

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 223765

(P2002 - 223765A)

(43)公開日 平成14年8月13日(2002.8.13)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 37/02		C 0 7 K 14/82	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/82		16/32	4 B 0 6 4
16/32		19/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 42 O L (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 23526(P2001 - 23526)

(22)出願日 平成13年1月31日(2001.1.31)

(71)出願人 899000079

学校法人 慶應義塾

東京都港区三田2丁目15番45号

(71)出願人 300008988

アメリカ合衆国

アメリカ合衆国 メリーランド 20852 - 3

804, ロックビル, エグゼキューティブ ブー

ルバード 6011, スイート 325, オフィス

オブ テクノロジー トランスファー, ナ

ショナル インスティテューツ オブ ヘ

ルス

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト悪性黒色腫抗原

(57)【要約】

【課題】 癌の診断・治療に応用することができる悪性黒色腫抗原や、それをコードする遺伝子等を提供すること。

【解決手段】 悪性黒色腫細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをHLA-A1 cDNAと共にCOS7細胞に導入し、このCOS7細胞とHLA-A1拘束性T細胞とを共培養することにより接触させ、かかるT細胞から放出されるインターフェロン量をELISA法により測定することにより、新規なヒト悪性黒色腫抗原MART-2を単離し、そのT細胞エピトープ(FLEGNEVGKTY)を同定した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

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

【請求項2】 配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項5】 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質。

【請求項6】 請求項4又は5記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。

【請求項7】 ペプチドが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項6記載のペプチド。

【請求項8】 請求項4若しくは5記載のタンパク質又は請求項6若しくは7記載のペプチドと、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド。

【請求項9】 請求項4～8のいずれか記載のタンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項10】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項9記載の抗体。

【請求項11】 請求項9又は10記載の抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチド。

【請求項12】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項13】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

【請求項14】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドを過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項15】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項14又は15記載の非ヒト動物。

【請求項16】 被検物質と、請求項4～8のいずれ

か、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドと、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項17】 被検物質と、請求項12記載の宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項18】 HLAを発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターを共にトランスフェクトした宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項19】 被検ポリペプチドを発現するベクターをトランスフェクトしたHLA発現能を有する宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項20】 HLAがHLA-A1であることを特徴とする請求項18又は19記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項13～15のいずれか記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物のT細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項22】 免疫誘導活性の測定・評価が、T細胞におけるインターフェロン 活性の測定・評価であることを特徴とする請求項16～21のいずれか記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項23】 T細胞がHLA-A1拘束性T細胞であることを特徴とする請求項16～22のいずれか記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項24】 請求項16～23のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性促進物質。

【請求項25】 請求項16～23のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性抑制物質。

【請求項26】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項24記載の免疫誘導活性促進物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項27】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項25記載の免疫誘導活性促進物質とのインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞。

【請求項28】 HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドを用いることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項29】 HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を用いることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項30】 HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を細胞表面又は担体表面に形成させることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項31】 担体が蛍光微粒子であることを特徴とする請求項30記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項32】 HLA分子がHLAクラスIであることを特徴とする請求項28～31のいずれか記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項33】 HLAクラスIがHLA-A1であることを特徴とする請求項32記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法。

【請求項34】 HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドを含有することを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項35】 HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を含むことを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項36】 さらに担体を含むことを特徴とする請求項34又は35記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項37】 担体が蛍光微粒子であることを特徴とする請求項36記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項38】 HLA分子がHLAクラスIであることを特徴とする請求項34～37のいずれか記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項39】 HLAクラスIがHLA-A1であることを特徴とする請求項38記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬。

【請求項40】 請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ。

【請求項41】 請求項40記載の癌の診断用プローブ及び/又は請求項10若しくは11記載の抗体を含有することを特徴とする癌の診断薬。

【請求項42】 癌の診断薬が、悪性黒色腫、食道癌、膀胱癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎臓癌、肝癌、白血病、パーキットリンパ腫から選ばれた1又は2以上の癌の診断薬であることを特徴とする請求項41記載の癌の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、悪性黒色腫を含む各種癌の診断や免疫療法などに有用な新規なヒト悪性黒

色腫抗原、より詳しくは、腫瘍浸潤リンパ球から樹立したT細胞、例えばHLA-A1拘束性かつ悪性黒色腫反応性T細胞が認識する共通抗原及び該抗原をコードするDNA並びにそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】悪性黒色腫は、インターロイキン2などを用いた免疫療法が比較的有効な癌である(JAMA 271, 907, 1994)が、生体内における抗腫瘍効果には、腫瘍細胞に反応する細胞傷害性T細胞(CTL)が重要であることが示されている(Microbiol. Immunol. 42, 803 1998)。免疫療法後、腫瘍反応性T細胞が活性化され、T細胞上のT細胞受容体(T cell receptor: TCR)が、HLA(ヒト白血球抗原)分子によって腫瘍細胞表面に提示される腫瘍細胞タンパク質が分解されてできたペプチド(腫瘍抗原)を認識し、腫瘍細胞を傷害する。更に各種サイトカインを分泌し、マクロファージ等の他の免疫細胞をも誘導活性化し、生体内で腫瘍拒絶を起こすと考えられる。腫瘍反応性T細胞には自己腫瘍細胞のみならず、HLAを共有する他の患者からの腫瘍細胞にも反応するような共通腫瘍抗原を認識する場合と、自己腫瘍細胞しか反応しない固有抗原を認識する場合がある。

【0003】

ヒト腫瘍細胞に対する免疫応答機構を解明して、新しい免疫療法を開発するためには、これらの腫瘍反応性T細胞が認識する腫瘍抗原を同定することが重要である。腫瘍反応性T細胞が樹立されている場合には、その反応性を利用した機能的cDNA発現クローニング法を用い、悪性黒色腫抗原の単離が可能である。例えば、転移メラノーマ患者からの腫瘍反応性細胞傷害性T細胞と、HLA-A2を発現する腫瘍細胞株とを用いて、メラノーマ又は転移メラノーマに罹っている哺乳類を予防、診断及び治療に用いることができるヒト悪性黒色腫抗原MART-1を単離することが特表平10-505481号公報に開示されている。現在までに代表的なものとして、上記MART-1やgp100のような色素細胞(メラノサイト)組織特異的タンパク質、各種腫瘍と正常では精巢に発現が認められるMAGE、BAGE、GAGE及びNY-ESO-I等のCancer-Testis抗原(CT抗原)、腫瘍細胞の遺伝子異常により産生されるカテニン、CDK4(cyclin dependent kinase 4)、p15、GnT-V等の変異ペプチド抗原が単離されている(Immunol Res 16, 313, 1997)。米国の国立癌研究所では、メラノサイト特異的抗原MART-1とgp100を用いた各種免疫・遺伝子治療の第一相臨床試験が行われ、一部の患者では腫瘍退縮が認められている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌

を治療できないのが現状である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。特に、免疫療法を開発する上での問題点として、

(1) 抗原を提示するHLAには多様性がある、(2) 組織特異的抗原やCT抗原は、共通抗原として、多くの患者の治療に使いやすいが、腫瘍細胞にとって必須な分子ではないために、抗原消失が起こりやすい、(3) 腫瘍特異的変異ペプチド抗原は、腫瘍特異的で腫瘍拒絶能が強い可能性があるが、個々の患者毎にカスタムメイド治療が必要となり、現在では多くの患者を治療することは難しい、などが挙げられ、今後、より腫瘍拒絶作用の強い抗原の単離と、抗原の特性の解析が必要であるとされている。本発明の課題は、癌の診断・治療に応用することができる悪性黒色腫抗原や、それをコードする遺伝子等を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、悪性黒色腫細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをHLA-A1cDNAと共にCOS7細胞に導入し、このCOS7細胞とHLA-A1拘束性T細胞(TIL1362)とを共培養することにより接触させ、TIL1362から放出されるインターフェロン(IFN-)量をELISA法により測定することにより、新規なヒト悪性黒色腫抗原を見出し、そのT細胞エピトープを同定し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質(請求項1)や、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA(請求項2)や、請求項2記載のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項3)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(請求項4)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質(請求項5)や、請求項4又は5記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド(請求項6)や、ペプチドが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項6記載のペプチド(請求項7)に関する。

【0007】また本発明は、請求項4若しくは5記載のタンパク質又は請求項6若しくは7記載のペプチドと、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド(請求項8)や、

請求項4~8のいずれか記載のタンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体(請求項9)や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項9記載の抗体(請求項10)や、請求項9又は10記載の抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチド(請求項11)や、請求項4~8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞(請求項12)や、請求項4~8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物(請求項13)や、請求項4~8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドを過剰発現することを特徴とする非ヒト動物(請求項14)や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項14又は15記載の非ヒト動物(請求項15)に関する。

【0008】また本発明は、被検物質と、請求項4~8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドと、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項16)や、被検物質と、請求項12記載の宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項17)や、HLAを発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターを共にトランスフェクトした宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項18)や、被検ポリペプチドを発現するベクターをトランスフェクトしたHLA発現能を有する宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項19)や、HLAがHLA-A1であることを特徴とする請求項18又は19記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項20)や、請求項13~15のいずれか記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物のT細胞における免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項21)や、免疫誘導活性の測定・評価が、T細胞におけるインターフェロン活性の測定・評価であることを特徴とする請求項16~21のいずれか記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項22)や、T細胞がHLA-A1拘束性T細胞であることを特徴とする請求項16~22のいずれか記載の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法(請求項23)や、請求項16~23のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性促進物質(請求項24)や、請求項1

