性ホモまたはヘテロトライマーである、〈1〉から〈3〉のいずれかに記載のウイルスベクター。

〈5〉分泌性マルチマーが、MHC class II複合体、T細胞受容体、NK受容体、インターロイキン (IL) - 2、IL - 4、IL - 7、IL - 9、IL - 15、IL - 3、IL - 5、およびGM-CSFからなる群より選択される分泌性マルチマーである、〈4〉に記載のウイルスベクター。

10

〈6〉分泌性マルチマーが、エピトープが結合されたMHC class II複合体である、〈5〉に記載のウイルスベクター。

〈7〉分泌性マルチマーの生産方法であって、(a) 〈1〉から〈6〉のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および (b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、分泌性マルチマーを回収する工程、を含む方法。

〈8〉〈7〉に記載の方法により生産された分泌性マルチマー。

〈9〉〈1〉から〈6〉のいずれかに記載のウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞。

本発明において特に好適な哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、パラミクソウイルスベクターである。「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター (担体) を指す。パラミクソウイルス科に属するセンダイウイルス (SeV) は最近、遺伝子導入ベクターとして開発が進められている (Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997; 国際公開番号 97/16538号および国際公開番号 97/16539号)。SeVベクターは毒性が低く、導入した遺伝子から発現される蛋白質量が極めて高い。また、ベクター内の遺伝子が宿主染色体へ導入されることがないため、安全性にも優れている。SeVベクターのゲノムの安定性は高く、異種遺伝子発現の結果ではウイルスを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造タンパク質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上のメリットがある。複製能を有するSeVベクターは、外来DNAを少なくとも4kbpまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。SeVのレプリコンをベースにしたベクターは複製されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。

20

30

また、安全性の面においても、ヒト病原性が否定されているためパラミクソウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうることが示唆される。第一に、プラスミドDNA等による導入遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化または核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ (L蛋白質) の両方によってウイルスゲノムの複製に伴って駆動される。これは、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による癌化や不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J. L. et

40

50

a l. , V a c c i n e 15 : 5 3 3 - 5 4 0 , 1 9 9 7 ) 。 センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、エピトープ結合  $\beta 2 m$  のインビボまたはエクスピボでの発現を目的とした遺伝子治療における有望な選択肢の一つとなることを支持するものである。

本発明のパラミクソウイルスベクターはリボ核タンパク質 (RNP) であってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、組み換えパラミクソウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力を言う。本発明のパラミクソウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、あるいは複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。宿主細胞としては、例えば LLC-MK2 または CV-1 等が挙げられる。以下にパラミクソウイルスベクターを例に本発明を詳細に説明するが、本発明のウイルスベクターとしてはパラミクソウイルスベクターに制限されず、以下の記載を基にして他のウイルスベクターも同様に作製することができる。

10

本発明において「パラミクソウイルス」とはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス 1, 2, 3 型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソ亜科 (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (Respirovirus) (パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス 1 型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス 3 型 (BPIV-3)、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス 1 型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス 10 型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明のパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI 粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417 (1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

20

30

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、および L 遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、および L 遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP 遺伝子は「N 遺伝子」と表記されることもある。

40

レスピロウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) 属に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP 遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X172

50

18、P 遺伝子についてはM30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M 遺伝子についてはD11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F 遺伝子についてはD00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131、HN 遺伝子についてはD26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L 遺伝子についてはD00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。なお、本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。10  
 遺伝子の由来に制限はなく、天然または人為的に設計された配列に由来するものであり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はないが、好適なパラミクソウイルスベクターとして、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N(ヌクレオキャプシド)、P(ホスホ)、M(マトリックス)、F(フュージョン)、HN(ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL(ラージ)蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。ゲノム内にエピトープ結合 $\beta$ 2mおよび/またはMHC class I重鎖をコードする遺伝子を挿入することにより、これらの蛋白質を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、20  
 ベクター上のウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。また、本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルスベクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに含まれていなくてもよい。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ベクターの再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、30  
 該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。また、パラミクソウイルスベクターが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルスベクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。感染性ウイルスを産生するRNP40  
 ベクターとしては、例えばN、P、M、F、HN、およびL遺伝子をコードするウイルスゲノムRNAと、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質とを含むRNPが挙げられる。このようなRNPを細胞内に導入すると、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質の働きによりウイルスゲノムが発現、複製され、感染性ウイルスベクターが増幅する。このように、パラミクソウイルスベクターの再構成の過程などで形成されるRNPをLLC-MK2細胞などの宿主細胞に導入して培養することにより、パラミクソウイルスベクターを増幅することもできる。この過程は、(a)パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNA、並びにNP、P/C、およびL蛋白質からなる複合体を細胞に導入する工程、および(b)該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収する工程、を含む。RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオンリポソーム50

などと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3015)。複製型ウイルスの場合、産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体 (例えばマウスなどの哺乳動物)などに再感染させて増幅または継代することができる。

また、M、Fおよび/またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明のパラミクソウイルスベクターとして用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および/またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組み換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる (国際公開番号WO00/70055およびWO00/70070)。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、本発明のウイルスベクターとして、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロップ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロップに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウイルスのゲノムがコードするエンベロップタンパク質以外のエンベロップ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロップ蛋白質を有するウイルスベクターを製造することができる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロップタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を挙げることもできる。本発明のウイルスベクターには、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロップタンパク質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば、エンベロップ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロップ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子 (例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子) の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスベクターは、例えばベクターに由来するウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えばパラミクソウイルスベクターにおいては、複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の一つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイ

10

20

30

40

50

ルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リポソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたパラミクソウイルスを作製することもできる。

またパラミクソウイルスベクターにおいては、アクセサリ遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリ遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、本発明のパラミクソウイルスベクターとして特に好適である。

エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I重鎖などの外来遺伝子を含む組み換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムにこれらの遺伝子を挿入することによって得られる。 $\beta 2m$ およびMHC class I重鎖としては、天然型蛋白質をコードする遺伝子を用いてもよく、また天然型蛋白質と同等の機能、すなわち、MHC class I/ペプチド複合体の形成活性、あるいはこの複合体の細胞傷害性T細胞による認識またはこの複合体によるCTLの活性化などの機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子を用いてもよい。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結 (E) 配列と転写開始 (S) 配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830)。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜E-I-S配列 (転写開始配列-介在配列-転写終結配列) またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列のユニットが配置されるようにする。あるいは、IRESを介して外来遺伝子を挿入し得る。

挿入した遺伝子の発現量は、その遺伝子上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (国際公開番号WO01/18223)。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど (野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が高い。挿入遺伝子の高い発現を得るためには、挿入遺伝子をNP遺伝子上流 (ネガティブ鎖においては3'側) またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、上流領域 (ネガティブ鎖ゲノムにおいては3'側) に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど (野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5'側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位)、またはL遺伝子上流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位) に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウイルスベクターの投与による導入遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウイルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける挿入遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のウイルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで

10

20

30

40

50

適切な発現量または治療効果が得られるすることも可能である。

一般に、細胞毒性を示さない限りにおいて、エピトープ結合 $\beta$  2 mの高い発現が得られれば、効率的な蛋白質の産生や免疫誘導などにおいて有利と考えられるため、エピトープ結合 $\beta$  2 mをコードする遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3' 端近くに挿入することが好ましい。好適なベクターの例としては、エピトープ結合 $\beta$  2 mをコードする遺伝子が、パラミクソウイルスベクターのネガティブ鎖ゲノムにおいて、該パラミクソウイルスのウイルス蛋白質のいずれよりも3' 側に配置されているベクターが挙げられる。例えばN遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてN遺伝子コード配列の3' 側）に外来遺伝子が挿入されたベクターが好ましい。あるいは、N遺伝子のすぐ下流に挿入してもよい。

10

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、ゲノムをコードするベクターDNA中の挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターは、このようにエピトープ結合 $\beta$  2 m遺伝子を挿入した以外の位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。このような外来遺伝子としては制限はない。例えばケモカインまたはサイトカイン遺伝子であってもよく、また、MHC class I重鎖の遺伝子、その他の遺伝子であってもよい。

例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスベクターは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kat 20  
o, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D.  
et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25 ng/ $\mu$  l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を、Not I部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNot I認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、Not I部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端をNot I部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S) (EIS配列)のコピーを付加するために、Not I制限酵素切断部位配列及び転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側(センス鎖)合成DNA配列及びリバース側(アンチセンス鎖)合成DNA配列(プライマーセット)を作成する。

30

例えば、フォワード側合成DNA配列は、Not Iによる切断を保証するために5' 側に任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNot I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3' 側にNot I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側にスパーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3' 側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

40

リバース側合成DNA配列は5' 側から任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCGおよびGCCなどのNot I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3' 側にNot I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、Not I認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのEIS塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する(いわゆる「6のルール(rule of six) 50

J ; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993)。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCCT-3' (配列番号: 1)、I配列の相補鎖配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (配列番号: 2)、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

10

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ (宝酒造) を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ (NEB) を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにウイルスゲノムcDNA中のNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる (Yu, D. et al., Genes Cells 2:457-466, 1997; Hasan, M. K, et al., J. Gen. Virol. 78:2813-2820, 1997)。例えば、まずNotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTTCACG-3') (配列番号: 3) を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA (pSeV(+)) のリーダー配列とNタンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18<sup>+</sup>b (+) を得る (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78:2813-2820)。pSeV18<sup>+</sup>b (+) のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることが

20

30

できる。このベクターに、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードするDNAを挿入する。本発明において用いるエピトープに制限はなく、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して治療効果を有する所望のエピトープ等を用いることができる。エピトープは、一般的には約10アミノ酸のペプチドを用いることが好ましいが、エピトープとするペプチドの長さは適宜変えることができる。エピトープ結合 $\beta 2m$ は、例えば $\beta 2m$ の分泌シグナルに続き、エピトープを連結させ、さらに適当な長さのスペーサー配列を介して $\beta 2m$ に連結させた蛋白質とすることができる。あるいは、スペーサーを介さず、エピトープを直接 $\beta 2m$ と連結してもよい。スペーサーのアミノ酸配列に特に制限はないが、例えばGly-Gly-Gly-Ser (配列番号: 13) からなるアミノ酸配列またはその繰返しである (Gly-Gly-Gly-Ser) 等を含むペプチドを用いることが好ましい。繰返し回数 (n) に制限はないが、例えば1~5 (1、2、3、4、または5) にすることができる。スペーサーを用いる場合、その長さは好ましくは16アミノ酸以内であり、例えば4アミノ酸、8アミノ酸、または16アミノ酸等を例示することができる。

40

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスベクターDNAに、適当な転写プロモーターを連結したDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、パラミクソウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させることにより、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターのゲノムをコードするDNAを転写させる工程を含む、該ウイルスベクターの製造方法を提供する。また本発明は、該DNAからなる、本発明のパラミ

50

クソウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる（国際公開97/16539号；国際公開97/16538号；Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235:323-332；Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8388-8392；Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13:4195-4203；Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14:5773-5784；Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4477-4481；Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14:6087-6094；Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1:569-579；Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71:1265-1271；Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15400-15404）。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターおよびその他の（-）鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロップ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

パラミクソウイルスベクターは、通常、（a）パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖（ポジティブ鎖）をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞（ヘルパー細胞）で転写させ、（b）該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAはNP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロップ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。ヘルパー細胞で発現させる、ウイルスゲノムをコードするDNA（ベクターDNA）は、ゲノムのマイナス鎖（ネガティブ鎖RNA）またはその相補鎖（ポジティブ鎖RNA）をコードしている。例えば、ネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖をコードするDNAをT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNAポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAをヘルパー細胞にトランスフェクトしてもよい。細胞内で転写させる鎖は、ウイルスゲノムのポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよいが、ポジティブ鎖が転写されるようにすることが再構成の効率を上げるためには好ましい。

