

(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 - 112779

(P2002 - 112779A)

(43)公開日 平成14年4月16日(2002.4.16)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/00	Z 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		45/00 101	4 B 0 6 3
39/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 4
45/00 101		C 0 7 K 14/82	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 30数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 304143(P2000 - 304143)

(22)出願日 平成12年10月3日(2000.10.3)

(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

(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 藤田 知信

東京都板橋区幸町9 - 3

(72)発明者 伊藤 敬一

東京都大田区久が原1 - 9 - 22 - 301

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト膀胱癌抗原

(57)【要約】

【課題】 膀胱癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膀胱癌抗原や、それをコードする遺伝子等を提供すること。

【解決手段】 膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAを ファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、合計1.2×10⁶個の ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いて逐スクリーニングし、膀胱癌患者血清のみに反応し、健常人血清とは反応せず、膀胱癌細胞や組織において高発現するヒト膀胱癌抗原KU - BL - 1等を作成する。

【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】 請求項4若しくは5記載のタンパク質又は請求項6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】 請求項4若しくは5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項9】 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8記載の抗体。

【請求項10】 請求項8又は9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】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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】 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12又は13記載の非ヒト動物。

【請求項15】 被検物質と、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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】 被検物質と、請求項11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】 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請求項11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】 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発現能を有する請求項11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19】 請求項12～14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20】 免疫誘導活性を測定・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15～19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21】 請求項15～20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22】 請求項15～20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23】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項21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24】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項21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25】 請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断用プローブ。

【請求項26】 請求項25記載の癌の診断用プローブ及び/又は請求項8若しくは9記載の抗体を含有することを特徴とする膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝

癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断薬。

【請求項27】膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングすることにより得られる、膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原を含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

【請求項28】膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングすることにより得られる、膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部、あるいは前記膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原に対する抗体を含有することを特徴とする腫瘍検出用診断剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、膀胱癌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膀胱癌抗原、及びその利用等に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫療法は古くから期待され、様々な試みがなされてきたが、まだ十分な抗腫瘍効果を示すには至っていない。従来、癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、近年、T細胞が生体内での腫瘍拒絶に重要な役割を果たすことがヒトメラノーマにおいて明らかになり、さらにMAGE-1抗原(Science 254, 1643-7, 1991)が1991年にベルギーのグループより報告されてから、細胞傷害性T細胞(CTL: cytotoxic T lymphocyte)を誘導しうるT細胞認識腫瘍抗原の単離とMHCクラスI拘束性エピトープの決定に努力がそそがれている。本発明者らはメラノーマの腫瘍反応性T細胞を用いたcDNA発現クローニング法によりCD8+T細胞認識抗原を単離し(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515-3519, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462, 1994, J. Exp. Med. 180, 347-352, 1994, J. Immunol. 154, 3961-3968, 1995, Immunologic Res. 16, 313-340, 1997)、この抗原を用いた特異的免疫療法により、一部のメラノーマに対して抗腫瘍効果が認められることを報告している(Microbiology Immunology 42, 803-813, 1998, Kawakami, Y., P.F. Robbins, R.F. Wang. et al. Identification of Melanoma antigens by T lymphocytes and their use in the immunotherapy of cancer. In Principle and Practice of Oncology. Update. V. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg eds. J.B. Lippincott Co. Philadelphia, p1-20, 1996, Nature Med. 4, 321, 1998)。

【0003】膀胱癌の治療方法としては、従来、表在性膀胱癌に対しては内視鏡的切除(TUR-BT)と膀胱内注入療法とを組み合わせる治療方法、局所浸潤性膀胱癌に対しては膀胱全摘除術とさらに化学療法や放射線治療を組み合わせる治療方法等による根治的治療方法が知られている。しかし、転移性膀胱癌の治療に関してはmethotrexate, vinbrastine, adriamycin, cisplatinを用いた多剤併用化学療法(M-VAC)や放射線治療、さらにはそれらを組み合わせた治療がなされているが、根治性は期待できず長期的な治療に関しては未だ悲観的である。