6～23のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性抑制物質（請求項25）や、請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項24記載の免疫誘導活性促進物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤（請求項26）や、請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項25記載の免疫誘導活性促進物質とのインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞（請求項27）に関する。

【0009】また本発明は、HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドを用いることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項28）や、HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を用いることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項29）や、HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を細胞表面又は担体表面に形成させることを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項30）や、担体が蛍光微粒子であることを特徴とする請求項30記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項31）や、HLA分子がHLAクラスIであることを特徴とする請求項28～31のいずれか記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項32）や、HLAクラスIがHLA-A1であることを特徴とする請求項32記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出方法（請求項33）や、HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドを含有することを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項34）や、HLA分子と請求項6又は7記載のペプチドの複合体を含むことを特徴とする活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項35）や、さらに担体を含むことを特徴とする請求項34又は35記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項36）や、担体が蛍光微粒子であることを特徴とする請求項36記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項37）や、HLA分子がHLAクラスIであることを特徴とする請求項34～37のいずれか記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項38）や、HLAクラスIがHLA-A1であることを特徴とする請求項38記載の活性化T細胞又はその前駆細胞の検出試薬（請求項39）に関する。

【0010】さらに本発明は、請求項4～8のいずれか、若しくは請求項11記載のタンパク質又はペプチドをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ（請求項40）や、請求項40記載の癌の診断用プローブ及び/又は請求項10若しくは11記載の抗体を含有することを特徴とする癌の診断薬（請求項41）や、癌の診断薬が、悪性黒色腫、食道癌、膀胱癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎臓癌、肝癌、白血病、パーキットリンパ腫から選ばれた1又は2以上の癌の診断薬であることを

特徴とする請求項41記載の癌の診断薬（請求項42）に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の対象となるタンパク質としては、配列表の配列番号2に示される悪性黒色腫由来の悪性黒色腫抗原MART-2や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質を例示することができ、ここで免疫誘導活性とは、抗体産生、細胞性免疫、免疫寛容等の免疫反応を誘導する活性をいい、かかる免疫誘導活性の中でも、末梢血の細胞障害性T細胞（CTL）前駆細胞の頻度を上昇させるT細胞誘導活性を有するものが特に好ましい。

【0012】また、本発明の対象となるペプチドとしては、上記タンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドであれば特に制限されるものではないが、抗体の認識部位や、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞の認識部位を構成するペプチドが好ましく、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる悪性黒色腫由来の悪性黒色腫抗原エピトープ（FLEGVGKTY）を具体的に挙げるができる。上記本発明の対象となるタンパク質及びペプチド、並びにこれらタンパク質及びペプチドに特異的に結合する抗体が特異的に結合する組換えタンパク質及びペプチドを総称して、以下「本件悪性黒色腫抗原」ということがある。なお、本件悪性黒色腫抗原の由来はヒトに限定されるものではない。

【0013】本発明の対象となるDNAとしては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質MART-2をコードするDNA、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNA、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部を含むDNAを例示することができ、特に配列番号1に示される塩基配列の一部からなるDNAとして、配列番号3に示される塩基配列からなるDNAを好適に例示することができる。かかる悪性黒色腫抗原MART-2をコードするcDNAの調製方法としては特に制限されるものではないが、例えば、MART-2をコードするcDNAは、悪性黒色腫細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをHLA-A1cDNAと共にCOS7細胞に導入し、このCOS7細胞とHLA-A1拘束性T細胞（TIL1362）とを共培養することにより接触させ、TIL1362から放出されるインターフェロン（IFN）量をELISA法により測定することによりスクリーニングすることができる。

【0014】また、配列番号1に示される塩基配列又は

その相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種悪性黒色腫由来のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、悪性黒色腫抗原MART-2と同効な目的とする免疫誘導活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。こうして得られるDNAも本発明の範囲内である。かかる本発明のDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42 でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42 での洗浄処理を挙げることができ、65 でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65 での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0015】本発明の融合タンパク質や融合ペプチドとしては、本件悪性黒色腫抗原とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質や融合ペプチドは、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した悪性黒色腫抗原MART-2等の精製や、T細胞誘導活性を有するタンパク質の検出や、悪性黒色腫抗原MART-2等に対する抗体の定量、悪性黒色腫の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0016】本発明の前記タンパク質やペプチドに特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記悪性黒色腫抗原MART-2等のタンパク質又はその一部を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点で好ましく、特にMART-2エピトープ(FLEGNVGTKTY)あるいは該エピトープとHLAとの複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体がより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、例えば、悪性黒色腫等の診断、ミサイル療法等の治療ばかりでなく、悪性黒色腫等の悪性腫瘍の発症機構を明らか

にする上で有用である。

【0017】また、本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物(好ましくはヒト以外)に本件悪性黒色腫抗原、特にエピトープ(FLEGNVGTKTY)を含む断片、又は本件悪性黒色腫抗原、特にエピトープ(FLEGNVGTKTY)とHLAとの複合体を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養体により産生される抗体をもたらず、ハイブリドーマ法(Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Immunology Today 4, 72, 1983)及びEBV-ハイブリドーマ法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985)など任意の方法を用いることができる。

【0018】本発明の上記本件悪性黒色腫抗原に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その本件悪性黒色腫抗原を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本件悪性黒色腫抗原やその抗原エピトープを含むペプチドに対する抗体は、悪性黒色腫等の診断や治療に使用できる可能性がある。そして、これら抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチドも、前記のように本発明の本件悪性黒色腫抗原に包含される。

【0019】本発明はまた、上記本件悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や本件悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなるHLA-A1等のHLA発現能を有する宿主細胞に関する。かかる本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及びSambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistocintroduction)、感染等により行うことができる。

【0020】そして、上記宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3

細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK 21細胞、HEK 293細胞、Bows 悪性黒色腫細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。また、上記HLA発現能を有する宿主細胞としては、元来HLA発現能を有する細胞の他、元来HLA発現能を有さない細胞にHLA cDNAをトランスフェクションした細胞を挙げることができる。例えば、HLA-A1発現能を有する宿主細胞としては、1362mel、SKmel23、397mel、888EBV-B、1088EBV-B、1359EBV-B、HLA-A1陽性B細胞等の元来HLA-A1発現能を有する細胞の他、COS7細胞、624mel、526mel、501Amel、A375、583EBV-B等の元来HLA-A1発現能を有さない細胞にHLA-A1cDNAをトランスフェクションした細胞を挙げることができる。

【0021】また、発現系としては、上記本件悪性黒色腫抗原を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0022】上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる本件悪性黒色腫抗原は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997)らの方法などを用いることができ、また、かかる本件悪性黒色腫抗原を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、本件悪性黒色腫抗原に対する抗体を結合させたカラムや、上記本件悪性黒色腫抗原に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、本件悪性黒色腫抗原を得ることができる。

【0023】本発明において、上記本件悪性黒色腫抗原

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

【0024】ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、本件悪性黒色腫抗原欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、本件悪性黒色腫抗原のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとりて以下説明する。

【0025】例えば、本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち本件悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子スクリーニングし、スクリーニングされた本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲティングベクターを作製する。

【0026】この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクション

し、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の本件悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスを作製することができる。また、本件悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0027】本件悪性黒色腫抗原のトランスジェニックマウスは、本件悪性黒色腫抗原をコードするcDNAにチキン - アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビット - グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0028】また、上記本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子若しくはDNA、本件悪性黒色腫抗原、本件悪性黒色腫抗原とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド又は融合タンパク質、本件悪性黒色腫抗原に対する抗体、本件悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞等は、以下に具体的に説明するように、悪性黒色腫、食道癌、膀胱癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎臓癌、肝癌、白血病、パーキットリンパ腫等の治療や診断に有用であり、免疫誘導活性の促進又は抑制物質のスクリーニングや、活性化T細胞又はその前駆細胞の検出などに用いることができるばかりでなく、活性化T細胞(CD4抗原陽性T細胞、CD8抗原陽性T細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、サブレッサーT細胞等の全てのT細胞を含む)の誘導等免疫応答のメカニズムの解明にも使用することができる。

【0029】本発明の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、被検物質と本件悪性黒色腫抗原とHLA-A1拘束性T細胞等のT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検物質と本件悪性黒色腫抗原を発現している細胞膜又は細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、HLA-A1等のH

LAを発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターを共にトランスフェクトした宿主細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検ポリペプチドを発現するベクターをトランスフェクトしたHLA-A1等のHLA発現能を有する宿主細胞とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、前記ノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物のT細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法等を挙げることができる。上記細胞膜又は細胞としては、前記本件悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、本発明の本件悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができ、かかる細胞膜又は細胞と被検物質との接触方法としては、被検物質の存在下に本件悪性黒色腫抗原を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、次いでT細胞と接触させる方法等を挙げることができる。