例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、▲1▼目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、▲2▼目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、▲3▼目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

▲2▼としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA（Boehringer）、Superfect（QIAGEN #301305）、DOTAP、DOPE、DOSPER（Boehringer #1811169）などが挙げられる。▲1▼としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている（Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, *Virology* 52:456；Wigler, M.

and Silverstein, S., 1977, Cell 11:223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1)細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を2~4%CO<sub>2</sub>、35℃、15~24時間、2)DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3)沈殿混液中のDNA濃度が20~30μg/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している(Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:2745)。▲2▼の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン(Sigma #D-9885M. W. 5×10<sup>5</sup>)混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3015)。▲3▼の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で▲1▼や▲2▼の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界(電極間のギャップ、電圧)の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で▲2▼の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適にはSuperfect Transfection Reagent(QIAGEN, Cat No. 301305)、またはDOSPER Liposomal Transfection Reagent(Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169)が用いられるが、これらに制限されない。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100units/mlペニシリンGおよび100μg/mlストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば1μg/ml psoralen(ソラレン)存在下UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3(Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1:569-579, 1996)を2PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60μg、より好ましくは3~5μgの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必要なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5μgのpGEM-N、12-0.25μgのpGEM-P、および24-0.5μgのpGEM-L、より好ましくは例えば1μgのpGEM-N、0.5μgのpGEM-P、および1μgのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1:569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたりポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100μg/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40μg/mlのシトシンアラビノシド(AraC)(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。あるいは、上記の凍結融解による細胞破碎物を10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種し、約3日後、尿液を回収してもよい。エンベロープ

蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる(国際公開番号WO00/70055およびWO00/70070参照)。培養上清または尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)により決定することができる。混入し得るT7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈(例えば10<sup>6</sup>倍)して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは-80℃で保存することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、LLCMK2細胞、サル腎由来のCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適切なエンベロープタンパク質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている(中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間37~38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代真人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73, (1995))。

例えば、F蛋白質を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる(国際公開番号WO00/70055およびWO00/70070参照)

〈1〉F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス(SeV)全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup>b(+)(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78:2813-2820) (「pSeV18<sup>+</sup>b(+)」は「pSeV18<sup>+</sup>」ともいう)のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF(ATG-TGA=1698bp)を除いて例えばatgcatgccggcagatga(配列番号:4)で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA(pSeV18<sup>+</sup>/ΔF)を構築する。PCRは、Fの上流には(forward:5'-gttgagtactgcaagagc/配列番号:5, reverse:5'-tttgccggcatgcatgttttcccaaggaggagagtgtttgcaacc/配列番号:6)、F遺伝子の下流には(forward:5'-atgcatgccggcagatga/配列番号:7, reverse:5'-tgggtga

a t g a g a g a a t c a g c / 配列番号 : 8) の PCR 産物を *EcoT22I* で連結する。このように得られたプラスミドを *SacI* と *SalI* で消化して、F 欠損部位を含む領域の断片 (4931 bp) を回収して pUC18 にクローニングし、pUC18/dFSS とする。この pUC18/dFSS を *DraIII* で消化して、断片を回収して pSeV18<sup>+</sup> の F 遺伝子を含む領域の *DraIII* 断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF を得る。

外来遺伝子は、例えば pUC18/dFSS の F 欠損部位にある制限酵素 *NsiI* および *NgomI* V 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、*NsiI*-*tailed* プライマーおよび *NgomI* V-*tailed* プライマーで増幅すればよい。

〈2〉 SeV-F 蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスの F 遺伝子 (SeV-F) を発現する *Cre/loxP* 誘導型発現プラスミドの構築は SeV-F 遺伝子を PCR で増幅し、*Cre* DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミド pCALNdLw (Arai, T. et al., *J. Virology* 72, 1998, p1115-1121) のユニークサイト *SwaI* 部位に増幅産物を挿入し、プラスミド pCALNdLw/F を構築する。

F 欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F 蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えば SeV の増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株 LLC-MK2 細胞を用いることができる。LLC-MK2 細胞は、10% の熱処理した不動物血清 (FBS)、ペニシリン G ナトリウム 50 単位/ml、およびストレプトマイシン 50 μg/ml を添加した MEM で 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養する。SeV-F 遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、*Cre* DNA リコンビナーゼにより F 遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミド pCALNdLw/F を、リン酸カルシウム法 (mammalian transfection kit (Stratagene)) により、周知のプロトコールに従って LLC-MK2 細胞に遺伝子導入を行う。

10 cm プレートを用い、40% コンフルエントまで生育した LLC-MK2 細胞に 10 μg のプラスミド pCALNdLw/F をトランスフェクション後、10 ml の 10% FBS を含む MEM 培地にて、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 24 時間培養する。24 時間後に細胞をはがし、10 ml 培地に懸濁後、10 cm シャーレ 5 枚を用い、5 ml 1 枚、2 ml 2 枚、0.2 ml 2 枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL) を 1200 μg/ml を含む 10 ml の 10% FBS を含む MEM 培地にて培養を行い、2 日毎に培地交換しながら、14 日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきた G418 に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは 10 cm プレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。F 蛋白質の発現誘導は、細胞を 6 cm シャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルス AxCANCre を斉藤らの方法 (Saito et al., *Nucl. Acids Res.* 23:3816-3821 (1995); Arai, T. et al., *J. Virol.* 72, 1115-1121 (1998)) により例えば moi = 2 または 3 で感染させて行う。

〈3〉 F 欠損 SeV ウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18<sup>+</sup>/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにして LLC-MK2 細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を 5 × 10<sup>6</sup> cells/dish で 100 mm ペトリ皿に蒔き、24 時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365 nm) で 20 分間処理した T7 RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8122-8126 (1986)) に室温で 1 時間感染させる (moi = 2) (moi = 2 ~ 3、好適には moi = 2 が用いられる)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば 15 ワットバルブを 5 本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V))、ストラタジーン

10

20

30

40

50

社, La Jolla, CA, USA) を用いる。細胞を3回洗浄してからプラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP、pGEM/NP、pGEM/P、及び pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ 12 μg, 4 μg, 2 μg, 及び 4 μg/dish の量比で OptiMEM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1 μg DNA/5 μl の SuperFect, QIAGEN) を入れて混合し、室温で10分間放置後、最終的に3% FBSを含む OptiMEM 3ml に入れ、細胞に添加して培養する。3時間培養後、細胞を、血清を含まない MEM で2回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド 40 μg/ml (AraC, Sigma), トリプシン 7.5 μg/ml (GIBCO) を含む MEM で70時間培養する。これらの細胞を回収し、ペレットを OptiMEM に懸濁する (10<sup>7</sup> cells/ml)。凍結融解を3回繰り返して lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) と混合し (10<sup>6</sup> cells/25 μl DOSPER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングした F 発現ヘルパー細胞の一つ LLC-MK2/F7 細胞にトランスフェクション (10<sup>6</sup> cells/well 12-well-plate) し、血清を含まない MEM (40 μg/ml AraC, 7.5 μg/ml トリプシンを含む) で培養し、上清を回収する。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているエンベロップ遺伝子が異なる2種のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロップタンパク質が、もう一方のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロップタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロップ遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、エンベロップ遺伝子が欠損しているため、エンベロップ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子をより安定に保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

なお、複製性のパラミクソウイルスベクターを個体や細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑制する必要がある際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑制することもできる。

回収したパラミクソウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができる。

エピトープ結合β2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞に導入することにより、該細胞でエピトープ結合β2mを発現・分泌させることができる。本発明は、エピトープ結合β2mの生産方法であって、(a) エピトープ結合β2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清

10

20

30

40

50

から、エピトープ結合 $\beta$ 2mを回収する工程、を含む方法を提供する。

また、哺乳動物細胞で発現したエピトープ結合 $\beta$ 2mは、細胞自身が持つか、あるいは外来的に発現されたMHC分子とヘテロダイマーを形成する。これを回収して、エピトープ結合 $\beta$ 2mを含む蛋白質複合体を得ることができる。特に本発明は、MHC class

I重鎖、およびエピトープ結合 $\beta$ 2mを含む、MHC class I/ペプチド複合体の生産方法であって、(a) エピトープ結合 $\beta$ 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したMHC class I/ペプチド複合体を回収する工程、を含む方法を提供する。MHC class I/ペプチド複合体を調製する場合、より好ましくは、哺乳動物細胞で外来的にMHC class I重鎖を高発現させ、この重鎖とエピトープ結合 $\beta$ 2mの複合体を形成させる。例えばMHC class I重鎖を発現するウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する。ウイルスベクターとしては、特に制限はないが、パラミクソウイルスベクターを好適に用いることができる。あるいは、他のベクターを用いてもよい。または、哺乳動物細胞の染色体にベクターを組み込み、恒常的または誘導的に所望のMHC class I重鎖を発現するようにした細胞を用いることもできる。これにより、所望のMHC class I重鎖を細胞内で大量発現させ、MHC class I/ペプチド複合体を調製することが可能である。また、MHC class I/ペプチド複合体は、別々に調製したエピトープ結合 $\beta$ 2mとMHC class I重鎖とを結合させることにより調製することもできる。

発現させるMHC class I重鎖としては膜結合型であってもよく分泌型（または遊離型）であってもよい。また、MHC class I重鎖は、野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。分泌型MHC class I重鎖は、膜結合領域を欠失させた蛋白質を発現させることにより作製することができる。また、MHC class I重鎖には所望のペプチドを付加することもできる。例えば、MHC class I重鎖にビオチン化基質ペプチドを付加しておけば、これを発現させ、得られたMHC class I/ペプチド複合体をビオチン化した後で、アビジンを用いてMHC class I/ペプチド4量体を簡便に調製することが可能である。

本発明において「ビオチン化基質ペプチド」とはビオチン化の基質となり得るペプチドを言う。ビオチン化基質ペプチドとしては特に制限はなく、例えば $-\text{NH}_2$ がアミノ酸残基として化学反応可能な状態で配列しているペプチドであればどのようなものも利用可能である。例えば反応試薬にAssay Designs社のBiotin hydrazideを用いるならば糖部分に化学修飾可能であり、Biotin HNSを用いるならばリジンの $-\text{NH}_2$ に化学修飾可能であり、Biotin BMCCを用いるならば $-\text{SH}$ に化学修飾可能であり、5-(Biotinamido)-Pentylamine EZ-Linkを用いるならば $-\text{COOH}$ に化学修飾可能である。好ましくは、ビオチン化基質ペプチドは酵素的にビオチン化され得るペプチドである。例えば、アミノ酸（例えばリジン）に特異的に1つのビオチンを付加する酵素（ビオチンライゲース）の基質となるペプチドが好適である。このような酵素としては、例えばBir Aという大腸菌由来のビオチンライゲースが挙げられる。Bir Aは13アミノ酸からなるペプチド配列を認識し、その中央にあるリジンにビオチンを1つ付加することができる。Bir Aの基質となるペプチド配列は複数存在するが、例えばLGGIFEAMKMLRD（配列番号：31）などが挙げられる（Schatz, P. Biotechnology 11, 1138-1143 (1993); Crawford, F. Immunity 8:675-682 (1998)）。