【0004】上記膀胱癌の治療において、BCGの膀胱内注入療法は膀胱上皮内癌の治療や表在性膀胱癌の再発の予防として広く用いられ、その有効性が確認されている。この抗腫瘍効果の機序は完全に明らかにされていないが、免疫反応によるものであることが示唆されている。BCGの膀胱内注入療法後に、膀胱腫瘍組織内に単核細胞の著明な増加を認められ(リンパ球優位)、腫瘍組織内においてBCG使用前と比べ、ヘルパーT細胞の比率の増加が認められることが報告されている(J. Urol. 144, 53-8, 1990)。また、BCG使用後の尿中にインターロイキン(IL)-1、IL-2、IL-6、TNF-、インターフェロン(IFN-)などのサイトカインが検出されたことから、BCGの抗腫瘍効果の機序に免疫反応が関連していると考えられる。これらのことから膀胱癌抗原は、転移性膀胱癌の治療としても免疫療法が有効である可能性が示唆されている。しかし、現在、膀胱癌に特異性の高い抗原は単離されておらず、他の癌種から単離された癌抗原を発現している膀胱癌に対してのみ、抗原ワクチンを用いた免疫治療が行われているに過ぎなかった。

【0005】従来、多くの腫瘍抗原の単離としてCTLを用いたcDNA発現クローニング法で行われてきたが、腫瘍の細胞株化とCTLの樹立が必要であることから、メラノーマ以外の癌腫からの腫瘍抗原の単離は困難である。また、免疫治療法の効果を上げるために、多くのペプチドをミックスした治療法が有効と考えられているが、それを確立するためには、数多くの抗原の単離が必要であり、従来のcDNA発現クローニング法は、1つの抗原の単離に多くの労力と時間を費やすという問題があった。

【0006】1995年にドイツのPfreundschuhや米国のOldらのグループにより、腫瘍及びCTLを必ずしも必要とせず、細胞株の樹立が困難である癌腫において適用できる、癌患者血清中の抗体が認識する癌抗原タンパクを検出するSEREX法(serological identification of recombinant cDNA expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995)が報告されている。この方法によって多くの腫瘍抗原が単離されているが、本方法を用いて単離された抗原の中にはCTL

を誘導するMAGE-1やチロシナーゼなどの抗原がみられることから、細胞性免疫が認識する抗原を検出する方法としても有用であることが指摘されている。また、上記方法を用いて、メラノーマ、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌等において、患者IgG抗体が認識する癌抗原を単離した報告もなされている(Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997, Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998, Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998, Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999, Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996, Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997)。これらの抗原にはC 10
T (cancer-testis) 抗原(S SX 2 / H O M - M E L - 4 0、NY - E S O - 1、SCP - 1、CT 7など)、分化抗原(g a l e c t i n - 4 / N Y - C O - 2 7)、変異抗原(p 5 3など)等の重要な抗原がある。これらの抗原の中で特にNY - E S O - 1はH L A - A 2拘束性のエピトープが決定されている。また、S E R E X法を用いて単離された抗原の中には、e l F - 4やH E R 2 / n e uのように癌に高発現する分子もあり、これら分子は癌化に関連している可能性が
20ある。このような癌に高発現する分子は、治療に応用するだけでなく診断のマーカーや再発、予後を推定するマーカーとなる可能性がある。

【0007】現在、膀胱癌において同定されている腫瘍抗原は数少ない。最近、膀胱腫瘍においてC T Lが直接認識する抗原として、正常組織にも発現を認めるK I A A 0 2 0 5抗原が変異を起こしたことにより抗原性を持った分子[M H CクラスI (H L A - B 4 4 0 3)拘束性]が初めて同定された(J. Immunol. 160, 6188-94, 1998)。しかしこの分子は、膀胱癌組織60検体中に1
30例も発現が認められず、1個体のみに変化が起こったものと考えられている。また、T 2 4膀胱腫瘍細胞株から作製したc D N Aライブラリーを肝細胞癌患者の血清を用いてスクリーニングすることにより、以前のメラノーマ細胞株を用いたS E R E X法により単離された遺伝子、すなわち、他の癌腫においても高発現するK O C 3遺伝子が単離された。しかし、これらの分子は膀胱癌に特異性の高い腫瘍抗原とはいえ、未だ膀胱癌の免疫治療に応用可能な抗原は数少ない。また、膀胱癌の診断に関して、前立腺癌のP S Aのように特異性の高い抗原も未だ見つかっていない。

【0008】

【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。本発明の課題は、膀胱癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膀胱癌抗原や、それをコードする遺伝子等を提供することにある。