【0030】上記被検物質とT細胞とを用いたスクリーニング方法について、以下に具体的に例を挙げて説明するが、本発明のスクリーニング方法はこれらに限定されるものではない。上記被検物質と本件悪性黒色腫抗原とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、例えば、HLA-A1拘束性T細胞の存在下に被検物質と本件悪性黒色腫抗原とを接触せしめ、CTLなどのT細胞の誘導活性の増減を測定し、被検物質が非存在下の対照の場合と比較・評価する方法を具体的に例示することができる。また、上記HLA-A1等のHLAを発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターを共にトランスフェクトした宿主細胞と、T細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、HLA-A1を発現するベクターと被検ポリペプチドを発現するベクターをコトランスフェクトした宿主細胞とHLA-A1拘束性T細胞とを一定時間共培養した後、HLA-A1拘束性に細胞膜表面に発現された本件悪性黒色腫抗原が減少又は増加したことを、HLA-A1拘束性T細胞から培地中に放出されたIFN量を指標として評価する方法を具体的に例示することができる。

【0031】本発明のスクリーニングに用いられる上記HLA-A1拘束性T細胞等のT細胞は、悪性黒色腫患者の癌組織から分離した悪性黒色腫組織浸潤リンパ球を、インビトロで高濃度のインターロイキン2存在下で30~70日間培養・増殖することによって、あるいは、悪性黒色腫患者の癌組織から分離した悪性黒色腫組織浸潤リンパ球又は悪性黒色腫患者の末梢血単核球を、MART-2若しくはMART-2の一部からなるペプチド、又はMART-2cDNAを導入しMART-2

若しくはMART-2の一部からなるペプチドの発現能を有する抗原提示細胞で刺激することにより、当業者であれば容易に、腫瘍反応性のT細胞等として樹立することができる。

【0032】また本発明は、上記スクリーニング方法により得られる免疫誘導活性の促進を必要としている患者の治療等に用いられる免疫誘導活性促進物質や、免疫誘導活性の抑制を必要としている患者の治療等に用いられる免疫誘導活性抑制物質に関する。本発明はまた、本件悪性黒色腫抗原を有効成分として含有する悪性黒色腫、食道癌、膀胱癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎臓癌、肝癌、白血病、パーキットリンパ腫等に対する抗腫瘍剤に関する。例えば、本件悪性黒色腫抗原を経口、静脈、皮内、皮下注射等により投与すると、インビボにおけるT細胞誘導活性が増大することによる抗腫瘍効果が期待できる。また上記抗体はミサイル療法に用いることができる。本発明はまた、本件悪性黒色腫抗原とのインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞に関する。例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球にIL-2とともに本件悪性黒色腫抗原で刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。また本件悪性黒色腫抗原を強力な抗原提示細胞である樹状細胞にインビボあるいはインビトロで発現させて、その抗原発現樹状細胞投与により免疫誘導を行うことができる。

【0033】本発明の細胞傷害性T細胞（活性化T細胞）又はその前駆細胞の検出方法としては、HLA分子と本発明のペプチドを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、HLAクラスI分子等のHLA分子と本発明のペプチドの複合体を用いる方法や、HLAクラスI分子等のHLA分子と本件ペプチドの複合体を細胞表面又は蛍光微粒子等の担体表面に形成させる方法を例示することができ、例えば、文献（Science, 274, 94-96, 1996）に記載されている方法に準じて、HLAクラスI分子と本発明のペプチドの複合体を蛍光微粒子表面に形成させ、これに癌患者末梢血由来のTリンパ球細胞を接触・結合させた後、蛍光微粒子表面に形成されたHLA-ペプチド複合体に結合したT細胞を検出する方法を挙げることができる。また、本発明の細胞傷害性T細胞（活性化T細胞）又はその前駆細胞の検出試薬としては、HLA分子と本発明のペプチドを含む試薬であれば特に制限されるものではなく、HLAクラスI分子等のHLA分子と本発明のペプチドの複合体を含む試薬や、HLAクラスI分子等のHLA分子と本発明のペプチドの複合体と、蛍光微粒子等の担体を含む試薬を例示することができる。

【0034】さらに本発明は、本件悪性黒色腫抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブや、この癌の診断用プローブや本件悪性黒色腫抗原に特異的に結合する抗体を

含有する悪性黒色腫、食道癌、膀胱癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎臓癌、肝癌、白血病、パーキットリンパ腫等の癌の診断薬に関する。上記診断用プローブとしては、本件悪性黒色腫抗原をコードするDNA（cDNA）又はRNA（cRNA）のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものが好ましく、例えば、上記アンチセンス鎖を用いて検体から得られた本件悪性黒色腫抗原のmRNAを検出することにより、悪性黒色腫等の癌の診断が可能となる。かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。

【0035】

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

実施例A [材料と方法]

A-1 (細胞株と組織)

ヒト悪性黒色腫細胞株（SKmel23、888mel1、1362mel1、A375、624mel1、926mel1、586mel1、526mel1、397mel1、501Amel1、1363mel1）、ヒトグリオーマ細胞株（U87-MO、T98G）、肺癌細胞株（K1S、LU99、LK2、EBC1、SBC2、RERF-LCMA）、食道癌細胞株（TE8、TE10）、膀胱癌細胞株（KU7、BC47）、腎臓癌細胞株（RCC6、RCC7、RCC8）、前立腺癌細胞株（JCA1、PC3）、乳癌細胞株（MDA231、HS578）、肝癌細胞株（HepG2）、白血病細胞株（HL60、K562、Molt4、）、パーキットリンパ腫細胞株（Daudi）を、それぞれペニシリン（100IU/ml）及びストレプトマイシン（100µg/ml）を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640で培養した。膵癌細胞株（PK1、PK59）をそれぞれペニシリン/ストレプトマイシン（1%）、L-グルタミン（1%）、HEPES（10mM）、EGF（6µg/l）、インシュリン（150U/l）、ヒドロコルチゾン（0.5mg/l）、トランスフェリン（10mg/l）を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640で培養した。EBウイルス感染B細胞（1088EBV-B、888EBV-B、1359EBV-B、583EBV-B）をペニシリン（100IU/ml）及びストレプトマイシン（100µg/ml）を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640で培養した。ヒト腎細胞株（293UT）とサル腎細胞株（COS-7）は7.5%のウシ胎児血清を含

むDMEM培地で培養した。正常組織(脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、筋肉、胎盤、胃、精巣)のRNAはInvitrogen Corporation, Carlsbad, CAから購入した。

【0036】A-2(腫瘍反応性細胞傷害性T細胞の樹立)

43歳の女性患者の右脇腹に転移した悪性黒色腫組織浸潤リンパ球を単離し、文献(J. Exp. Med. 168, 2183, 1988)記載のように、単離した悪性黒色腫組織浸潤リンパ球をin vitroで高濃度(6000 IU/ml)のインターロイキン2(Cetus-Oncology Division, Chiron Corp. Emeryville, CA)存在下で30日間培養することによって増殖させ、腫瘍反応性細胞傷害性T細胞(TIL1362)を樹立した。

【0037】A-3(HLA拘束性の決定と既知抗原の認識の検討)

文献(Kawakami, Y., et al: Cloning of the Gene Coding for a Shared Human Melanoma Antigen Recognized by Autologous T cells Infiltrating into Tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3515-3519, 1994.)記載の方法と同様に、各種HLAを発現する悪性黒色腫細胞株(1362mel, SKmel23, 397mel, HLA-A1cDNAを導入した526melA1)、HLAを発現しない悪性黒色腫細胞株(624mel, 526mel)、HLA-A1cDNAを導入していないCOS7細胞各 5×10^4 個とTIL1362細胞 5×10^4 個とを20時間共に培養した後、培養上清を回収し、TIL1362から放出されたIFNをELISA法により測定することによってHLA拘束性を決定した。また、リポフェクタミン(lipofectamine)試薬(BRL, Gaithersburg, MD)を用いて、既知悪性黒色腫抗原遺伝子cDNA100ng及び/又はHLA-A1cDNA50ngをCOS7細胞(5×10^4 個)に導入し、TIL1362による既知抗原の認識の有無を検討した。

【0038】A-4(cDNAライブラリーの作製)

自己腫瘍細胞株1362melからグアニジン-塩化セシウム法を用いて全RNAを抽出した後、oligo dTカラムを使用しpoly A+ RNAを精製した。制限酵素HindIII配列を持ったランダムプライマー(Novagen社製)、逆転写酵素(Novagen社製)、T4 DNA合成酵素(Novagen社製)により、平滑末端を有する二本鎖cDNAを合成した後、EcoRIリンカー(Novagen, Madison, WI)を付加した。このDNAを制限酵素EcoRI(5'端)とHindIII(3'端)で切断し、真核細胞発現プラスミドベクターVR1012(Chiron/Viagene, San Diego, CAから贈与; Journal of Immunology 161, 6985, 1998)に挿入し、単一方向cDNAライブラリーを構築した。

【0039】A-5(細胞傷害性T細胞による腫瘍抗原

cDNAのスクリーニング)