このようなMHC class I/ペプチド4量体を作製するには、(a) ビオチン化基質ペプチドを含むMHC class I重鎖をビオチン化する工程、および(b) ビオチン化MHC class I重鎖をアビジンの存在下で会合させる工程を含む方法により行うことができる。具体的には、例えばMHC class I重鎖にBir A基

質ペプチド (BSP) 配列を付加しておき、このMHC class I重鎖を含むMHC class I/ペプチド複合体を調製する。その後、MHC class I重鎖をBir A酵素によりビオチン化する。FPLC等により、ビオチン付加MHC class I/ペプチド複合体を精製し、ストレプトアビジンのビオチン化部位と1:1になるように反応させることにより多量体化することができる。ストレプトアビジンは、適宜、R-フィコエリスリン (R-PE)、Cy5等により標識することができる。4量体化したMHC class I/ペプチド複合体はCTL (エピトープ特異的CD8陽性T細胞) への結合能が高まるため、CTL (エピトープ特異的CD8陽性T細胞) の検出や定量に極めて有用である。MHC class I/ペプチド多量体が結合した細胞は、FACS等により検出することができる。

10

すなわち本発明は、本発明のベクターあるいは該ベクターを用いて発現させたエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を利用した抗原特異的Tリンパ球の検出および定量方法に関する。また本発明は本発明のベクター、あるいは該ベクターを用いて製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を含む抗原特異的Tリンパ球の検出薬を提供する。また本発明は、本発明のベクター、あるいは該ベクターを用いて製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体の、抗原特異的Tリンパ球の検出のための使用を提供する。

例えば、MHC class I/ペプチドテトラマーを用いれば、エピトープ特異的CD8陽性T細胞の定量を高感度でかつ簡便に実施することができる。このテトラマーを用いた抗原特異的Tリンパ球の検出方法は、該テトラマーをTリンパ球を含む試料中に存在させる工程、および、該テトラマーが結合した細胞を検出する工程、を含む方法である。該テトラマーが結合した細胞を定量することにより、抗原特異的Tリンパ球を定量することができる。

20

個体の中でのエピトープ特異的CD8陽性T細胞の定量は、例えばHIV由来のエピトープに対しては、HIV感染者のPBMC  $1 \times 10^6$  に対して、HIVエピトープを提示するテトラマーをMHC class I/ペプチド複合体の量にして  $20 \mu g/ml$  添加し、 $37^\circ C$  で15分、 $4^\circ C$  で20分反応させる。このとき最適なテトラマーの量と反応温度は各テトラマーによって異なるので適宜調整する。その後抗CD8抗体-APCで重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析すると、全CD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の頻度を得られる。PBMCに限らず、リンパ節など組織から分離した細胞でも同様に定量できる。

30

上記の要領でテトラマーで染色した細胞をさらに抗PE抗体-マグネットビーズ (第一化学薬品) にてさらに染色し、磁気細胞分離装置 (第一化学薬品) を用いてエピトープ特異的細胞を分離することが可能である。このように、本発明のテトラマーはエピトープ特異的細胞の分離にも有用である。すなわち、本発明のテトラマーをTリンパ球を含む試料中に存在させる工程、および、該テトラマーが結合した細胞を分離する工程により、抗原特異的Tリンパ球を単離することができる。

また、本発明のベクターあるいは該ベクターを用いて発現させたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、インビトロにおけるCTLアッセイに利用することもできる。CTLアッセイの標的細胞としては、通常CTLと同一個体由来の細胞株、例えばエプシュタイン-バルウイルス (EBV) を用いてtransformしたB細胞株 (auto-lymphoblastoid cell line, auto-LCL) を合成ペプチドでパルスしたものが用いられるが、合成ペプチドの代わりに本発明のベクターにより製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ を添加したり、あるいは合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができ、実際に細胞傷害活性が確認された。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖 (膜結合型) を発現するウイルスベクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

40

また、エピトープ結合 $\beta 2m$ はエピトープ特異的細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の樹立

50

に使用することができる。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef 138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にしHIV Nef 138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞(同一個体由来の細胞)で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、本発明のエピトープ結合 $\beta$ 2mを発現するウイルスベクターを感染させた細胞の培養上清(すなわち遊離型エピトープ結合 $\beta$ 2m蛋白質)でも同様の効果が見られた。また、stimulator細胞にエピトープ結合 $\beta$ 2m発現ウイルスベクターを感染させることによって同様にCTLを樹立できる。さらに、本発明のエピトープ結合 $\beta$ 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体(1量体または多量体)を、例えばビオチン-アビジンの結合を利用する方法以外の方法でプロテインチップの支持基材に結合し、プロテインチップとして用いることも可能である。

MHC class I重鎖としては、特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子が好ましい。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。本発明において用いるHLAは、これらのいずれの分子でもよい。例えば感染症や癌などにおいて目的のエピトープが判明しているいずれのHLA型にも本発明を適用することが可能であり、オーダーメイド(あるいはテーラーメイド)な試薬とすることができる。

特に日本においては、HLA-A24(約6~7割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)などのHLA型の頻度が高く、次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)の頻度も高い。これらのHLAは、日本人への適用を考えた場合に特に好ましい。

ある程度の不特定多数に対応した試薬および医薬の開発のためには、例えば日本であれば、日本人において5%以上のアレル頻度のHLA(すなわち10%以上の日本人が有している)が好ましい。このようなHLA型としては以下のものが挙げられる。

A locus	B locus
A*0201	B*0702
A*0206	B*1501
A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
	B*4601
	B*52011
	B*5401

実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。HLA-A\*2402という遺伝子型は日本人の約6-7割が持つ。従って、A24拘束性HLA class I重鎖、特にA\*2402(Little, A.-M., Immunogenetics 35:41-45(1992))は、本発明において好適である。

本発明により得られるエピトープ結合 $\beta$ 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、本発明により得られるエピトープ結合 $\beta$ 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤を提供する。また本発明は、本発明により得られるエピトープ結合 $\beta$ 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体の抗原特異的細胞性免疫を誘導するための使用に関する。

本発明者らはSeVの発現系にてHLA-A\*2402によって提示されるHIV-1

Nefタンパク由来のエピトープを例にエピトープ結合 $\beta 2 m$ を作製し、これが分泌型蛋白質の形で細胞表面上のHLA-A\*2402分子と結合し、CTLに効率良く抗原を提示できることを証明した。本発明のウイルスベクターにより産生されるエピトープ結合 $\beta 2 m$ はタンパク製剤として利用できる可能性が示され、これを精製しウイルスの混入を除去すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を得ることが可能である。本発明は、本発明のウイルスベクターにより産生されるエピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物を提供する。

本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を用いて抗原特異的細胞性免疫を誘導する方法は、具体的には、本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を（エピトープ特異的）CD8陽性T細胞に接触させる工程を含む方法である。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ は有用である。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球（PBMC）を、放射線照射によって増殖不能にし、HIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、エピトープ結合 $\beta 2 m$ 感染細胞培養上清等でも同様の効果が得られる。

また、本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ は、インビトロでのCTLアッセイの標的細胞のパルスに有用である。CTLアッセイの標的細胞をパルスする際、合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 $\beta 2 m$ 感染細胞培養上清等でも同様の効果が得られる。通常は細胞表面上に、MHC class I重鎖（膜結合型）+ $\beta 2 m$ +ペプチドが既に発現している。ペプチドのパルスは、ペプチド部分の入れ替えを狙ったやり方であるが、エピトープ結合 $\beta 2 m$ では、 $\beta 2 m$ +ペプチドとの入れ替えが行われるものと考えられる。

また、エクスピボで患者樹状細胞へパルスする際にも本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ は有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞にエピトープ結合 $\beta 2 m$ をパルスし、患者の皮下に接種する。インビボの項と同様、細胞表面でMHC class I重鎖（膜結合型）+エピトープ結合 $\beta 2 m$ の形で発現し、エピトープ特異的CTLを誘導できることが期待される。樹状細胞をペプチドでパルスした場合より、エピトープがMHC class I重鎖（膜結合型）上に長く発現する可能性があり、細胞性ワクチン（治療ワクチン）として期待できる。また、本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ をインビボでタンパク製剤として直接投与することにより、エピトープ特異的CTLを誘導することも可能と考えられる。

また、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター自身を、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを含む抗原特異的細胞性免疫の誘導剤に関する。また本発明は、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターの、抗原特異的細胞性免疫を誘導するための使用に関する。本発明のウイルスベクターは、遺伝子治療のために有用である。本発明は、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。該ウイルスベクターは、抗原特異的細胞性免疫を誘導できるため、感染症や癌などにおいて抗原特異的免疫を誘導するために有用である。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接（インビボ）投与による遺伝子発現、間接（エクスピボ）投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても投与することができる。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、stimulator細胞での刺激において合成ペプチドを使用する代わりにエピトープ結合 $\beta 2 m$ 発現ウイルスベクターを感染させることによってCTLを樹立できる。

また、インビトロでCTLアッセイの標的細胞のパルスにおいて本発明のベクターを使用

することもできる。合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 $\beta 2 m$ 発現ウイルスベクターをautocellに感染させることによって標的細胞として使用することができ、実際に細胞傷害活性が確認された。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖(膜結合型)を発現するウイルスベクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現するウイルスベクターを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

さらに本発明のベクターは、エクスピボで患者樹状細胞への遺伝子導入にも有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞にエピトープ結合 $\beta 2 m$ 発現ウイルスベクターを感染させ患者の皮下に接種する。ペプチドやエピトープ結合 $\beta 2 m$ 蛋白などでパルスしても、樹状細胞上でどれくらいの期間持続発現されるかが問題かも知れない。実際にペプチドパルスでは、樹状細胞上でのエピトープは発現が短期間で消失することが指摘されている。その点ウイルスベクターで感染させ、細胞内からエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現させれば、長期にわたってエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現させることができる。さらに、インビボでのベクター投与によりエピトープ特異的CTLを誘導するインビボ遺伝子治療にも本発明のベクターは有用である。

ベクターによる遺伝子導入の標的となる細胞は、好ましくは抗原提示能を有する細胞である。このような細胞としては、特に樹状細胞(DC)が挙げられる。例えば、エクスピボにおいて、樹状細胞に本発明のベクターを導入することによって、該細胞において所望のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができる。この細胞を用いて、抗原特異的T細胞を活性化することができる。本発明は、本発明のエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞に関する。哺乳動物細胞としては、抗原提示能を有する所望の単離細胞等を用いることができる。特に、該細胞においてMHC class I重鎖をコードする遺伝子を外来的に導入することにより、大量のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができる。MHC class I重鎖をコードする遺伝子は染色体外に存在する発現ベクターにコードされていてもよく、また細胞の染色体に組み込まれていてもよい。細胞内で分泌型MHC class I重鎖を発現させれば、細胞から分泌型のMHC class I/ペプチド複合体が産生される。この細胞は、特に分泌型のMHC class I/ペプチド複合体の調製に有用である。細胞で膜結合型MHC class I重鎖を発現させれば、該細胞表面に膜結合型MHC class I/ペプチド複合体が発現する。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対して優れた抗原提示能を有する。また本発明は、本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2 m$ を細胞表面に有する細胞に関する。このような細胞は、例えば、本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2 m$ を細胞に添加することにより調製することができる。例えば、患者から樹状細胞を調製し、試験管内で当業者に公知の方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この細胞を本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2 m$ と混合する。これにより、このエピトープ結合 $\beta 2 m$ が、患者由来の樹状細胞表面のMHC class I重鎖と複合体を形成する。この細胞も、エピトープ特異的CTLに対して抗原提示を行う能力を有する。このようにして作製した、目的のエピトープを提示する細胞を患者体内に戻すことにより、このエピトープに特異的な免疫を誘導することができる。すなわちこの細胞はワクチンとして利用することができる。このように、本発明の方法により製造されたエピトープ結合 $\beta 2 m$ は、患者において抗原特異的免疫を誘導するための医薬として有用である。本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2 m$ を細胞にパルスすることにより、エピトープ結合 $\beta 2 m$ を細胞表面に有する細胞を製造する場合においては、パルスする前に酸処理により既存のエピトープを除去することができる。酸処理とは、細胞表面に提示されているエピトープペプチドが有意に解離するような酸性票境に細胞を暴露する工程により実施することができる。酸処理は、例えば細胞を4℃のpeptide stripping buffer(0.13M citric acid(pH3), 66mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 17mg/ml Phenol Red)で1分間処理し、その後十分量の培養液(例えばRPMI)にて中和することにより実施することができる。当業