【0009】

【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、膀胱癌細胞株から得られたm R N Aを用いてc D N Aを作製し、このc D N Aをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞c D N Aライブラリー、合計1 . 2 × 1 0⁶個のファージc D N Aクローンを、膀胱癌患者血清を用いて逐一スクリーニングし、膀胱癌患者血清のみに反応し、健康人血清とは反応せず、膀胱癌細胞や組織において高発現する膀胱癌抗原K U - B L - 1を見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】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)に関する。

【0011】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7)や、請求項4若しくは5記載のタンパク質又は請求項6記載のペプチドに特異的に結合する抗体(請求項8)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8記載の抗体(請求項9)や、請求項8又は9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10)に関する。

【0012】また本発明は、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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11)や、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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12)や、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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13)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12又は13記載の非ヒト動物(請求項14)に関する。

【0013】また本発明は、被検物質と、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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15）や、被検物質と、請求項11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16）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請求項11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、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発現能を有する請求項11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）や、請求項12～14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19）や、免疫誘導活性を測定・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15～19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20）や、請求項15～20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21）や、請求項15～20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22）に関する。

【0014】また本発明は、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項21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23）や、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10記載のタンパク質又はペプチド、又は請求項21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24）や、請求項4～6のいずれか、若しくは請求項10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膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断用プローブ（請求項25）や、請求項25記載の癌の診断用プローブ及び/又は請求項8若しくは9記載の抗体を含有することを特徴とする膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢

癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断薬（請求項26）に関する。

【0015】また本発明は、膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングすることにより得られる、膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原を含有することを特徴とする抗腫瘍剤（請求項27）や、膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングすることにより得られる、膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部、あるいは前記膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原に対する抗体を含有することを特徴とする腫瘍検出用診断剤（請求項28）に関する。

【0016】

【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に示される膀胱癌抗原KU-BL-1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、末梢血の細胞傷害性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。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い。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「本件膀胱癌抗原」ということがある。なお、本件膀胱癌抗原の由来はヒトに限定されるものではない。

【0017】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KU-BL-1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る。かかる膀胱癌抗原KU-BL-1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、膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いて作製したcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリーを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングし、膀胱癌患者血清のみに反応し、健常人血清とは反応せず、膀胱癌を含む癌細胞に発現する本膀胱癌抗原をスクリーニングすることにより得ることができる。

【0018】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、各種膀胱癌由来の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、膀胱癌抗原KU-BL-1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を含む洗浄バッファーによる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を含む洗浄バッファーによる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。

【0019】本発明の融合タンパク質や融合ペプチドとしては、本件膀胱癌抗原とマーカートンパク質及び/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、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカート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、Hisタグ、FLAGタグ、S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膀胱癌抗原KU-BL-1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、膀胱癌抗原KU-BL-1等に対する抗体の定量、膀胱癌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。

【0020】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、これらは上記膀胱癌抗原KU-BL-1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、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KU-BL-1エピトープ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、膀胱癌等の診断、ミサイル療法等の治療ばかりでなく、膀胱癌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。

【0021】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）に本件膀胱癌抗原若しくはエピトープを含むその断片、又は該本件膀胱癌抗原、特にエピトープと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、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、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。

【0022】本発明の上記本件膀胱癌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、その本件膀胱癌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。本件膀胱癌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、膀胱癌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膀胱癌抗原に包含される。

【0023】本発明はまた、上記本件膀胱癌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膀胱癌抗原を発現することができる発現系を含んでなるHLA発現能を有する宿主細胞に関する。かかる本件膀胱癌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、トランスフェクション(transfection)、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 loadi

ng)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

【0024】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)、BHK21細胞、HEK293細胞、BOWES膀胱癌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HLAcDNA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。

【0025】また、発現系としては、上記本件膀胱癌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、アデノアソシエテッドウイルス、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。

【0026】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膀胱癌抗原は、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、かかる本件膀胱癌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、本件膀胱癌抗原に対する抗体を結合させたカラムや、上記本件膀胱癌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、本件膀胱癌抗原を得ることができる。

【0027】本発明において、上記本件膀胱癌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、染色体上の本件膀胱癌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、本件膀胱癌抗原を発現する機能を失った非ヒト動物をいい、また、本件膀胱癌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膀胱癌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。

【0028】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、本件膀胱癌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、すなわち本件膀胱癌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。かかる本件膀胱癌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、本件膀胱癌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って以下説明する。

【0029】例えば、本件膀胱癌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、すなわち本件膀胱癌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、本件膀胱癌抗原をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた本件膀胱癌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膀胱癌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。