上記A-4で得られたcDNAを組み込んだプラスミド約100クローンのバクテリアを1プールとし、一晚培養して増幅した後、Wizard 9600 DNA抽出システム(Pro-mega, Madison, WI)を用いて、プラスミドDNAを抽出した。1プールあたり100~200ngのcDNAを、100ngのHLA-A1cDNAと共に、リポフェクタミン試薬(BRL, Gaithersburg, MD)を用いて96マイクロウェルプレート上でCOS7細胞(5×10^4 個)に導入し、7.5%のウシ胎児血清を含むDMEM培地(SIGMA, St. Louis, MO)を用いて37°Cで培養した。翌日、培養上清を新鮮な上記培地で交換した後、TIL1362細胞(5×10^4 個)を加えて20時間培養した。その後培養上清を回収し、TIL1362から放出されたIFN量を文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515, 1994)記載のELISA法により測定した。IFNが検出された陽性プールから個々のcDNAプラスミドを分離し、上記と同様にHLA-A1cDNAと共にCOS7細胞に導入するスクリーニングを数回繰り返す。腫瘍抗原をコードするcDNAを含むプラスミドを単離した。なお、得られたプラスミド中のcDNAの塩基配列をBig Dye terminator cycle sequencing kitとABI PRISM 310 genetic analyzer(Perkin-Elmer, Foster City, CA)とを用いて決定した。

【0040】A-6(全長cDNAのRACE法(Rapid Amplification of cDNA Ends)による解析)

悪性黒色腫細胞株SKmel23のpoly A+ RNA 1µgを用いて、Marathon TM cDNA Amplification Kit(Clonetech, Palo Alto, CA, USA)の説明書に従いcDNAを作製した。逆転写の際には3'端とトリ骨髄芽球症ウイルスのリバースの2つの縮重した塩基配列を含む、少し変更を加えたoligo(dT)プライマーを、第2鎖cDNAの合成には大腸菌DNAポリメラーゼI、RNase H及びDNAリガーゼを用いた。また、2本鎖cDNAはT4 DNAポリメラーゼにより平滑末端とし、T4 DNAリガーゼを用いてMarathon cDNA adaptor 1(5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3':配列番号5)を連結した。5'-RACEにおけるPCR法では、アダプタープライマー1(5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3':配列番号6)と、Oligo100M(Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)で合成した8B6クローン特異的リバースプライマー(MART-2cDNAの1137番目から1164番目までの塩基配列に相補的な塩基配列:5'-GTCGTAGCCGCCATGCCAGTAGCTCACA-3':配列番号7)を用いて5'端の増幅を行い、3'-RACEにおけるPCR法では、上記アダプタープライマー1と、8B6クローン特異的フォワードプライマー(MART-2cDNAの

763番目から788番目までの塩基配列：5'-CGCCTTCTTTGCTGGTGGTGGCTGGC-3'：配列番号8)を用いて3'端の増幅を行った。そして、これらプライマーを用いた増幅は、94℃で30秒間×1サイクル、94℃で5秒間、72℃で4分間×5サイクル、94℃で5秒間、70℃で4分間×5サイクル、94℃で5秒間、68℃で4分間×2.5サイクル、72℃で7分間×1サイクルのPCR条件で行った。

【0041】上記得られた増幅産物のうちの5μlを1%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。残りの増幅産物はトリシン-EDTA緩衝液で50倍に希釈し、この最初のPCR産物を鋳型にして2回目のPCRを行った。5'-RACEにおけるPCR法では、ネステッドアダプタープライマー2(5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'：配列番号9)と、ネステッド8B6特異的リバースプライマー(MART-2cDNAの1459番目から1486番目までの塩基配列に相補的な塩基配列：5'-GTAA GAAATGCAGAAACACAGGAAGGCC-3'：配列番号10)を用いて5'端を増幅し、3'-RACEにおけるPCR法では、ネステッドアダプタープライマー2と、ネステッド8B6特異的フォワードプライマー(MART-2cDNAの1259番目から1281番目までの塩基配列：5'-TGGCCCCGATACTTCTCCCCACAA-3'：配列番号11)を用いて3'端の増幅を行った。そして、これらプライマーを用いた増幅は、94℃で30秒間×1サイクル、94℃で5秒間、72℃で4分間×5サイクル、94℃で5秒間、70℃で4分間×5サイクル、94℃で5秒間、68℃で4分間×2.0サイクル、72℃で7分間×1サイクルのPCR条件で行った。得られた最終的な増幅産物をpGEM-T(プロメガ社製)にサブクローンした。

【0042】A-7(RT-PCR法によるMART-2の発現解析)

A-1に記載されている腫瘍細胞株及び正常細胞株(メラニン細胞、T細胞、繊維芽細胞)の全RNAは $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞から、グアニジン-塩化セシウム法で抽出した。抽出した全RNA又は上記正常組織RNAを各2μgずつ使用し、Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase(GIBCO BRL)によりcDNAを調製し、MART-2抗原に特異的なセンスプライマー[5'-CGCCTTCTTTGCTGGTGGTGGCTGGC-3'：配列番号12]とアンチセンスプライマー[5'-GTCGTAGCCGCCATGCCAGTAGCTCACA-3'：配列番号13]を用いて、94℃で2分間×1サイクル、94℃で30秒間、62℃で30秒間、72℃で1分間×30サイクル、72℃で7分間×1サイクルの条件でPCRを行った。これらPCRにより得られたPCR産物(cDNA)をア

ガロースゲル電気泳動(1.5%)にかけ、エチジウムブロマイド(EtBr)で染色し254nmの紫外線照射によりバンドを検出した。

【0043】A-8(ノーザンブロットによるMART-2の発現解析)

上記のように抽出した腫瘍細胞株及び正常細胞株の全RNA又は正常組織RNAでMART-2に対するノーザンブロット法を行った。これらRNA(各5.5μg)を、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランフィルター(Hybond N+, Amersham)に移した。次にMART-2抗原に特異的なセンスプライマー(配列番号12)とアンチセンスプライマー(配列番号13)とを用いてPCRを行い、長さ402bpのMART-2の遺伝子断片を作製した。作製した遺伝子断片をHigh Prime DNA Labeling Kit(Boehringer)を用いて³²Pでラベリングしたプローブとし、Quick Hyb solution(Stratagene)をハイブリダイゼーションバッファーとして用いて、その中にナイロンメンブランフィルターを浸し、68℃で20分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上記プローブを加えたQuick Hyb solution中68℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。次いで、このハイブリダイゼーションしたナイロンメンブランフィルターを洗浄液I(2×SSC、0.1%のSDS)で室温下15分間2回洗浄し、洗浄液II(0.1×SSC、0.1%のSDS)で60℃で30分間1回洗浄した。洗浄したナイロンメンブランフィルターを、Molecular Imager(BIORAD)を用いて放射性シグナルの検出を行った。

【0044】A-9(PCR-RFLPによる突然変異の検出)

自己腫瘍細胞株を含む悪性黒色腫細胞株11種(SKmel23、888mel、A375、1362mel、1363mel、928mel、624mel、586mel、526mel、501mel、397mel)、自己T細胞株(1362TIL-1、1362TIL-2)、ヒト腎細胞株(293UT)、サル腎細胞株(COS-7)等の遺伝子DNA又は8B6cDNA50ngと以下のプライマーを用いてPCR-RFLP(Restriction Fragment Length polymorphism: 制限酵素断片長多型)を行い、クローン8B6の変異型を検出した。

【0045】前記8B6特異的フォワードプライマー(配列番号11)と、8B6特異的リバースプライマー(MART-2cDNAの1385番目から1359番目までの塩基配列に相補的な塩基配列：5'-CAGTAGGTTTTCCCAACCTCATGGGCC-3'：配列番号14)とを用いて、127bpのPCR産物を増幅した。上記8B6特異的リバースプライマー(配列番号14)は、野生型8B6配列からのPCR産物中に制限酵素ApaI部位(GGGCCC)を作出し得る

ように、MART-2 cDNAの1361番目のG (グアニン) をC (シトシン) に、1363番目のA (アデニン) をC (シトシン) に置換することにより野生型8B6にミスマッチデザインがなされている。1358番目がG (グアニン) である鋳型から増幅された127bpのPCR産物はApaIにより104bpと23bpの2つの断片に消化された。また、フォワードプライマー (MART-2 cDNAの1334番目から1357番目までの塩基配列: 5'-TCCTGTCCAACCTGGTATTTCTAG-3'; 配列番号15) とリバースプライマー (MART-2 cDNAの1383番目から1406番目までの塩基配列に相補的な塩基配列: 5'-CCTTGATGAAGATCCTATTCCAG-3'; 配列番号16) を合成した。フォワードプライマーは、1356番目のT (チミン) をA (アデニン) に置換することにより制限酵素XbaI部位 (TCTAGA) を作出するようデザインされている。1356番目がA (アデニン) である鋳型から増幅された73bpのPCR産物はXbaIにより20bpと53bpの2つの断片に切断された。なおこれらのプライマーを用いた増幅は、94°Cで2分間×1サイクル、94°Cで30秒間、62°Cで30秒間、72°Cで1分間×30サイクル、72°Cで7分間×1サイクルの条件で行い、得られたPCR産物を制限酵素ApaI又はXbaI (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) で37°Cで1時間消化し、3%のアガロースゲル (AmpliSize Agarose, Bio Rad, Hercules, CA, USA) を用いて電気泳動にかけ、変異株を検出した。