10  
20  
30  
40  
50

者であれば、これ以外にも同様の効果を示す酸処理を異なるプロトコルで行うことができる。本発明は、上記のエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された細胞、または本発明の方法により製造されたエピトープ結合 $\beta 2 m$ を持つ細胞を含む医薬組成物を提供する。

基本的に、体細胞のほとんどはMHC class Iを内因的に発現しているため、上記の細胞の製造においてはMHC class I重鎖を外来的に発現させる必要はなく、エピトープ結合 $\beta 2 m$ のみを発現または添加すればよい。患者のMHC型を検査し、この型に沿って選択したエピトープ結合 $\beta 2 m$ を発現または添加することにより、テーラーメイドの治療を実現することができる。例えば、患者のMHC class IのタイプがA24拘束性であるなら、A24拘束性T細胞により提示されたエピトープを融合させた $\beta 2 m$ を用いることにより、より有効な治療効果を得ることができると期待される。MHC型は血清型または遺伝型で一致していることが好ましく、遺伝型で一致していることがより好ましい。HLA-A\*2402という遺伝子型は日本人の約7割が持つため、この型を持つ細胞により提示されたエピトープを同定し、これを用いてエピトープ結合 $\beta 2 m$ を設計することにより、特に日本人への適用に適した医薬を作り出すことが可能である。さらに様々なMHC型のエピトープを解析することにより、個々の患者に最適な治療戦略を決定することが可能となる。

本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター、該ベクターにより得られるエピトープ結合 $\beta 2 m$ およびMHC class I/ペプチド複合体、該ベクターが導入された細胞、または該エピトープ結合 $\beta 2 m$ を細胞表面に有する細胞は、必要に応じて薬理的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせて組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは本発明のベクター、エピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体、あるいは上記細胞と共に投与することが可能であり、これらの活性を有意に阻害しない材料である。例えば本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター、あるいは該ベクターにより得られるエピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などで適宜希釈して組成物とすることができる。パラミクソウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでもよい。また上記細胞は生理食塩水、PBS、または培養液などに懸濁してもよい。また本発明の組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は試薬として、および医薬として有用である。また本発明の組成物はワクチンとして有用である。本発明は、本発明のベクターあるいは該ベクターにより得られるエピトープ結合 $\beta 2 m$ またはMHC class I/ペプチド複合体、あるいは上記細胞を含む組成物の試薬、医薬、またはワクチンとしての使用にも関する。ワクチン組成物は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全 Freund's アジュバント、MF59 (オイルエマルジョン)、MTP-PE (マイコバクテリア細胞壁由来のmuramyl tripeptide)、およびQS-21 (soap bark tree Quilaja saponaria由来)などのアジュバントを組み合わせることもできる。

また、本発明の医薬組成物の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えばi) IL-2と一本鎖IL-12との組み合わせ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15):8591-8596, 1999)、ii) IL-2とインターフェロン $\gamma$ (米国特許第5,798,100号)、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)、iv) 脳腫瘍を治療対象としたGM-CSFとIL-4の組み合わせ(J. Neurosurgery 90(6), 1115-1124 (1999))などが挙げられる。

ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して

10

20

30

40

50

適用することができる。感染症の治療としては、例えば感染性微生物の抗原蛋白のエピトープを解析し、これを結合させたβ2mを製造することができる。抗原蛋白としては、例えばインフルエンザにおいては、強毒株H5N1型等のエンベロップ、日本脳炎においては、例えばエンベロップ蛋白質 (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えばHIV gagまたはSIV gag蛋白質 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIVエンベロップ蛋白質、Nef蛋白質、その他のウイルス蛋白質などが挙げられる。コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット (CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16 (10) : 934-8, Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16 (3) : 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4 (8) : 949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000))などが挙げられる。また、病原性のパラミクソウイルス、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに本発明を適用することもできる。また、日本脳炎のJE-E抗原タンパク質 (特開昭64-74982、特開平1-285498)。ヒト単純ヘルペスウイルスのgD2タンパク質 (特開平5-252965)。C型肝炎ウイルス由来ポリペプチド (特開平5-192160)。偽狂犬病ウイルス由来ポリペプチド (特表平7-502173) などにおけるエピトープを用いることもできる。例えば、これらの病原性微生物に感染した患者由来の細胞を解析して、抗原提示細胞 (APC) において提示された抗原蛋白のエピトープを同定する。HLA型を適宜選択することにより、所望のHLA型に対するエピトープを同定することが可能である。

腫瘍特異的抗原に着目し、それらを標的とした多角的な新しい治療戦略や治療法の開発を行うことには腫瘍治療の上で臨床的意義がある。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提示細胞 (APC) に本発明のペクターを用いてエピトープ結合β2mを発現させたり、エピトープ結合β2mまたはMHC class I/ペプチド複合体等の蛋白質製剤を投与することができる。

一般的な手法としては、ヘルパーT細胞 (Th) への抗原提示能を持つことが知られている樹状細胞 (DC) が、CTLに対してもMHCクラスI分子を介して高い抗原提示能を有することが知られており、これを用いたワクチン療法の開発が挙げられる (J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1 (12), 1279-1302, (1995))。腫瘍免疫療法の一例としては、種々の悪性腫瘍にも発現が認められるMAGE抗原を標的とした腫瘍ワクチン療法の確立が藤也寸志ら (国立病院九州がんセンター) により進められている。再発胃腫瘍症例6例、再発食道腫瘍1例の7例に対し治療を施行したところ、食道腫瘍症例で転移リンパ節の縮小、腫瘍マーカーの減少および臨床症状 (嘔声) の改善が認められ、胃腫瘍症例では6例中4例で腫瘍マーカーの減少を認めている。副作用は全く認められておらず、腫瘍免疫療法の安全性が示唆されている。また臨床症状の改善や腫瘍マーカーの低下が見られた症例が多く、ワクチンの投与方法や適応症例の選別などにより有効な治療法となりうる可能性を示唆している。MAGE-3ペプチドを用いたDCワクチン療法は、実際に臨床試験が開始され、進行再発消化器癌症例に対する安全な腫瘍特異的免疫療法となる可能性が示唆される。しかしながら多数の患者を対象とした予防的ワクチン投与においては、"nature adjuvant"である樹状細胞を各々の患者に対して最適に調整、投与していくのは明らかに煩雑で、非現実的である。何らかの効率的方法が求められている (『山岸 久一ら京都府立医科大学 日本癌治療学会総会1999年10月12日 (火) 於 岐阜市での発表』)。このような腫瘍ワクチン療法に本発明を適用することは極めて有効であると考えられる。

ウイルスが引き金となってできる腫瘍の予防は、そのウイルスのワクチンによる感染予防により達成されうる。ウイルスが原因の腫瘍は他の原因による腫瘍に比較し、確実に予防

10

20

30

40

50

が可能となる。例えば、肝臓腫瘍に関わるC型肝炎(HCV)、子宮がんに関わるパピローマウイルス(HPV)、成人性白血病の原因であるHTLV-1につき、感染予防と治療を目的としたワクチンがあげられる。肝臓腫瘍は日本の腫瘍発症の中でも高い割合を占める。C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の多くで肝細胞癌が発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治療に導くことが可能となったが、有効率は当初期待されたほどではなく、半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。一般のウイルス感染の予防は、ワクチン接種により中和抗体を誘導して行うがC型肝炎ウイルスは変異しやすく、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。ウイルス感染症では中和抗体の誘導以外にCTLを誘導することにより、感染予防が可能であることが知られている。本発明のベクターの投与により、このようなケースに対してもCTL活性化を誘導できると期待される。

森山貴志(自治医科大学)らは、CTLを誘導する新しい方法として病原体抗原をコードする遺伝子そのものをワクチンとして用いる方法(DNAワクチン)を研究している。その問題点は概説書が示すとおり、発現量が十分でない、投与部位が筋肉などに限られる等がある(『DNAワクチンその現状と新知見:倉根一郎(感染症研);今日の感染症;Vol.19, NO.3 PAGE.6-9, 2000』)。また『癌と免疫 癌の特異的免疫療法 HER2由来ペプチドによる乳癌のワクチン療法;影山慎一, 渡辺正人, 日浅厚則, 珠玖洋(三重大 医);現代医療;Vol.32, NO.5 PAGE.1167-1172 2000』では乳癌などで過剰発現が認められているチロシンキナーゼ活性を持つ膜型糖蛋白質HER2を利用した癌ワクチンについて概説されている。本発明により適用されるウイルスベクターは、このようなDNAワクチンよりも高い効果を発揮することが期待される。哺乳動物の広範な組織で発現可能なウイルスベクター(アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクターなど)を用いて本発明のベクターを構築すれば、高い効率を有するワクチンを提供することが可能と考えられる。

子宮がんは女性のみの腫瘍であるが、HPVによる感染予防と治療ワクチンの開発の重要性は変わらない。HTLV-1は、母子感染が主な感染ルートと理解されるに至ったが、それ以外の感染経路もある。近年発見されたHGVは病原性は明確になっていないが、HCVと共に社会に拡がっており、このようなウイルスの防疫も公衆衛生上必要であり、本発明の適用の対象となる。

抗原提示細胞の利用並びに投与経路に関する検討も重要である。最も研究されている投与経路は、樹状細胞(DC)がCTLに対してもMHC class I分子を介する抗原提示能を有することを利用して、末梢血のわずかなDCを患者から取り出し試験管内で培養増幅して、これを静脈内注射で体内にもどす方法を用いたワクチン療法である。この方法は相当の施設と、培養時間を必要とする方法である。最近注目される方法は皮膚を利用したワクチン療法である。ランゲルハンス細胞(LC)を含む樹状細胞は、近年その細胞上のMHC class I分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的にCTLに提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法の研究が大きく注目されている。皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチド、さらには抗原含有遺伝子の塗布により効果的なDNAワクチン法が開発できる可能性がある。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないため正常皮膚を用いてのウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法は実現が難しい。これを解決する方法として、瀬尾尚弘、瀧川雅浩(浜松医科大学)らは皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピング(TS)を8~15回繰り返すことによって破壊し、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを実証した(

10

20

30

40

50

特願平10-316585 Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 97, Issue 1, 371-376, January 4, 2000)。このような方法はバリア破壊皮膚へのウイルスペプチド、癌ペプチドさらには抗原DNAの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療の可能を広げるものである。本発明においても、これらの投与方法を適用することができる。

さらに確実な臨床応用のためには、ヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌反応性CTL誘導抗原遺伝子をクローニングし、癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異的免疫療法の標的分子を開発することが重要である。対象とする患者と同じ型を持つHLAにより提示されたエピトープを同定し、これを用いて本発明のベクターやペプチドワクチンを製造することにより、より効果的に免疫を誘導することが期待できる。