【0030】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、本発明の本件膀胱癌抗原ノックアウトマウスを作製することができる。また、本件膀胱癌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。

【0031】本件膀胱癌抗原のトランスジェニックマウスは、本件膀胱癌抗原をコードする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、生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、導入した本件膀胱癌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。

【0032】また、上記本件膀胱癌抗原をコードする遺伝子若しくはDNA、本件膀胱癌抗原、本件膀胱癌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、本件膀胱癌抗原に対する抗体、本件膀胱癌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、膀胱癌をはじめとする脳腫瘍(グリオーマ)、悪性黒色腫(メラノーマ)、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉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や、かかる検出の試薬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。

【0033】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、被検物質と本件膀胱癌抗原とT細胞とを用い、該T細胞における免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検物質と本件膀胱癌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本件膀胱癌抗原発現宿主細胞と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発現能を有する本件膀胱癌抗原発現宿主細胞と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、前記本件膀胱癌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、本発明の本件膀胱癌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膀胱癌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を挙げることができる。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、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。

【0034】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、本件膀胱癌抗原を有効成分として含有する膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫に対する抗腫瘍剤に関する。例えば、本件膀胱癌抗原を経口、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、本件膀胱癌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とともに本件膀胱癌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。また本件膀胱癌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。

【0035】さらに本発明は、本件膀胱癌抗原をコードする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膀胱癌抗原に特異的に結合する抗体を含有する膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、

肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫等の診断薬に関する。上記診断用プローブとしては、本件膀胱癌抗原をコードする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膀胱癌抗原のmRNAを検出することにより、膀胱癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫等の疾病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。

【0036】そしてまた、本発明は、膀胱癌細胞株から得られたmRNAを用いてcDNAを作製し、このcDNAをファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膀胱癌細胞cDNAライブラリー、ファージcDNAクローンを、膀胱癌患者血清を用いてスクリーニングすることにより得られる、膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原を含有することを特徴とする抗腫瘍剤や、上記膀胱癌細胞由来の膀胱癌抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部、あるいはそれに対する抗体を含有することを特徴とする腫瘍検出用診断剤も包含される。

【0037】

【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。

[膀胱癌細胞株の調製] cDNAライブラリーの作製にはヒト膀胱癌細胞株FY細胞株を使用した。FY細胞株は異型度の高い膀胱腫瘍を有する患者より、膀胱全摘除術のときの膀胱内原発腫瘍より樹立された培養細胞株である。本腫瘍の病理組織学的診断は、グレード3の移行上皮癌で、一部に扁平上皮癌、腺癌、肉腫様癌に分化した組織像を示していた。かかる腫瘍は深部筋層に浸潤を認め、またリンパ管侵襲を伴っていた。上記FY細胞株は、RPMI 1640(10%のウシ胎児血清、100U/mlのペニシリン、0.1µg/mlのストレプトマイシン、2mMのL-グルタミン、10mMのHEPESを含む)で37、5%のCO₂、湿度100%の条件下で1×10⁸となるまで培養した。この1×10⁸細胞を回収後、液体窒素で凍結し-80にて保存した。

【0038】[cDNAクローニングのための血清処理]

cDNAスクリーニングに用いた血清は、FY細胞

株を樹立した膀胱腫瘍を有する前記患者から得られた血清を使用した。採血後の血清は-80にて保存した。この血清中の大腸菌に対する抗体を吸着処理するために、血清1mlを大腸菌(XL1-Blue MRF' stain)のライセートと1:5の割合で混合し、4で8時間放置後、15000×gにて20分間遠心し上清を回収した。この上清を、TBS(Tris-buffered saline)と5%の脱脂粉乳(wt/vol.)の混合液で100倍に希釈した後、更にベクターシステムに対する抗体を吸着処理するために大腸菌とファージ由来のタンパクを吸着させた(インサートが入っていないファージから産生されたタンパクがトランスファーされている)15cmのニトロセルロースフィルター(Hybond-C, Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, England)20枚(1mlの血清に対して)を希釈した血清中に入れて、8時間室温にて振盪し、上清中の非特異的な抗大腸菌抗体と抗ファージ抗体を吸着処理してから使用した。