【0046】A-10 (SSCP解析)

蛍光色素FAMで5'端が標識された8B6特異的フォワードプライマー (配列番号11) と、HEXで5'端が標識された8B6特異的リバースプライマー (MART-2 cDNAの1379番目から1406番目までの塩基配列に相補的な塩基配列: 5'-CCTTGATGAAGATCCTATTCCAGTAGG-3'; 配列番号17) を合成し、これらプライマーを用いてPCR法により148bpのDNAを増幅し、SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism: 一本鎖高次構造多型性) 分析をさまざまな細胞株を用いて行った。得られたPCR産物1µlに、サイズスタンダードGS-500 (GeneScan-500; PE Allied Biosystems社製) 0.5µl、0.3NのNaOH 0.5µl及び脱イオンホルムアミド10.5µlを混合し、95°Cで5分間加熱し、氷冷した。この処理したPCR産物をゲル [3%のゲルスキャンポリマー、1×TBE (Tris borate EDTA electrophoresis buffer) 及び10%のグリセロールを含むポリマー] 上にのせ、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Forster City, CA) を用いて317V/cm, 30", 30分間の条件で泳動し、ジーンスキャンソフトウェア ([22](http://g50</p>
</div>
<div data-bbox=)

enes.mit.edu/GENSCAN.html) を用いて分析した。

【0047】A-11 (³⁵S-S-GTP S結合解析) ベクターpcDNA3.1(-)、野生型MART-2及び変異型MART-2 cDNAをそれぞれ10µg導入したCOS-7細胞 (1×10⁶細胞) を、1mMのDTTとプロテアーゼインヒビター混合物であるComplete™ (Roche Molecular Biochemicals) を含む全細胞抽出緩衝液 [50mMのHepes-KOH (pH7.8)、420mMのKCl、0.1mMのEDTA (pH8.0)、5mMのMgCl₂] 1mlに懸濁し、25ゲージの電気針に10回電流を通過させて溶解した。この溶解液を遠心分離にかけ、不溶物を取り除いた。得られた全細胞抽出液30µgを、反応混合液 [20mMのHepes-KOH (pH7.8)、1mMのEDTA、5mMのMgCl₂、2.5mMのDMPC (L- α -dimyristoyl phosphatidylcholine)、0.3%のCHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid)、1mMの³⁵S-S-GTP S] 40µl中で、30°Cで2時間インキュベートした。インキュベート後、氷温のストップバッファー [25mMのMgCl₂、100mMのNaCl、20mMのTris-HCl (pH8.0)] 2mlを添加し、反応を停止させた。この反応溶液をニトロセルロースフィルターで濾過し、このフィルターをストップバッファーで5回洗浄した後、フィルターを10mlのトルエンシンチレーターに入れ、放射能を測定した。

【0048】A-12 (NIH3T3形質転換解析) 各10µgのHST-1 cDNA、ベクターpcDNA3.1(-)のプラスミドDNA、野生型MART-2 cDNA又は変異型MART-2 cDNAを65µgのサケ精子DNAと混合し、このDNAを10cmの組織培養皿上で5×10⁵個のNIH3T3細胞にリン酸カルシウム法 (Mol Cell Biol 4, 1695, 1984) により導入した。24時間培養後、3枚の10cm培養皿に分割し、5%の仔ウシ血清を含むDMEM培地で3週間培養した。

【0049】A-13 (TIL1362が認識するエピトープペプチドの同定)

3'端を順次欠失させた8種類のcDNA [8B6 T1 (8B6 cDNAの1番目から307番目までの塩基配列)、8B6 T2 (8B6 cDNAの1番目から399番目までの塩基配列)、8B6 T3 (8B6 cDNAの1番目から664番目までの塩基配列)、8B6 T4 (8B6 cDNAの1番目から730番目までの塩基配列)、8B6 T5 (8B6 cDNAの1番目から1003番目までの塩基配列)、8B6 T6 (8B6 cDNAの1番目から1341番目までの塩基配列)、8B6 T7 (8B6 cDNAの1番目から1407番目までの塩基配列)、8B6 T8 (8B6 cDNAの1番目から1446番目までの塩基配列)] を作製した。なお、センスプライマーとしては、8B6 cD

NAの1番目から20番目までの塩基配列：5'-CGGCGCGCGTGAACGTTGCC-3' (配列番号18)、アンチセンスプライマーとしては、上記3'端が順次欠失したcDNAの3'末端側から20個の塩基配列に相補的な塩基配列からなるプライマーをそれぞれ合成し、上記9種類のcDNAを増幅する際に用いた。

【0050】上記各種cDNAを文献(J. Immunol. 154, 3961, 1995)記載のようにpcDNA (インビトロジェン社製)にクローニングし、COS7細胞にHLA-A1 cDNAと共に導入発現させ、TIL1362の認識を検討し、エピトープが存在する領域を推定した。推定した領域において、HLA-A1結合モチーフ(9-12アミノ酸の長さで、3番目が陰性荷電アミノ酸、C末端がチロシン)を持つペプチドを、AMS222マルチプルペプチド合成機(ギルソン社製)にて、Fmoc法により合成した。合成したペプチドは、0.05%のトリフルオロ酢酸を含む蒸留水とアセトニトリルを用いて、C8カラム(VYDAC, Hesperia, CA; 精製率98%以上)と同様のR2逆相HPLCカラム(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)により精製し、質量分析器により確認した。また、上記HLA-A1 cDNAを導入したCOS7細胞に合成したペプチドを加え、TIL1362からのINF放出を測定し、T細胞によるペプチドの認識について調べた(Kawakami Y., et *

*al: Identification of New Melanoma Epitopes on Melanosomal Proteins Recognized by Tumor Infiltrating T Lymphocytes Restricted by HLA-A1, -A2 and -A3 alleles. Journal of Immunology 161: 6985, 1998.)。

【0051】実施例B [結果]

B-1 (HLA-A1拘束性TIL1362による新規共通悪性黒色腫抗原の認識)
 実施例A-3記載の方法でHLA拘束性の決定と既知抗原の認識の検討を行った。その結果を表1に示す。この結果から、TIL1362は検討したHLA-A1陽性悪性黒色腫細胞株(1362mel, SKmel23, 397mel)を認識したが、HLA-A1陰性悪性黒色腫細胞株(624mel, 526mel)や、HLA-A1 cDNA導入COS細胞や、HLA-A1 cDNA非導入COS細胞を認識しないことがわかった。また、HLA-A1陰性悪性黒色腫細胞(526mel)にHLA-A1 cDNAを導入するとTIL1362がこの細胞を認識することから、TIL1362は、HLA-A1拘束性に共通悪性黒色腫抗原を認識すると考えられた。さらに、TIL1362は5つの既知悪性黒色腫抗原(MART-1, gp100, チロシナーゼ, TRP1, TRP2)を認識しなかったことから、新規抗原を認識する可能性が示された。

【0052】

【表1】

刺激細胞株	HLA-A1	導入遺伝子	TIL1362 IFN-γ (pg/ml)
1362mel	+	-	1229
SKmel23	+	-	779
397mel	+	-	610
624mel	-	-	0
526mel	-	-	1
526melA1	+	HLA-A1	337
COS-7	-	-	0
COS-7	+	HLA-A1	0

【0053】B-2 (TIL1362が認識する悪性黒色腫抗原cDNAの単離)
 実施例A-4に記載の方法により自己腫瘍細胞株1362melからcDNAライブラリーを作製し、このcDNAライブラリーを実施例A-5記載のようにHLA-A1 cDNAと共にCOS7細胞に導入し、これらcDNAを発現させたCOS7細胞をTIL1362でスクリーニングした。この結果、およそ800cDNAプール(およそ8×10⁴のcDNA)の中から、4つの強陽性細胞(7F12, 8A12, 8B6, 8E12)と4つの弱陽性細胞(7A4, 7A11, 7E8, 8A6)を同定した。各陽性cDNAプールから誘導された80個のコロニーをTIL1362で再スクリーニングし、プール8B6から3つの陽性細胞を、プール7F1

2から5つの陽性細胞を同定した。これらの8つの陽性細胞には同じような1552kbのcDNAが含まれていた。この腫瘍抗原をコードすると考えられる1552bpのcDNA(8B6)を単離し、このcDNAとHLA-A1 cDNAを導入したCOS7細胞が、TIL1362に認識されて放出されるIFN-量をELISA法で測定した。また、比較のため、表2に示される各種細胞株や形質転換COS7細胞についても同様にIFN-放出量を測定した。結果を表2に示す。表2から、このcDNA(8B6)がメラノーマ抗原をコードするcDNAであることを確認した。

【0054】

【表2】

刺激細胞株	HLA-A1	26	
		導入遺伝子	TIL1362 IFN- γ (pg/ml)
-	-	-	97
1362me1	+	-	1756
SKme123	+	-	115
624me1	-	-	117
501Ame1	-	-	84
A375	-	-	82
888EBV-B	+	-	104
1088EBV-B	+	-	117
1359EBV-B	+	-	141
583EBV-B	-	-	147
COS-7	-	-	80
COS-7	+	HLA-A1	82
COS-7	-	HLA-A2	14
COS-7	-	8B6	87
COS-7	-	15A7	72
COS-7	+	HLA-A1+8B6	>4000
COS-7	+	HLA-A1+15A7	88
COS-7	-	HLA-A2+8B6	17
COS-7	-	HLA-A2+15A7	81