日本において多発する癌、例えば肺癌、消化管癌（食道、胃、大腸癌）、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病のなかでも、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌を治療ターゲットする事は臨床上有益である。上皮性癌は日本における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみならず、世界にも最も頻発する癌である。よって、上皮性癌細胞特異的抗原のエピトープは、本発明において好適に用いられる。またHLAとしては日本でも発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、及びHLA-A26（約2割）抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定が特に重要である。次いで、HLA-A11（2割）、-A31（2割弱）、-A33（2割弱）を対象とする同定も重要である。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有する。また上記HLAアレルは人種をこえて広く認められる。したがってこれらのタイプのHLAを持つ細胞から癌反応性CTL誘導抗原遺伝子を同定し、これを本発明に適用することが好ましい。

伊東恭悟（久留米大 医）らは日本人に多発するヒトHLA-クラス・拘束性上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌反応性CTL誘導能をもつ抗原遺伝子をすでにクローニングしている。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるインビトロにおけるキラーT細胞誘導能の解析が行われている（食道癌患者自己CTL癌局注による特異的養子免疫療法後の末梢血リンパ球に対するクローニングとその解析：唐宇飛，山名秀明，末吉晋，新谷文彦，田中寿明，久保田雅博，峯孝志，笹原弘子，伊東恭悟（久留米大）；日本消化器外科学会雑誌；Vol. 33, No. 7, Page 1191, 2000）。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子（SART-1～SART-4）、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子がクローニングされ、それらをコードする蛋白が解析されている。SART-1遺伝子導入した癌細胞は選択的アポトーシスを誘導した。またHLA-A24拘束性ペプチド（SART-1 690-698）が強いCTL誘導およびHLA-A26拘束性ペプチドSART-1 736-744によるHLA-A2601、-A2602、-A2603癌患者CTL誘導が確認されている（『腫瘍の抗原ペプチド療法 SART-1抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法；山名秀明，伊東恭悟（久留米大 医）；医学のあゆみ；Vol. 190, NO. 2 PAGE. 129-133 1999』、『SART1ペプチドによるサブタイプの異なるHLA-A26陽性健康人及び癌患者末梢血リンパ球からのCTLの誘導；井上佳子（国立腫瘍セ 研）；中尾真修，松永和子，増岡・菊地慈，山名秀明，伊東恭悟（久留米大 医）；日本癌学会総会記事』）。さらにSART-3癌反応性CTL誘導抗原遺伝子：140

kDのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現し、同抗原内にHLA-A24+癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つの9個のアミノ酸からなるペプチド（nonapeptide）が同定されている（『転移性癌患者におけるHLA-A24拘束性Ick由来ペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導と機能解析；山名秀明，笹富輝男，宮城佳昭，唐宇飛，白水和雄，伊東恭悟（久留米大

医) ; 日本外科学会雑誌 ; V o l . 1 0 1 , 臨時増刊号 P A G E . 4 1 7 2 0 0 0 ] ) 。これらの癌反応性 C T L 誘導抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現は S A R T - 1 抗原は扁平上皮癌の 6 0 ~ 8 0 % 、乳癌を除く腺癌の 4 0 ~ 5 0 % に発現していた。また S A R T - 2 は扁平上皮癌の 6 0 % 以上に、S A R T - 3 は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍で発現していた。これに対し、これらの抗原は正常組織には辜丸を除き発現されていない (腫瘍免疫 9 ヒト癌特異的キラー T 細胞により認識される抗原 2 ヘン平上皮癌反応性 C T L 誘導抗原 S A R T - 1 およびペプチドワクチン ; 伊東恭悟, 七条茂樹, 山名秀明 (久留米大 医) ; 免疫 Immunology Frontier ; V o l . 9 , N o . 3 , P a g e 1 9 5 - 2 0 4 , 1 9 9 9 ) 。H L A - A 2 6 は日本人の 2 2 % 、H L A - A \* 2 4 0 2 は日本人の約 6 0 % が保有している。これらより、日本における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられている。現在久留米大学において上記ペプチドを用いての第 1 相臨床試験が計画されている (臨床ガイドライン解説第 1 回腫瘍ペプチドワクチン臨床試験のガイドラインについての提案 ; 山名秀明, 伊東恭悟 (久留米大 医) ; 分子細胞治療 ; V o l . 1 , N o . 1 , P a g e 8 9 - 9 5 , 2 0 0 0 ) 。これらの抗原蛋白質に由来するエピトープに本発明を適用することは有効であると考えられる。

以上に記載したペプチド抗原をコートする遺伝子を本発明に用いれば、腫瘍に対する有効な免疫治療を行うことが可能となる。その他のエピトープとしては、癌抗原 M u c - 1 または M u c - 1 様ムチンタンデムリピートペプチド (米国特許第 5 , 7 4 4 , 1 4 4 号) 、メラノーマ g p 1 0 0 抗原などが挙げられる。これらの遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、上記に示した腫瘍抗原ペプチド H E R 2 遺伝子の正常組織および腫瘍での発現は、乳癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞性肺癌において約 2 0 から 4 0 % の症例に遺伝子増幅または発現の増加が認められ、その発現増加は腫瘍特異性の傾向が高いと考えてよい。卵巣癌患者および健康人末梢血由来単核球より精製した樹状細胞と H E R 2 由来の 2 種の 9 m e r ペプチド ( H E R 2 p 6 3 - 7 1 , p 7 8 0 - 7 8 8 ) なども例示することができる ( E u r . J . I m m u n o l . 2 0 0 0 ; 3 0 : 3 3 3 8 - 3 3 4 6 ) 。また、C E A 陽性進行固形癌に対して、C E A エピトープペプチドを用いた癌ワクチン療法 (特異能動免疫療法) に本発明のベクターまたは蛋白質を適用することも考えられる ( K i m , C . e t a l . , C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . 4 7 ( 1 9 9 8 ) 9 0 - 9 6 ) 。例えば、成分採血により患者より多量の末梢血単核細胞を採取した後、その単球分画から I L - 4 、G M - C S F 添加下に樹状細胞 ( D C ) を誘導、誘導された D C に本発明のベクターを用いて製造した C E A ペプチドあるいはベクターそのものを導入し、" D C ワクチン" として皮内投与することが考えられる ( C E A 特異的能動免疫療法により血清 C E A 値と抗腫瘍効果に解離を認めた肺癌 骨転移の一例 ; 清水啓二, 上田祐二, 伊藤剛, 岡本和真, 白数積雄, 阪倉長平, 大辻英吾, 北村和也, 山岸久一 (京都府医大) ; 日本臨床外科学会雑誌) 。

また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えば I 型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドをエピトープとして利用することが考えられる ( C o o n , B . e t a l . , J . C l i n . I n v e s t . , 1 9 9 9 , 1 0 4 ( 2 ) : 1 8 9 - 9 4 ) 。

本発明のベクターまたは本発明のベクターにより得られるエピトープ結合  $\beta 2 m$  または M H C c l a s s I / ペプチド複合体を含む組成物は、抗原特異的細胞性免疫を少なくとも部分的に誘導するのに十分な量を投与される。但し、投与蛋白質量、または導入遺伝子の発現量は、その有効レベルおよび中毒レベルを考慮して決められるべきである。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われうるがそれらに限定されない。また局所あるいは全身に投与し得る。細胞性免疫の誘導は、本発明に記載したような C T L アッセイ等により検出することができる。

本発明のベクターの投与により細胞に導入された遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法

10

20

30

40

50

によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、導入遺伝子発現の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するように組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、またはGFPをコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されない。

エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。例えば、 $10\text{ ng/kg}$ から $100\ \mu\text{g/kg}$ 、好ましくは $100\text{ ng/kg}$ から $50\ \mu\text{g/kg}$ 、より好ましくは $1\ \mu\text{g/kg}$ から $5\ \mu\text{g/kg}$ の範囲であるとよい。複数のエピトープを組み合わせる場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体は、適宜、薬学上容認可能な担体と組み合わせる投与することができる。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの力価は好ましくは約 $10^5\text{ pfu/ml}$ から約 $10^{11}\text{ pfu/ml}$ 、より好ましくは約 $10^7\text{ pfu/ml}$ から約 $10^9\text{ pfu/ml}$ 、最も好ましくは約 $1 \times 10^8\text{ pfu/ml}$ から約 $5 \times 10^8\text{ pfu/ml}$ の範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、好ましくは約 $10^5\text{ pfu/回}$ から $10^{11}\text{ pfu/回}$ 、より好ましくは約 $10^7\text{ pfu/回}$ から $10^9\text{ pfu/回}$ 、最も好ましくは約 $10^8\text{ pfu/回}$ から $10^9\text{ pfu/回}$ で投与する。

本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[実施例1] HLA-A\*2402遺伝子およびヒト $\beta 2m$ 遺伝子の単離  
ヒトのMHC class Iの1つであるHLA-A\*2402遺伝子、およびヒト $\beta 2m$ 遺伝子は、HLA-A24を持つ健常人末梢血単核球(PBMC)由来のメッセンジャーRNA(mRNA)よりクローニングした。mRNAの分離にはMicro-Fast Track Kit (Invitrogen)を用いた。cDNA合成にはAMV-RT First-strand cDNA synthesis kit (LIFE SCIENCE)を用いた。

得られたcDNAを鋳型にしてHLA-A\*2402遺伝子は、プライマーHLA-5P2, HLA-3Bを用いて、 $\beta 2m$ 遺伝子はb2m-5', b2m-3'を用いてPCRを行った。

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3' (配列番号: 9)



pSeVb」と総称する)。また、本来の $\beta 2m$ のみを発現するセンダイウイルス $\beta 2m$ / $pSeVb$ は $b2m-a$  (5'-TGCGGCCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCCTTA-3' / 配列番号: 20) と $b2m-d$ を用いて上記と同様に $\beta 2m/pSeVb$ を得た。Nefのエピトープ (Nef138-10) のアミノ酸配列を配列番号: 24に、Envのエピトープ (Env584-11) のアミノ酸配列を配列番号: 26に示す。

[実施例3] ビオチン化基質ペプチドを付加した分泌型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

HLA-A\*2402遺伝子細胞外領域へのBirA substrate peptide (BSP) 配列 (配列番号: 31) とヒスチジンタグ (his), センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加はPCRにて行った (図2)。

使用したプライマー;

A24-a, 5'-TGCGGCCCGCCGTACGAGGATGGCCGTCATGGCGCCCG-3' (配列番号: 32

)

A24-d1, 5'-GTCCCGCAGCTCCATCTTCATTGCCTCAAAGATTCTCCAAGGGATCCCCATCTCAGG

GTGAGGGCTT-3' (配列番号: 33)

A24-d1/his, 5'-CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTGATGGTGGTGGTCCCGCAGCTCCAT-3' (配列

20

番号: 34)

A24-d2/his, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3' (

配列番号: 35)

A\*2402/pGEMを鋳型としてA24-a, A24-d1を用い94℃1分、48℃1分、72℃1分、にて15サイクル行った後、72℃7分にて伸長反応を行った。得られたPCR産物を鋳型としてA24-a, A24-d1hisを用いて同様にPCRを行い、さらにそのPCR産物を鋳型としてA24-a, A24-d2hisを用いて同条件にてPCRを行い、A24-BSPhis断片を得た。以下 $e/\beta 2m/pSeVb$ 作製時と同様にA24-BSPhis/ $pSeVb$ を得た。