【0039】[膀胱癌細胞株からのファージcDNAライブラリーの作製]前記培養したFY細胞株(1×10⁸個)からグアニジン-塩化セシウム超遠心法により全RNAを抽出し、mRNAをoligo(dT) Oligotex-dT30 super mRNA Purification Kit(Takara Shuzou, Kyoto, Japan)を用いたポリ(A)選択法により精製した。精製したポリ(A)RNA5µgを、ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)によりZAPエクスプレクターに挿入し、2.3×10⁶pfuのクローンから成る膀胱癌ファージcDNAライブラリーを作製した。なお、このcDNAライブラリーはBリンパ球を含んでいないことから、IgGをコードするcDNAクローンは含まれておらず、そのため疑陽性クローンは検出されない。この作製したcDNAライブラリーを増幅して以下のイムノスクリーニングに用いた。

【0040】[血清によるcDNAライブラリーのイムノスクリーニング]上記作製したファージcDNAライブラリーを15cmNZYアガロースプレートに0.5~1×10⁴個播き、42で4時間培養して大腸菌(XL1-Blue)上に発現させた。この寒天培地上にIPTGを吸収させたニトロセルロースフィルターをのせて37で4時間培養し、発現した融合タンパク質をニトロセルロースフィルターにトランスファーし、TBST(10mMのTris-HCl、150mMのNaCl、0.5%のTween20; pH7.4)でフィルターを洗浄した後、TBS/5%の脱脂粉乳中で約8時間放置し非特異的反応を抑制した。このフィルターと前記吸着処理した血清を室温で4時間反応させて血清中の抗体が反応したブランクを、二次抗体として4000倍に希釈した抗ヒトIgG-Fc酵素標識抗体(anti human IgG Fc goat antibody alkaline phosphate conjugated, CAPPEL)を用いて反応させ、nitro blue tetrazolium(Roche)と5-bromo-4-chloro-3-indolyl(Sigma-Ald

rich Japan, Tokyo, Japan) による酵素発色反応により検出し、発色反応陽性部位に一致するブランクを15 cmNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液(100 mMのNaCl、10 mMのMgSO₄、50 mMのTris-HCl、0.01%のゼラチン; pH 7.5) に溶解させた。発色反応陽性ブランクが単一化するまで上記と同様の方法で2次、3次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgG抗体が反応する単一のファージクローンを得た。前記患者の血清を用いて、SEREX法によるイムノスクリーニング(合計で1.2 × 10⁶個のファージクローンをスクリーニング)を行い、78個の陽性クローンを単離した。

【0041】[単離抗原遺伝子の相同性検索] 上記得られた78個のファージからPCR (polymerase chain reaction) 法によりインサートDNAを増幅し、以後の解析に用いた。反応酵素にはEx-Taq (Takara Shuzo) を用い、センスプライマーにT3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3 : 配列番号3)、アンチセンスプライマーにT7 (5'-GTA ATA CGA CTC ACA T A G G G C - 3 : 配列番号4) を用いた。なお、反応条件は、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) を用いて熱変性94 で1分間、アニーリング55 で2分間、伸長反応72 で2分間というサイクルを35サイクル行った。得られたPCR産物をBig Dye DNA Sequencing kit (PE Biosystems, CA) とABI 310 オートシーケンサー (PE Biosystems, CA) とを用いてDNAシーケンシングを行い、まず300~650 bpの塩基配列を決定した。この結果48種類の異なった遺伝子が得られた。

【0042】上記決定された48種類の遺伝子の塩基配列を、それぞれ相同性検索プログラムBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて、NCBI データバンクに登録されている遺伝子情報と比較した。なお、データベース上の検索の結果、既知の分子であれば、過去の文献上で癌と関連のある分子を癌抗原候補遺伝子として選別し、未知の分子であれば、DNAデータベース上で一致するDNAクラスター [expression sequence tag (EST) など] の由来する組織や細胞株が、癌組織や、癌細胞株や、胎児性組織、精巣などの限定された正常組織等に限られ、特異的な発現パターンが予想されるものを候補として選別した。結果を表1、2 (35種類の既知抗原遺伝子) 及び表3 (13種類の未知抗原遺伝子) に示す。なお、未知遺伝子は、EST (expressed sequence tags)、KIAA (KIAA proteins; KAZUSA, Chiba, Japan)、及びDNAデータベース (GenBank etc.) 上に登録されているDNA断片配列 (DNA clusters) 以外に一致するものがないものであった。また、KU-BL-3/EST (GenBankアクセッション番号: A1377951) やKU-BL-13/high density lipoprotein binding proteinには8個、KU-BL-4/KIAA0603には7個、KU-BL-1/EST (GenBankアクセッション番号: A1075753)、KU-BL-15/KIAA0782、KU-BL-16/NC2 alpha-subunit、KU-BL-48/pinch proteinについてはそれぞれ2個の同一クローンが検出された。