【0055】B-3 (全長cDNAの単離とその構造) 上記得られた8B6の全長cDNAを単離するために、1362me1とSKme123細胞株から抽出したpolyA+ RNAを用いて、実施例A-6記載の5'-, 3'-RACE法を前記実施例A-6記載の方法により行った。1362me1株からは、3587bpの全長cDNAが得られた(図1参照)。開始コドンATGの5'フランキング配列中のコザック配列や終始コドンの存在からして、このcDNAは453アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが示された。また、このタンパク質をMART-2 (Melanoma Antigen Recognized by T cell-2) と命名した。他方、SKme123株からは、MART-2の1358番目の塩基がA(アデニン)からG(グアニン)に置換し、483と484塩基の間に195塩基が挿入され、167番目から5'側の配列において全く異なる約1.2kbの断片を有する全長3728bpのcDNAが得られた(図2参照)。このcDNAのフレーム解析を行った結果、518アミノ酸のORF (Open Reading Frame) の存在が示された。上記2195塩基の挿入はフレームシフトを起こさず65アミノ酸が挿入され、1358番目のA(アデニン)からG(グアニン)の置換はグルタミン酸からグリシンへのアミノ酸置換を起こしていた。

【0056】また、Genbankデータベースと相同検索を行ったところ、NT2奇形癌腫 (teratocarcinoma) 細胞株から作製されたライブラリーから相同性のあるcDNA (アクセッション番号: AK001586) が見い出されたが、この塩基配列は1358番目の置換に加え、1363番目の塩基がA(アデニン)からG(グアニン)に置換(アスパラギンからアスパラギン酸へのア

ミノ酸置換)し、483と484番目の塩基の間に195bpが挿入し、1407番目から1586番目までの180塩基が欠失していた(図2参照)。その他、第1染色体上のq32領域に相同性のある塩基配列(AL035414, AL034351)が見い出された。分離された2つのcDNAとデータベース上のcDNAとゲノムDNAの比較から(図2A参照)、195bpの挿入はオルタナティブスプライシングによるものであることが判明した。また、3つの同定されたタンパク質のアミノ酸配列間でその構造の違いが確認できた(図2B; aは1362me1、bはSKme123、cはNT2奇形癌腫)。

【0057】B-4 (MART-2の発現) 前記実施例A-7記載のRT-PCR法及びA-8記載のノーザンプロット法によりMART-2遺伝子の発現について調べた。MART-2遺伝子は、ヒト悪性黒色腫細胞株(SKme123、888me1、1362me1、A375、928me1、624me1、586me1、526me1、397me1、1363me1)、ヒトグリオーマ細胞株(U87-MO、T98G)、肺癌細胞株(K1S、LU99、LK2、EBC1、SBC2、RERF-LCMA)、食道癌細胞株(TE8、TE10)、膀胱癌細胞株(KU7、BC47)、腎臓癌細胞株(RCC6、RCC7、RCC8)、前立腺癌細胞株(JCA1、PC3)、乳癌細胞株(MDA231、HS578)、肝癌細胞株(HepG2)、白血病細胞株(HL60、K562、Molt4)、パーキットリンパ腫細胞株(Daudi)、膵癌細胞株(PK1、PK59)の癌細胞株の他、正常組織(脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、小腸、大腸、腎臓、筋

肉、胎盤、胃、精巣)や正常細胞株(メラニン細胞、T細胞、繊維芽細胞)において発現していた。このことは、MART-2抗原が偏在的に発現することを示している。

【0058】B-5(MART-2のリン酸結合モチーフに起きた突然変異の検出)

1358番目のA(アデニン)がG(グアニン)に置換されることが遺伝的多型性によるものか、腫瘍に起きた突然変異かを判別するために、自己正常細胞株(TIL1362)と自己腫瘍細胞株(1362mel)を含む10悪性黒色腫細胞株11種について、実施例A-9記載のPCR-RFLP法を行った(図3)。この結果から、1358番目の塩基がA(アデニン)の場合に切断する制限酵素XbaIや、塩基がG(グアニン)の場合に切断する制限酵素ApaIを用いても、自己腫瘍細胞の染色体DNAから増幅されたPCR産物は切断されるが、正常細胞及びその他の悪性黒色腫細胞から増幅されたPCR産物ではApaIでしか切断されないことがわかった。これらの結果から、1358番目のA(アデニン)は1362melの腫瘍細胞特異的に起きた突然変異であることが示20された。

【0059】また、この腫瘍特異的突然変異によりグリシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換が起き、野生型には存在するATPやGTPの結合モチーフと言われるリン酸結合ループ[P-loop(phosphate binding*)細胞株(塩基の相違)]

*loop):GX XX XGKT; Trends Biochem Sci 15, 430, 1990]配列が壊れると考えられる。また遺伝子データベースから相同性検索して得られたNT2奇形癌腫細胞株cDNAにはP-loop内に、別のアミノ酸置換を伴う変異を持っていた。そこでMART-2のP-loopに起きた突然変異の有無を、実施例A-10記載のSSCP法によりスクリーニングした。悪性黒色腫細胞株11種(SKmel23、888mel、1362mel、A375、624mel、926mel、586mel、526mel、397mel、501Ame1、1363mel)、各種腫瘍細胞株20種(U87-MO、T98G、TE8、TE10、K1S、LU99、LK2、EBC1、SBC2、RERF-LCMA、KU7、RCC6、RCC7、RCC8、PK1、PK59、PC3、HS578、MDA231、HepG2)、造血器腫瘍細胞株3種(HL60、K562、Molt4)、正常細胞株2種(T細胞、メラニン細胞)の計36細胞株について調べたところ、肺扁平上皮がん細胞株EBC1に、更に異なる変異(A塩基からG塩基、アスパラギン酸からセリン)が見つかった(表3参照)。しかしNT2およびEBC1については患者正常細胞が手に入らないため、これらが腫瘍特異的な変異であることを確認することはできなかった。

【0060】

【表3】 P-ループのペプチド配列

野生型細胞株	FLGGNEVGKTY
1362悪性黒色腫細胞株(G→A)	FL <u>E</u> GNEVGKTY
NT2奇形癌腫細胞株(A→G)	FLGG <u>D</u> EVGKTY
EBC1 SC肺癌細胞株(A→G)	FLGG <u>S</u> EVGKTY

【0061】B-6(MART-2の変異によるGTP結合活性の低下)

非加水分解性の放射性標識GTP(³⁵S-GTP S)を用いて野生型及び変異型MART-2のGTP結合活性を実施例A-11記載の方法で測定した。結果を図4に示す。変異型MART-2を導入したCOS-7細胞から調製した全細胞抽出液ではGTPの結合量が、野生型のものと比べて少ないことから、P-loopモチーフの変異がMART-2タンパクのGTP結合活性の低下を引き起こしていることが示された。また、癌遺伝子であるras遺伝子は、P-loopにおいて変異が起

こることで腫瘍原性を持つことが知られている(Annu RevBiochem 56, 779, 1987)。そこで、実施例A-12のように野生型及び変異型MART-2cDNA、陰性コントロール(ベクターpcDNA3.1)、陽性コントロール(HST-1cDNA)を、それぞれNIH3T3細胞に導入し、形質転換活性の有無を検討してみたが変異MART-2において顕著な形質転換活性は見られなかった。結果を表4に示す。

【0062】

【表4】

導入遺伝子	フォーカス数	1mm以上のフォーカス数	フォーカス数/mg
Hst(250ng)	76	13	304
	49	9	196
変異型MART-2(10μg)	18	0	1.8
	16	0	1.6
野生型MART-2(10μg)	22	0	2.2
	19	0	1.9
pcDNA3.1(10μg)	26	0	2.6
	20	0	2.0

【0063】B-7 (エピトープペプチドの同定)
 単離した8B6 cDNA上でエピトープが存在する領域を推定するために、実施例A-13記載のように8種類の3端が欠失した8B6 cDNA断片[5B6 T1、5B6 T2、5B6 T3、5B6 T4、5B6 T5、5B6 T6、5B6 T7、5B6 T8]を複製し、それらをHLA-A1 cDNAとともにCOS7細胞に導入し、これらのCOS7細胞のTIL1362による認識をIFNアッセイで検討した。この結果を表5に示す。この結果から、1407bpのcDNA

* (5B6 T7)までは陽性で、1341bpのcDNA (5B6 T6)及び更に欠失を進めたcDNA全て[5B6 T1、5B6 T2、5B6 T3、5B6 T4、5B6 T5]に陰性であることがわかった。またHLA-A1結合モチーフ(9~12アミノ酸で、3番目が陰性荷電アミノ酸、C末端アミノ酸がチロシン)に適合するアミノ酸配列を検索し、抗原エピトープ候補となる8種類のペプチドを合成した。