30

[実施例4] 膜結合型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

センダイウイルスE, Sシグナル、NotI部位の付加はPCRにて行った (図2および3)。

使用したプライマー;

A24-a#, 5'-TGCGGCCCGCCGTACGCCGAGGATGGCCGTCATGGCGCCCG-3' (配列番号: 40)

A24-d4, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCACACTTACA

AGCTGTGAG-3' (配列番号: 41)

40

A\*2402/pGEMを鋳型としてA24-a#, A24-d4を用い94℃1分、48℃1分、72℃1分、にて15サイクル行った後、72℃7分にて伸長反応を行い、A24full断片を得た。以下 $e/\beta 2m/pSeVb$ 作製時と同様にA24full/ $pSeVb$ を得た。

[実施例5] センダイウイルスベクターの再構成および感染

pSeV18<sup>+</sup>b(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, vTF7-3はHasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78:2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2:457-

50

466に記載されている。センダイウイルスベクターの再構成は、上記文献に記載の方法に従って行った。e/Nef138-β2m/pSeVbおよびe/Env584-β2m/pSeVbから、それぞれe/Nef138-β2m/SeVbおよびe/Env584-β2m/SeVbを得た(e/β2m/SeVbと総称する)。また、A24-BSPHis/pSeVbおよびA24full/pSeVbから、それぞれA24-BSPHis/SeVbおよびA24full/SeVbを得た。

サルノ腎臓由来細胞株CV-1およびLLCMK2は、10%ウシ胎児血清(FCS)、100U/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリン(Life Technologies)を含むMEM(SIGMA)培地(M10)にて培養した。以下のセンダイウイルスの感染においては、特に断らない限り、各m.o.i.にて組換えセンダイウイルスをCV-1細胞に感染させ、無血清MEMにて三日間培養した。

[実施例6] エピトープ結合β2m(e/β2m)の回収および定量  
e/β2m/SeVbまたはβ2m/SeVbを感染させたCV-1細胞の培養上清を、センダイウイルス粒子を除去するため、40,000×gで遠心し上清を回収した。

培養上清中のe/β2mの定量はサンドウィッチenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法にて行った。Capture抗体には抗ヒトβ2ミクログロブリンモノクローナル抗体(DACO)2.5μg/mlを、detector抗体には抗ヒトβ2ミクログロブリンモノクローナル抗体パーオキシダーゼ標識(DAKO)500ng/mlを用い、発色にはTMBパーオキシダーゼ発色キット(BIO-RAD)を用いた。

標準サンプルに精製ヒトβ2ミクログロブリン(Biogenesis)を用いた。

[実施例7] 分泌型MHC class I/ペプチド複合体の回収、精製  
A24-BSPHis/SeVbとe/Nef138-β2m/SeVbあるいはe/Env584-β2m/SeVbとをCV-1細胞に重感染させた。感染細胞の培養上清を回収し、センダイウイルス粒子を除去するため、40,000×gで遠心し上清を回収、1mM PMSF、3μg/ml leupeptin、3μg/ml aprotinin、3μg/ml pepstatin Aを加えた。MHC class I/ペプチド複合体の上清への分泌の確認はサンドウィッチELISA法にて行った。Capture抗体には抗ヒトMHC class Iモノクローナル抗体(Ancell)1μg/mlを、detector抗体には抗ヒトβ2ミクログロブリンモノクローナル抗体パーオキシダーゼ標識(DAKO)250ng/mlを用い、発色にはTMBパーオキシダーゼ発色キット(BIO-RAD)を用いた(図4)。

培養上清はNiSO<sub>4</sub>を充填したHitrap-Chelating column(Amersham Pharmacia)を用い、FPLC(Amersham Pharmacia)にて0.02M NaHPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl(pH7.4)のバッファー条件にて0から0.5MのImidazoleの濃度勾配中で溶出した。PD-10 column(Amersham Pharmacia)を用いて溶液を10mM Tris-HCl(pH8.0)に置換後、Centricon-30(Amicon)を用いて限外濾過法にて濃縮した(図5)。

[実施例8] MHC class I/ペプチド複合体の作製  
ビオチンの付加にはBirA酵素(Avidity)を用いた。反応は1.8mg/ml MHC class I/ペプチド複合体1mgをBirA 10μgと、10mM Tris-Cl(pH8.0), 50mM Bicine(pH8.3), 10mM ATP, 10mM MgOAc, 100μM biotin下で25℃、18時間反応させた。

ビオチン付加MHC class I/ペプチド複合体の精製はSuperdex 200 HR10/30 column(Amersham Pharmacia)を用いFPLCにて20mM Tris-Cl(pH8.0), 150mM NaClで行った。その後PD-10 columnを用いて2mM EDTAを含むPBSに溶液置換し、Centricon-30を用い限外濾過法にて2mg/mlに調整した。Strept

avidin-RPE (Molecular Probes) と MHC class I / ペプチド複合体: Streptavidin のビオチン化部位 = 1 : 1 で反応させることによって多量体化した。

[実施例 9] Nef138-10 特異的 CTL クローンの樹立  
HLA-A\*2402 を持つ HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を  $3 \times 10^5$  / 96well ずつ R10 100  $\mu$ l で一晩培養した。次の日に stimulator 細胞 (0.2  $\mu$ g/ml PHA (SIGMA)、10% Lymphocult-T (Biotest) を含む RPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) で一晩活性化し 3,000 rad にて放射線照射を行った後、10  $\mu$ M の Nef138-10 で 1 時間パルスした自己の PHA-blast) を加え、抗ヒト CD28 1  $\mu$ g/ml 存在下で 2 週間培養した。その後 1 週間おきに stimulator 細胞 (10,000 rad で放射線照射し 10  $\mu$ M Nef138-10 でパルスした自己の Epstein-Barr virus transformed B cell line (B-LCL)) で刺激を加えた。2~4 回刺激後、CTL 活性が確認できたらクローニングを行った。

クローニングは 0.8 cell/well の細胞を  $1 \times 10^5$  cell/well stimulator 細胞 (10,000 rad の放射線照射後、10  $\mu$ M Nef138-10 でパルスをした自己の B-LCL)、 $5 \times 10^4$  cell/well feeder 細胞 (3,000 rad で放射線照射した健常人 PBMC) とともに 10% Lymphocult-T、2.5% PHA-sup (健常人 PBMC ( $3 \times 10^6$  /ml) を 0.2  $\mu$ g/ml PHA で 48 時間刺激した培養上清) 存在下で 3~4 週間培養した。

[実施例 10] 膜結合型 MHC class I / ペプチド複合体を形成する SeV 導入細胞の CTL による認識

CTL  $^{51}Cr$  放出アッセイを以下のようにして行った。ヒト CD4<sup>+</sup> T リンパ球株 H9 を 10% FCS、100 U/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリンを含む RPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) にて培養した。  $2 \times 10^3$  cell/well の標的細胞 (ヒト T 細胞株 H9) を 100  $\mu$  Ci  $Na_2CrO_4$  で 2 時間ラベルし、R10 にて 3 回洗った後、10  $\mu$ M のペプチドで 1 時間パルスした。SeV ベクター導入細胞を標的細胞とする場合は、ラベルの 17 時間前 (すなわち、エフェクター細胞を添加する 20 時間前) に図 6 に示す組み合わせで SeV ベクターの感染を m. o. i. = 10 : 2 で行った。各 E : T 比 (エフェクター細胞 : 標的細胞比) にしたがって実施例 9 の細胞をエフェクター細胞として加え 4 時間 37  $^{\circ}C$  でインキュベートし、その上清中の  $^{51}Cr$  を  $\gamma$  カウンターで測定した。自然放出 (Spontaneous release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに R10 を、最大放出 (Maximum release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに 4% Triton X-100 / PBS を入れた。

特異的リシス (Specific Lysis) (%) は [各サンプルの cpm - 自然放出 (Spontaneous release) の cpm] / [最大放出 (Maximum release) の cpm - 自然放出 (Spontaneous release) の cpm]  $\times 100$  で計算した。

膜結合型 MHC class I / ペプチド複合体の CTL による認識を調べた結果を図 6 に示した。A24full / SeVb と e / Nef138- $\beta$ 2m / SeVb を共導入した細胞において、抗原特異的 CTL 活性化を検出できることが判明した。

[実施例 11] SeV 導入細胞から回収したエプトープ結合  $\beta$ 2m の効果  
SeV 導入細胞で産生されたエプトープ結合  $\beta$ 2m を調製するため、e / Nef138- $\beta$ 2m / SeVb を H9 細胞に m. o. i. = 2 で導入し、3 日後に培養上清を回収し濾過してエプトープ結合  $\beta$ 2m を含む溶液を得た。A24full / SeVb を感染させた H9 を標的細胞として実施例 10 と同様の CTL アッセイを行い、ペプチドでのパルスと上記で得たエプトープ結合  $\beta$ 2m を含む溶液でのパルスを比較した。

エプトープ結合  $\beta$ 2m の効果を図 7 に示した。SeV 導入細胞から回収したエプトープ結合  $\beta$ 2m を標的細胞の培養液に添加することによって、抗原特異的 CTL 活性を検出でき

ることが判明した。

【実施例12】 MHC class I/ペプチド4量体によるエピトープ特異的CD8陽性T細胞の検出

HLA-A\*2402を持つHIV感染者および健常人の末梢血単核球(PBMC)  $1 \times 10^6$  に  $20 \mu\text{g/ml}$  のMHC class I/ペプチド4量体であるA24/Nef138-10テトラマー-RPE標識を加え、 $37^\circ\text{C}$  で15分反応させた。1回洗浄した後、抗CD8抗体-APC標識を加え $4^\circ\text{C}$  で20分反応させた。その後3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS (Phosphate-Buffered Saline) にて固定した。染色および洗浄には2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。結果を図8に示した。図はリンパ球分画  $1 \times 10^5$  をA24/Nef138-10テトラマーと抗CD8抗体で展開したもので、図中の数字はCD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の割合(%)を示している。

10

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、哺乳動物細胞においてエピトープ結合 $\beta 2\text{m}$ およびMHC class I/ペプチド複合体を効率的に発現させることが可能となった。得られるエピトープ結合 $\beta 2\text{m}$ およびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLの検出および定量のために、またエピトープ結合 $\beta 2\text{m}$ 精製蛋白質を用いた抗原特異的CTLへの抗原提示のために、さらにはインビボおよびエクシボにおけるベクター導入を介して、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために極めて有用である。本発明により得ることができるエピトープ結合 $\beta 2\text{m}$ およびMHC class I/ペプチド複合体は、自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに反応するCTLの検出および定量、並びにウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法に有用である。また本発明のベクターは、感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などにおける遺伝子治療用ベクターとして有用である。

20

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Virus vectors infectious to mammalian cells, which encode  
epitope-linked beta 2-microglobulin and their uses

10

<130> D3-A0101P

<140>

<141>

20

<150> JP 2001-301290

<151> 2001-09-28

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.0

30

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 2

ttttcttac tacgg

15

30

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

## synthesized sequence

&lt;400&gt; 3

cggccgcaga tcttcacg

18

10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 4

atgcatgccg gcagatga

18

30

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

10

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 6

tttgccggca tgcattgttc ccaaggggag agttttigcaa cc

42

30

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga

18

10

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

30

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 9

gggcggatcc ggactcagaa tctccccaga cgccgag

37

10

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 10

ccgcctcgag ctggggagga aacaggcag catgggaac

39

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 11

ggcacgagcc gagatgtctc gctccgiggc

30

10

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 12

aatttggaat tcatccaatc caaatgcggc

30

30

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 13

Gly Gly Gly Ser

1

10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

30

1

5

10

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 15

ggaggtggcg ggtccggagg tggttctggt ggaggttcca tccagcgtac tccaaagatt 60

10

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 16

tctggccctgg aggetagata tccactgacc ttgggatggt gcttcggagg aggtggcggg 60

30

tcc

63

<210> 17

<211> 63

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

10

<400> 17

·tctggcctgg aggctagata cctaagggat caacagctcc tagggattgg aggtggcggg 60

tcc

63

20

<210> 18

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 18

tgcggccgcc gtacggccga gatgtctcgc tccgiggcct tagctgtgct cgcgctactc 60

40

tctctttctg gcttggaggc t

81

<210> 19

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 19

tigcggccgc gatgaacitt caccctaaagt ttttcttact acggcgtacg ttacaigtct 60

20

cgatcccact t

71

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

40

<400> 20

tgcggccgcc gtacggccga gatgtctcgc tccgtggcct ta

42

<210> 21

<211> 80

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

20

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(80)

<400> 21

gcggccgccg tacggccgag atg tct cgc tcc gtg gcc tta gct gtg ctc gcg 53

30

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala

1

5

10

cta ctc tct ctt tct ggc ctg gag gct

80

Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala

15

20

40

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 22

10

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

Gly Leu Glu Ala

20

20

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(30)

<400> 23

aga tat cca ctg acc ttt gga tgg tgc ttc

30

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 24

20

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

<210> 25

<211> 33

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

40

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 25

aga tac cta agg gat caa cag etc cta ggg att

33

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

10

1

5

10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

1

5

10

30

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

10

<400> 27

gga ggt ggc ggg tcc gga ggt ggt tct ggt gga ggt tcg atc cag cgt 48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1 5 10 15

act cca aag att 60

20

Thr Pro Lys Ile

20

<210> 28

<211> 20

30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1 5 10 15

40

Thr Pro Lys Ile

<210> 29

<211> 69

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 29

aag tgg gat cga gac atg taacgtacgc cgtagtaaga aaaacttagg

48

30

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

gigaaagttc atcgcgccg c

69

40

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 30

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 31

30

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp

1

5

10

<210> 32

<211> 38

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 32

tgcggccgcc gtacgaggat ggccgcatg gcgccccg 38 10

<210> 33

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 33 30

gtcccgcagc tccaattca ttgcctcaaa gattccicca agggatcccc atctcaggt 60

gaggggctt 69

<210> 34 40

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

10

<400> 34

ctacggcgta cgtcaatggt ggtgatggig gtggtcccgc agtccat 48

<210> 35

20

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

30

<400> 35

ttggggccgc gatgaacttt caccctaagt ttiicttact acggcgtaag tca 53

40

<210> 36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

10

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(36)

<400> 36

20

gcggccgccc tagcagg atg gcc gtc atg gcg ccc c

36

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 37

30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 37

40

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 38

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(87)

20

<400> 38

aag ccc ctc acc ctg aga tgg gga tcc ctt gga gga atc ttt gag gca 48

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Gly Ser Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala

1 5 10 15

30

atg aag atg gag ctg cgg gac cac cac cat cac cac cat tgacgtacgc 97

Met Lys Met Glu Leu Arg Asp His His His His His His

20 25

cgtagtaaga aaaactiagg gtgaaagttc atcgcggccg c 138

40

<210> 39

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 39

10

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Gly Ser Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala

1

5

10

15

Met Lys Met Glu Leu Arg Asp His His His His His His

20

25

20

<210> 40

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 40

tgcggccgcc gtacgccgag gatggccgic atggcgcccc g

41

40

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 41

ttgcgccgc gatgaacttt caccctaagt tttcttaact acggcgtacg tcacacttia 60

20

caagctgtga g

71

<210> 42

<211> 38

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

40

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(38)

<400> 42

gcggccgcccg tacgccgagg atg gcc gtc atg gcg ccc

38

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

10

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<400> 43

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

30

<210> 44

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (18)

<400> 44

ctc aca gct tgt aaa gtg tgacgiacgc cgtagtaaga aaaacttagg 48 10

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

gtgaaagttc atcgggccg c 69

20

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45 30

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

【図面の簡単な説明】

図1は、エピトープ結合β2m (e/β2m) を発現するSeVベクター (e/β2m/SeVb) の構造を示す図である。

図2は、膜結合型および分泌型HLA A\*2402を発現するSeVベクターの構造を示す図である。分泌型分子には、ビオチン化基質ペプチド (Bir A基質ペプチド) が付加されている。 40

図3は、膜結合型HLA A\*2402を発現するSeVベクターの構造を示す図である。

図4は、エピトープ結合β2m発現SeVベクターおよび分泌型HLA A\*2402発現SeVベクターを重感染させた細胞から回収されたMHC class I/ペプチド複合体の検出を示す図である。A24-BSPHis/SeVbおよびe/β2m/SeVbを、それぞれm. o. i. = 10および2でCV-1細胞に重感染した。3日後に、培養上清100μlを回収し、MHC class I/ペプチド複合体をELISAで検出した。陰性コントロールとしてe/β2m/SeVbの代わりにβ2m/SeVbあ 50

るいはwt/SeV (外来遺伝子を持たない野生型SeV) を感染したものをを用いた。  
 図5は、分泌型MHC class I/ペプチド複合体の精製を示す図および写真である。  
 A24-BSPHis/SeVbおよびe/ $\beta$ 2m/SeVbを、それぞれm. o. i. = 10および2でCV-1細胞に重感染した。3日後に、培養上清100mlを回収し、抗Hisタグ抗体を用いたFPLCで分画した。各フラクションの一部をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットにより確認し蛋白質を定量した。約1mgの分泌型MHC class I/ペプチド複合体を回収した。

図6は、膜発現型MHC class I/ペプチド複合体の効果を示す図である。H9細胞 (ヒトT細胞株, HLA-A\*2402-) にA24full/SeVbおよびe/Nef138- $\beta$ 2m/SeVbをそれぞれm. o. i. = 10および2で感染した。陰性コントロールとしてe/Nef138- $\beta$ 2m/SeVbの代わりにwt/SeVを感染したものをを用いた。18時間後100 $\mu$ Ciの $Na_2^{51}CrO_4$ で2時間ラベルしNef138-10特異的CTLクローンを用いて $^{51}Cr$ 放出アッセイを行った。

図7は、分泌型エペトープ結合 $\beta$ 2mの効果を示す図である。H9細胞 (HLA-A\*2402-ヒトT細胞株) にe/Nef138- $\beta$ 2m/SeVbまたは対照群としてwt/SeVをm. o. i. = 2で重感染させ、3日後に培養上清を回収し0.22 $\mu$ mのフィルターを用いて濾過した。

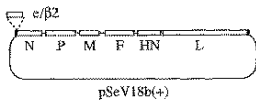
標的細胞としてH9細胞 (HLA-A\*2402-ヒトT細胞株) にA24full/SeVbおよびwt/SeVをそれぞれm. o. i. = 10および2で重感染した。SeV感染後、18時間経過した標的細胞を100 $\mu$ Ciの $Na_2^{51}CrO_4$ で2時間ラベルした。その後、上記のように調製したe/Nef138- $\beta$ 2mを含む培養上清、もしくは陽性コントロールとして10 $\mu$ M Nef138-10合成ペプチド、陰性コントロールとしてwt/SeV感染細胞培養上清をパルスした。1時間後、Nef138-10特異的CTLクローンを用いて $^{51}Cr$ 放出アッセイを行った。比較としてA24full/SeVbおよびe/Nef138- $\beta$ 2m/SeVbをそれぞれm. o. i. = 10および2で重感染したH9細胞も同様にアッセイした。

図8は、MHC class I/ペプチド4量体によるエペトープ特異的CD8陽性T細胞の検出を示す写真である。HLA-A\*2402を持つHIV感染者および健常人の末梢血単核球 (PBMC)  $1 \times 10^6$  に20 $\mu$ g/mlのMHC class I/ペプチド4量体であるA24/Nef138-10テトラマー-RPE標識を加え、37 $^{\circ}C$ で15分反応させた。1回洗浄した後、抗CD8抗体-APC標識を加え4 $^{\circ}C$ で20分反応させた。その後3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS (Phosphate-Buffered Saline) にて固定した。染色および洗浄には2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。図はリンパ球分画 $1 \times 10^5$  をA24/Nef138-10テトラマーと抗CD8抗体で展開したもので、図中の数字はCD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の割合 (%) を示している。

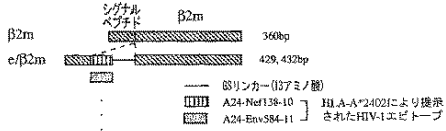
【図 1】

図 1

e/β 2m/SeVb ②作製



エピトープ結合β2ミクログロブリン (e/β2m)



```

< Nef1 -> <----- β2mシグナル ----->
GCGGCCCGCGTACGCGGAGATGCTCGCTCGCTCGTGGCCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCGCTGAGGCT
M R S V A L A V L A L L S L S G L R A

<----- HIV-A24Nef138-10 ----->
AGATAATCCACTGAACTTTGGATGGTCTTC GGA
R Y P L T T F G W C F G

<----- HIV-A24Env584-11 ----->
AGATACCTTAGGGGATCAACAGCTCTTAGGGATT
R Y L R D Q Q L L G I

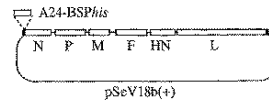
<----- リンカー ----->
GGAGGTGGCGGCTCCGAGGTGTTCTGCTGGTGGAGGTTCGATCCAGGCTACTCCAAAGATT
G G G G S G G G S G G G S I Q R T P K I

<----- β2m -----> <シグナル> <シグナル> < Nef1 ->
AAGTGGGATCGAGACGTGTAGCTACGCGGTAGTAAGAAAACCTTAGGGTGAAGTTCATCGCGGCCGC
K W D R D M *
    
```

【図 2】

図 2

A24-BSPhis/SeVb



MHCクラスII 重鎖



```

<A24-BSPhis/SeVb>
< Nef1 -> <----- A2402 ----->
GCGGCCCGCGTACGCGGAGATGCGCGTCAATGGCGCC
M A V M A P

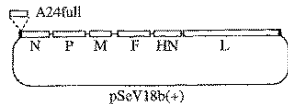
A2402 細胞外ドメイン <----- B2A 細胞ペプチド (BSP) ----->
AAGCCCTCACCCTTAGAGTGGGATCCCTTAGAGGAATCTTTGAGGCAATGAGATGGAGCTGCGGGAC
K P L T L R W G S L G C I F R A N K M R L R D

<----- (His)6 -----> <シグナル> <シグナル> < Nef1 ->
CACCACCTCACCACCACTGACCTAGCGCGTGTAGTAAGAAAACCTTAGGGTGAAGTTCATCGCGGCCGC
H H H H H *
    
```

【図 3】

図 3

A24 full/SeVb



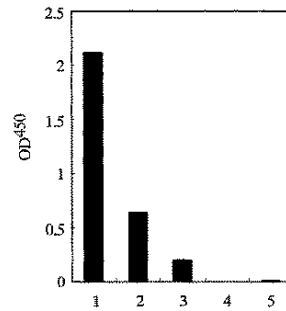
```

<A24full/SeVb>
< Nef1 -> <----- A2402 ----->
GCGGCCCGCGTACGCGGAGATGCGCGTCAATGGCGCC
M A V M A P

<----- A2402 -----> <シグナル> <シグナル> < Nef1 ->
CTCACAGCTTGTAAAGTGTGACCTAGCGCGTGTAGTAAGAAAACCTTAGGGTGAAGTTCATCGCGGCCGC
L T A C K V *
    
```