【0064】

刺激細胞株	HLA-A1	導入遺伝子	TIL1362 IFN- γ (pg/ml)
-	-	-	5
SKme123	+	-	374
397me1	+	-	301
624me1	-	-	2
COS-7	+	HLA-A1	4
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 H10(1-1552)	>4000
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T1(1-307)	3
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T2(1-399)	4
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T3(1-664)	4
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T4(1-730)	3
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T5(1-1003)	3
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T6(1-1341)	3
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T7(1-1407)	3183
COS-7	+	HLA-A1, 8B6 T8(1-1446)	1312

【0065】上記合成した8種類の候補ペプチド[NEVGKTY、GNEVGKTY、EGNEVGKTY、LEGNEVGKTY、FLEGNEVGKTY、VLEGNEVGKTY、LVFLEGNEVGKTY、NLVLEGNEVGKTY]に対するTIL1362の認識を検討した(図5)。この結果から、配列番号4で示される11アミノ酸からなるペプチドFLEGNEVGKTYが最も低いペプチド濃度でTIL1362に認識されることから、このペプチド鎖がTIL1362のエピトープであることが示された。この同定されたエピトープペプチドは、腫瘍特異的に起こった突然変異を含んでいたため、野生型のアミノ酸に置換したペプチドFLGGNEVGKTYに対するTIL1362の認識を検討してみた(図6)。この結果、TIL1362は野生型ペプチドを認識しなかったことから、TIL1362は自己腫瘍にのみ存在する変異ペプチドを認識していることが示唆された。しかし、TIL1362はHLA-A1を持つ異種悪性黒色腫をも認識し反応することから、単離されていない共通抗原が存在すると考えられる。

*において特異的な変異が存在し、該変異が免疫原性を有することが証明された悪性黒色腫抗原MART-2も、癌の発生に関係している機能分子である可能性は大きい。MART-2の変異が少なくとも他の癌細胞株(肺癌、奇形種)にも示唆されたこと、細胞内シグナル伝達系の重要な構成要素であるGTP結合蛋白質であること、及びその変異がシグナル伝達機能に影響を与えている可能性があることは、その遺伝子変異が癌において一般的であることを示唆しているものと考えられる。このようにMART-2は、機能的な重要性と免疫原性を同時に有する分子としての一般性が期待できる抗原タンパク質として捉えることができ、癌の診断薬や治療薬の標的分子となる可能性が大きい。

【0067】

【0066】癌の発生・成長に重要な意義をもつ分子の突然変異が同時に免疫原性を有する例は過去においても知られており、上記のように、一つのメラノーマ細胞株*

【発明の効果】本発明によると、生理的に重要である悪性黒色腫抗原活性を有するペプチド又はタンパク質、特にT細胞エピトープや、それらをコードするDNAを提供することができる。また、それら悪性黒色腫抗原、特にT細胞エピトープやそれらをコードするDNAは、各種癌の治療や診断に有用であり、免疫誘導活性の促進又は抑制物質のスクリーニングに用いることができる。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

The United States of America

<120> Human Malignant Melanoma

Antigens

<130> 000000099

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(1579)

<400> 1

crbbgggctg cgctgctcct ccaaaggcca gctc
 cggggg aaagagggtg gcgtcccggg 60
 gaagcccgca gccgccgccc atgctgctgg gact
 cggaag tgccgaaaga ggggtgttg 120
 gaactcgagg cgcgctgaa cgttgccgtc gccg
 ccgccc gggacagccc ggagaaactc 180
 tcagcgtagg catcggaac ctctgtcca agga
 gcc atg ctg ccc cga tgg gaa 235

Met Leu Pro Arg T

rp Glu

1 5

ctg gca ctt tac cta ctt gcc tca cta ggc
 ttc cac ttc tat tcc ttc 283

Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Ala Ser Leu Gly
 Phe His Phe Tyr Ser Phe

10 15 20

tat gaa gtt tac aaa gtc tcc aga gaa cac
 gaa gag gag ctg gac cag 331

Tyr Glu Val Tyr Lys Val Ser Arg Glu His
 Glu Glu Glu Leu Asp Gln

25 30 35

gaa ttt gag ctg gag act gac act tta ttt
 gga gga tta aag aag gat 379

Glu Phe Glu Leu Glu Thr Asp Thr Leu Phe
 Gly Gly Leu Lys Lys Asp

40 45 50

gcg acc gac ttt gag tgg agc ttc tgg atg
 gaa tgg ggg aag cag tgg 427

Ala Thr Asp Phe Glu Trp Ser Phe Trp Met
 Glu Trp Gly Lys Gln Trp

55 60 65 70

ctg gtg tgg ctt ctc ctt ggc cac atg gta
 gtg tct caa atg gcc aca 475

Leu Val Trp Leu Leu Leu Gly His Met Val
 Val Ser Gln Met Ala Thr

aat ggg ccc atc ctc agc ttc tgc gag ttc
atc aaa cag atg cag cag 715
Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe Ser Glu Phe
Ile Lys Gln Met Gln Gln
155 160 165
cag gag cat gac tcc ctg aag gcc agc ctg
tgt gtc ctg gcc ctg ggg 763
Gln Glu His Asp Ser Leu Lys Ala Ser Leu
Cys Val Leu Ala Leu Gly
170 175 180
ctg ggc cgc ctt ctt tgc tgg tgg tgg ctg
gcc gag ctg atg gct cac 811
Leu Gly Arg Leu Leu Cys Trp Trp Trp Leu
Ala Glu Leu Met Ala His
185 190 195
ctg atg tac atg cat gcc atc tac agc agc
atc ccc ctc ctg gag act 859
Leu Met Tyr Met His Ala Ile Tyr Ser Ser
Ile Pro Leu Leu Glu Thr
200 205 210
gtc tct tgt tgg acc tta gga gga ctg gcg
tta gcc cag gtg ctc ttt 907
Val Ser Cys Trp Thr Leu Gly Gly Leu Ala
Leu Ala Gln Val Leu Phe
215 220 225 2
30
ttc tac gtg aag tac ttg gtg ctc ttt ggc
gtg cct gct ctg ctc atg 955
Phe Tyr Val Lys Tyr Leu Val Leu Phe Gly
Val Pro Ala Leu Leu Met
235 240 245
cgc ctg gat gga ctc act cca ccc gcc ctc
ccc cgc tgc gtg agc acc 1003
Arg Leu Asp Gly Leu Thr Pro Pro Ala Leu
Pro Arg Cys Val Ser Thr
250 255 260
atg ttc agt ttc acc ggg atg tgg agg tat
ttt gat gtt gga ctg cat 1051
Met Phe Ser Phe Thr Gly Met Trp Arg Tyr
Phe Asp Val Gly Leu His
265 270 275
aat ttc tta atc agg tat gtg tac att cca
gtg ggc ggg tcc cag cat 1099
Asn Phe Leu Ile Arg Tyr Val Tyr Ile Pro
Val Gly Gly Ser Gln His
280 285 290
ggc ctg ctg ggg aca ctg ttt tcc acg gcg
atg aca ttt gca ttt gtg 1147
Gly Leu Leu Gly Thr Leu Phe Ser Thr Ala
Met Thr Phe Ala Phe Val
295 300 305 3
10

Leu Asn Pro Cys Trp Glu Thr Ala Phe Gln
 Gly Phe Pro Val Phe Leu
 410 415 420
 cat ttc tta caa aca gag gta ctg gct acc
 ttt gtt ccc aac tat ttt 1531
 His Phe Leu Gln Thr Glu Val Leu Ala Thr
 Phe Val Pro Asn Tyr Phe
 425 430 435
 tcc tgg aat att tgt ata gaa aac acc tcc
 gaa ttg tcc agc tac taa 1579
 Ser Trp Asn Ile Cys Ile Glu Asn Thr Ser
 Glu Leu Ser Ser Tyr
 440 445 450
 gcagcaatat caggctggcc ttgggtgacc ctct
 ctgtcc tgggattcct gtactgctac 1639
 tcccacgtgg gcattgcctg ggcccagacc tacg
 ccacgg actaatgctg ttggcccag 1699
 gccagtcctt gttgctggcc tccaaggcaa atag
 tgcttc accctaacct ctactccag 1759

 gacagcctct aagggatttg atctgctcat ctic
 agttga atgccctcac tccaagactg 1819
 gatgctggat ctcatagaaa attcacagcc agac
 aatctt ctaatctgga gtctttgaga 1879
 tcttctacc caactcatca ttttctatt gagg
 aaacgg gtccagggca gtcgtgtgtc 1939
 ttaccagtt acacagggtg acatittggt ctag
 aaccta gtctcatgag ccctttgcat 1999
 tctttcccct taagcaagaa tagaatgtag tgga
 aattta ttgattgaga cacagaaatc 2059
 ctgattagt ataggcctgt cttctgggca atat
 ttctaa aatatttgag tgacattgat 2119
 gttaagtga cctccttcat cacatcctgc agta
 tctcca gaagcagcac tagggtttga 2179
 gtttcatgct tcagcccctc ttaggaatg agac
 caagcc acagctgtct ttgaattac 2239
 gtagtcgaag aagacgtag cagccctgta gcat
 tctaag gcatctatac ccaaggagtc 2299
 ctgtgatctg agcttcagca ggggatcta catt
 tgggtg cttgtttctg agatttgag 2359
 agaagtataa catgtagtt cctctacctt acag
 ttaatc gtttcttaat aaagaagcag 2419
 aatttagaaa ccacaggata gtgtaccac agat
 ggggtg tatcaaggcc agtcatgagg 2479
 atgggtcct ggagtcctgt ccacccttc cata
 caagtc tcaaaagtca tcctcctact 2539
 cagtgattca cgtttagtg tttatattat taag
 gtttga ttcaaacaga gccttttctg 2599
 tcctgtagat aatctacatg ttgtagaat tatt
 ttgaat atgtttgagg aaaatgttta 2659