【図 4】

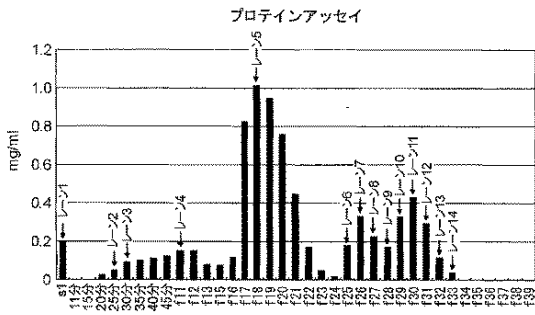
図 4



1. A24-BSPhis/SeVb + c/Nef138-β2m/SeVb
2. A24-BSPhis/SeVb + c/Env584-β2m/SeVb
3. A24-BSPhis/SeVb + β2m/SeVb
4. A24-BSPhis/SeVb
5. wt/SeV

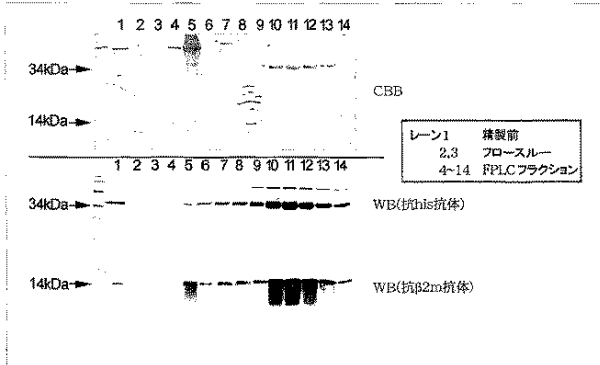
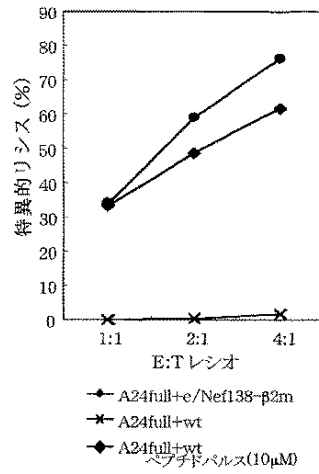
【図 5】

図 5



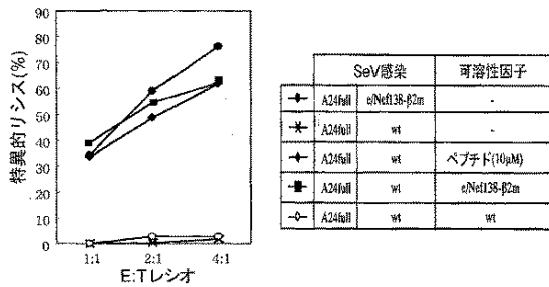
【図 6】

図 6



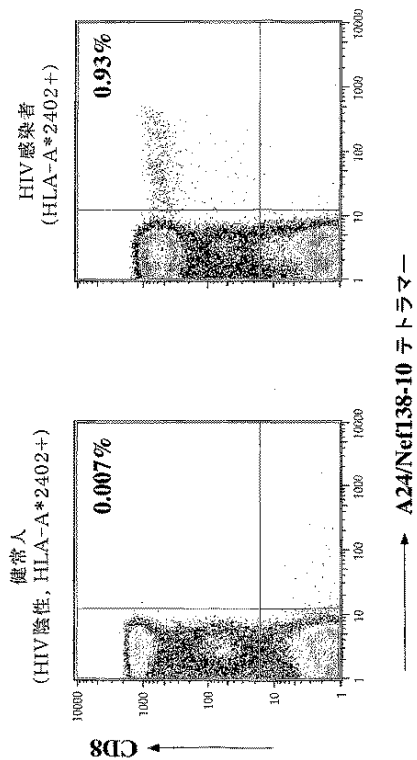
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/09697
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>1</sup> C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>1</sup> C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/Geneseg		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tafuro S. et al., "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules"	1,4,7,8-15, 19,21-31
Y	Eur. J. Immunol., 2001 Feb., Vol.31, No.2, pages 440 to 449, particularly, page 442, left column, Par. No. [0002]; Fig. 1B, and "Discussion"	2,3,5,6, 16-18,20
X	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 27 October, 1994 (27.10.94), Particularly, Claims 8 and example 8	19,21-31, 1-18,20
Y	& AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 November, 2002 (13.11.02)		Date of mailing of the international search report 26 November, 2002 (26.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/09697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Uger, R.A. et al., "Covalent linkage to beta 2-microglobulin enhances the MHC stability and antigenicity of suboptimal CTL epitopes", <i>J. Immunol.</i> , 1999, Vol.162, No.10, pages 6024 to 6028, Figs. 2 to 4	19,21-31 1-18,20
X	Uger, R.A. & Barber, B.H., "Creating CTL targets with epitope-linked beta 2-microglobulin constructs", <i>J. Immunol.</i> , 1998, Vol.160, No.4, pages 1598 to 1605, Figs. 1, 3	19,21-31 1-18,20
X	White, J., et al., "Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma" <i>J. Immunol.</i> , 1999, Vol.162, No.5, pages 2671 to 2676, Fig. 1	19,21-31 1-18,20
X	Toshitani, K., et al., "Expression of a single-chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processed antigen cytotoxic T lymphocytes", <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1996, Vol.93, No.1, pages 236 to 240, "Materials and Methods"	19,21-31 1-18,20
Y	Kato, A., et al., "The paramyxovirus, Sendai Virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis", <i>EMBO J.</i> , 1997, Vol.16, No.3, pages 578 to 587, "Discussion"	1-31
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 15 March, 2001 (15.03.01), Claims; abstract & AU 2000068720 A & EP 1211310 A1 & KR 2002013565 A	1-31
Y	Ramani, K., et al., "Site-specific gene-delivery in vivo through engineered Sendai viral envelopes" <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1998, Vol.95, pages 11886 to 11890, abstract	1-31
Y	WO 01/57204 A1 (KANEDA, Yasufumi), 09 August, 2001 (09.08.01), Abstract & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-31
Y	WO 01/24810 A1 (EPIMMUNE INC.), 12 April, 2001 (12.04.01), pages 186, 362, 192, 364 & AU 2001075001 A	6

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JP02/09697
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小額資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00			
最小額資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/Geneseq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇頁が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Tafuro S. et al.: "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules" Eur. J. Immunol., 2001 Feb., Vol. 31, No. 2, pp. 440-449, 特にp. 442左欄第2段落, Fig. 1B及びC"Discussion"参照	1, 4, 7, 8-15, 19, 21-31	
-			
Y		2, 3, 5, 6, 16-18, 20	
X	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 1994. 10. 27, 特に請求項6及び実施例B参照	19, 21-31	
-			
Y	& AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	1-18, 20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に拠る発明を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、商業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日	13. 11. 02	国際調査報告の発送日	26.11.02
国際調査機関の名称及びひいては日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4B	9639
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/09697
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Uger, R.A., et al: "Covalent linkage to beta 2-microglobulin enhances the MHC stability and antigenicity of suboptimal CTL epitopes" J. Immunol., 1999, Vol.162, No.10, pp.6024-6028, Fig.2-4参照	19,21-31 -
Y		1-18,20
X	Uger, R.A. & Barber, B.H.: "Creating CTL targets with epitope-linked beta 2-microglobulin constructs" J. Immunol., 1998, Vol.160, No.4, pp.1598-1605, Fig.1,3参照	19,21-31 -
Y		1-18,20
X	White, J., et al.: "Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma" J. Immunol., 1999, Vol.162, No.5, pp.2671-2676, Fig.1参照	19,21-31 -
Y		1-18,20
X	Toshitani, K., et al.: "Expression of a single-chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processed antigen to cytotoxic T lymphocytes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol.93, No.1, pp.236-240, "Materials and Methods"参照	19,21-31 -
Y		1-18,20
Y	Kato, A., et al.: "The paramyxovirus, Sendai Virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis" EMBO J., 1997, Vol.16, No.3, pp.578-587, "Discussion"参照	1-31
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 2001.03.15, 請求の範囲, 要約参照 & AU 2000068720 A & EP 1211318 A1 & KR 2002013565 A	1-31
Y	Ramani, K., et al.: "Site-specific gene-delivery <i>in vivo</i> through engineered Sendai viral envelopes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol.95, pp.11886-11890, 要約参照	1-31
Y	WO 01/57204 A1 (Kaneda, Yasufumi), 2001.08.09, 要約参照 & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-31
Y	WO 01/24810 A1 (EPIMMUNE INC.), 2001.04.12, pp.186, 362, 192, 364 参照 & AU 2001075001 A	6

## フロントページの続き

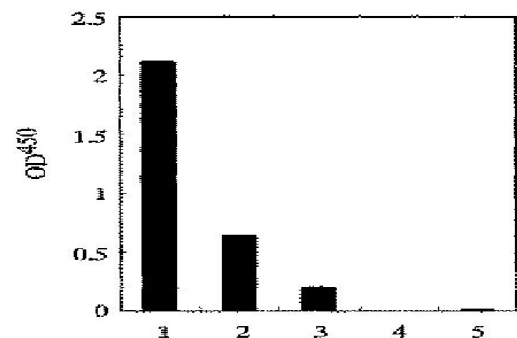
(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 37/04	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 19/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 K 37/04	
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	编码表位结合 $\beta$ 2m的哺乳动物细胞感染性病毒载体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2003029475A1</a>	公开(公告)日	2005-01-20
申请号	JP2003532688	申请日	2002-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社载体研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社ダイナベック研究所		
[标]发明人	岩本 愛吉 立川 愛		
发明人	岩本 愛吉 立川 愛		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/00 A61K39/385 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/16 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/86 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/385 A61K2039/5156 A61K2039/605 C12N15/86 C12N2740/16122 C12N2740/16322 C12N2770/36143 C12N2800/30 C12N2810/855		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/12 A61K35/76 A61K39/00.H A61P31/18 A61P35/00 A61P37/04 C07K19/00 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.Y C12N5/00.B A61K37/04 A61K37/02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001301290 2001-09-28 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

我们已经构建了编码表位结合的 $\beta$ 2m的哺乳动物细胞传染性病毒载体，并成功地在哺乳动物细胞中大量表达了表位结合的 $\beta$ 2m。本发明提供了编码结合表位的 $\beta$ 2微球蛋白 ( $\beta$ 2m) 的哺乳动物细胞感染性病毒载体及其用途。本发明还提供了使用该载体生产MHC I类/肽复合物的方法。特别地，四聚化的I类MHC /肽复合物可用于检测表位特异性CD8阳性T细胞。本发明还提供了已将载体引入其中的细胞。还提供了已经添加了由本发明的载体产生的与表位结合的 $\beta$ 2m的靶细胞。这些细胞被抗原特异性细胞毒性T细胞 (CTL) 识别。本发明的载体和通过表达该载体获得的多肽可用于感染性疾病和癌症的免疫疗法，以及用于检测和定量抗原特异性CTL。



1. A24-BSP $\beta$ His/SeVb + c/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb
2. A24-BSP $\beta$ His/SeVb + e/Env584- $\beta$ 2m/SeVb
3. A24-BSP $\beta$ His/SeVb +  $\beta$ 2m/SeVb
4. A24-BSP $\beta$ His/SeVb
5. wt/SeV