 aaatctaaat atactcacat aacttgattt ttca
 ctccct tgaagagatg ctggataggc 2719

cmvnrarmv srtccvmcrs twrdgadhkm srct
 gcgctg ctctccaaa gggcagctcc 3979
 ggggaaaga ggggtggcgc ccgggaagc ccgc
 agccgc cgccgatgic gctgggactc 4039
 ggaagtgccg aaagaggggt gttgggaact cgtt
 dgdanc dada*rtnt ytabwrddcm 4099
 ntsmarynr matndcmnts mmarynmat ncm
 bctmcr stwrds wrd dwrddcmnt 4159
 <210> 2
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Leu Pro Arg Trp Glu Leu Ala Leu Tyr
 Leu Leu Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe His Phe Tyr Ser Phe Tyr Glu Val Tyr
 Lys Val Ser Arg Glu His
 20 25 30
 Glu Glu Glu Leu Asp Gln Glu Phe Glu Leu
 Glu Thr Asp Thr Leu Phe
 35 40 45
 Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ala Thr Asp Phe
 Glu Trp Ser Phe Trp Met
 50 55 60
 Glu Trp Gly Lys Gln Trp Leu Val Trp Leu
 Leu Leu Gly His Met Val
 65 70 75 80
 Val Ser Gln Met Ala Thr Leu Leu Ala Arg
 Lys Arg Arg Trp Tyr Lys
 85 90 95
 Thr Glu Asn Glu Tyr Tyr Leu Leu Gln Phe
 Thr Leu Thr Val Arg Cys
 100 105 110
 Leu Tyr Tyr Thr Ser Phe Ser Leu Glu Leu
 Arg Trp Gln Gln Leu Pro
 115 120 125
 Ala Ala Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Pro Trp
 Met Leu Ala Tyr Val Phe
 130 135 140
 Tyr Tyr Pro Val Leu His Asn Gly Pro Ile
 Leu Ser Phe Ser Glu Phe
 145 150 155 1
 60
 Ile Lys Gln Met Gln Gln Gln Glu His Asp
 Ser Leu Lys Ala Ser Leu
 165 170 175
 Cys Val Leu Ala Leu Gly Leu Gly Arg Leu
 Leu Cys Trp Trp Trp Leu
 180 185 190
 Ala Glu Leu Met Ala His Leu Met Tyr Met
 His Ala Ile Tyr Ser Ser

325 330 335
 Val Arg Arg Leu Val Glu Thr Pro Cys Ile
 Gln Asp Ser Leu Ala Arg
 340 345 350
 Tyr Phe Ser Pro Gln Ala Arg Arg Arg Phe
 His Ala Ala Leu Ala Ser
 355 360 365
 Cys Ser Thr Ser Met Leu Ile Leu Ser Asn
 Leu Val Phe Leu Glu Gly
 370 375 380
 Asn Glu Val Gly Lys Thr Tyr Trp Asn Arg
 Ile Phe Ile Gln Gly Gly
 385 390 395 4
 00
 Leu Phe Leu Phe Phe Leu Leu Asn Pro Cys
 Trp Glu Thr Ala Phe Gln
 405 410 415
 Gly Phe Pro Val Phe Leu His Phe Leu Gln
 Thr Glu Val Leu Ala Thr
 420 425 430
 Phe Val Pro Asn Tyr Phe Ser Trp Asn Ile
 Cys Ile Glu Asn Thr Ser
 435 440 445
 Glu Leu Ser Ser Tyr
 450

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tttcttgagg gcaatgaggt tgggaaacc tac

33

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Glu Gly Asn Glu Val Gly Lys Thr
Tyr

1

5

10

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Marathon cDNA

adaptor 1

<400> 5

ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgc
ccgggc aggt

44

<210> 6

<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:8B6 cDNA
specific reverse primer
<400> 7
gtcgtagccg ccatgccagt agtcaca
28

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:8B6 cDNA
specific forward primer
<400> 8
cgccttcttt gctggtggtg gctggc
26

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:nested Adaptor
Primer 2
<400> 9
actcactata gggctcgagc ggc
23

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:nested 8B6 cDNA
specific reverse primer
<400> 10
gtaagaaatg cagaaacaca ggaaggcc
28

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:nested 8B6 cDNA
specific forward primer
<400> 11

<223> Description of Artificial

Sequence:MART-2 cDNA

specific sense primer

<400> 12

cgccttcttt gctggtggg gctggc

26

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:MART-2 cDNA

specific antisense primer

<400> 13

gtcgtagccg ccatgccagt agctcaca

28

<210> 14 31

<211> 27

~~<223> Description of Artificial~~

~~Sequence:Artificial DNA Sequence~~

<220> specific reverse primer

<400> 14

cagtaggttt tccaacctc atgggcc

27

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:forward primer

<400> 15

tctgtccaa cctggtattt ctg

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:reverse primer

<400> 16

ccttgatga agatcctatt ccag

24

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

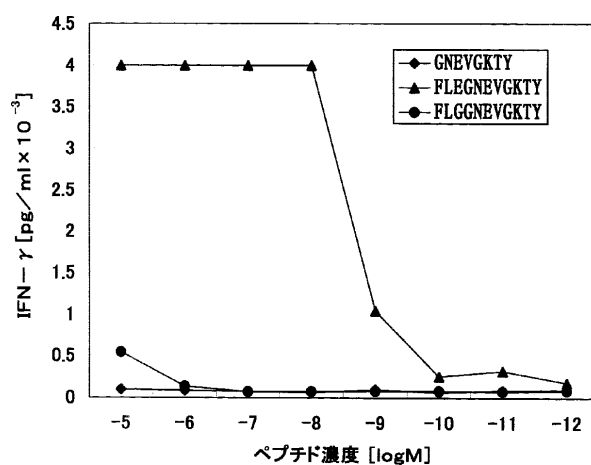
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:8B6 cDNA

【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁴ (参考)	
C 0 7 K	19/00	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15		1/19	4 H 0 4 5
	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/08	
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
	5/06		1/68	A
C 1 2 P	21/08	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50		33/574	A
	33/53		33/577	B
	33/566		33/68	
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577		5/00	A
	33/68			B
				E

(72)発明者 河上 裕

神奈川県横浜市神奈川区片倉町757 - 120

(72)発明者 ローゼンバーグ, スティーブン・エイ
 アメリカ合衆国メリーランド州20854, ポ
 トマック, アイロン・ゲート・ロード
 10104

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA29 AA34 AA35 AA40
BB20 CA18 CB01 CB17 DA12
DA13 DA14 DA36 DA78 FB02
FB03 FB07
4B024 AA01 AA11 BA36 CA01 CA04
CA09 CA11 DA02 EA04 GA11
HA01 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ13
QQ79 QQ91 QR32 QR35 QR56
QR77 QR80 QS33 QS34 QX02
4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 DA01
DA13
4B065 AA90X AA93Y AA94X AB01
AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
CA46
4C084 AA16 BA44 NA14 ZB031
ZB032 ZB081 ZB082 ZB091
ZB092 ZB211 ZB212
4H045 AA11 BA10 CA41 DA75 DA76
DA86 EA28 EA51 FA72 FA73
FA74 HA05

专利名称(译)	人恶性黑色素瘤抗原		
公开(公告)号	JP2002223765A	公开(公告)日	2002-08-13
申请号	JP2001023526	申请日	2001-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 美国政府		
申请(专利权)人(译)	学校法人 慶應義塾 美国		
[标]发明人	河上裕 ローゼンバーグスティーブンエイ		
发明人	河上 裕 ローゼンバーグ,スティーブン・エイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P37/02 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/07 C12N5/0783 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 C12N5/06		
FI分类号	A61K45/00 A61P37/02 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.A G01N33/577.B G01N33/68 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B C12N5/00.E C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/00.202.L C12N5/0783 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA16 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB031 4C084/ZB032 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	IFN- γ (pg/ml)			
解决的问题：提供可用于癌症的诊断和治疗的恶性黑色素瘤抗原，编码该恶性黑色素瘤的基因等。 SOLUTION：使用从恶性黑色素瘤细胞系获得的mRNA制备cDNA，将该cDNA与HLA-A1 cDNA一起引入COS7细胞，并共同培养COS7细胞和HLA-A1限制性T细胞。通过ELISA测定从T细胞释放的干扰素 γ 的量，分离出新型人恶性黑色素瘤抗原MART-2，并鉴定出T细胞表位 (FLEGNEVGKTY)。	1362me l	+	~	1229
	SKme l 23	+	-	779
	397me l	+	-	610
	624me l	-	-	0
	526me l	-	-	1
	526me l A1	+	HLA-A1	337
	COS-7	-	-	0
	COS-7	+	HLA-A1	0