【0043】

【表1】

【表2】

クローン名	サイズ (kb)	単離されたクローン数	同一性 (GenBank, アクセッション番号)	Unigeneクラスター (染色体位置)	機能
KU-BL-2	2.7	1	transcription factor Tat-CT1 (AF040253)	Hs.70186 (19q13)	transcription factor
KU-BL-5	2.5	1	Golgin-84 (AF085199)	Hs.241572 (10)	RET protooncogene-fused gene
KU-BL-6	1.2	1	alpha-enolase (M14328)	Hs.250762 (1p36.3-p36.2)	glycolytic enzyme
KU-BL-7	0.8	1	67 kD laminin receptor 1 (S37431)	Hs.181357 (17; D17S933-D17S800, 3p21)	cytoskeletal protein
KU-BL-8	3	1	Mitotin (U30872)	Hs.77204 (1q32-q41)	involved in mitotic phase progression
KU-BL-9	2.9	1	PM5 protein (AA304960)	Hs.227823 (16, X)	metalloproteinase-like collagenase
KU-BL-10	2.8	1	EBNA-2 coactivator (U22055)	Hs.79093 (7q31)	transcription co-activator
KU-BL-11	2.5	1	HSP 70-1 (M59828)	Hs.8997 (6p21.3)	molecular chaperone
KU-BL-12	0.9	1	non-muscle alpha-actinin4 (U48734)	Hs.3798 (19q13)	cytoskeletal protein
KU-BL-13	3.1	8	High density lipoprotein binding protein (M64098)	Hs.177516 (2q37)	lipid transport
KU-BL-14	2.5	1	Lbc protooncogene (AF127481)	Hs.(-) (15q24-q25)	protooncogene
KU-BL-16	0.9	2	NC2 α -subunit (X96506)	Hs.118724 (17; D17S922-D17S798, 11; D11S913-D11S916)	transcriptional repression
KU-BL-17	0.9	1	endothelial NOS3 (AF032908)	Hs.166373 (7q36; D7S2450-D7S550)	NO synthesis
KU-BL-18	2	1	Kinectin 1 (D13629, L25616)	Hs.82709 (14q22.1; 14DS281-D14S980)	bind to kinesin motor protein
KU-BL-20	1.8	1	STE20-like kinase (AF179867)	none	serine/threonine kinase (p21-binding domain)
KU-BL-21	0.8	1	Follistatin-related protein (D89937)	Hs.155712 (15.2.3)	TGF-beta-inducible protein
KU-BL-23	1.6	1	Tyrosyl-tRNA synthetase (U89436)	Hs.239307 (1; DIS2843-D1S417)	tRNA synthesis
KU-BL-24	1.3	1	Initiation factor 4B (X55733)	Hs.93379	protein translation

クローン名	サイズ (kb)	単離されたクローン数	同一性 (GenBank, アクセッション番号)	Unigeneクラスター (染色体位置)	機能
KU-BL-25	2	1	Elongation factor -1 alpha (X03558)	Hs.181165	protein translation
KU-BL-26	1	1	transcription factor CA150 (AF017789)	(4: D4S2947-D4S400, 12, 13, 6q14)	HIV-1 Tat transcriptional coactivator
KU-BL-27	1.9	1	Thrombospondin 1 (X04665)	(5: D5S436-D5S470)	extracellular matrix glycoprotein
KU-BL-28	0.8	1	Translocon-associated protein delta (Z69043)	(15q15; D15S118-D15S146)	ER membrane protein
KU-BL-29	2.3	1	C-terminal binding protein 2 (AF016507)	(Xq28; DXS1193-qTEL)	transcriptional repressor
KU-BL-30	2.2	1	Protective protein for beta-galactoside (M22960)	(10; D10S587-D10S214, 21q21.3)	glycoprotein
KU-BL-32	0.4	1	Lens epithelium-derived growth factor (AF063020)	(20q13.1; D20S119-D20S197)	growth factor
KU-BL-35	1.3	1	Histone macro H2A1.2 (AF054174)	(9p22.2; D9S1808-D9S162)	play a role in transcriptionally active chromatin
KU-BL-37	2	1	Annexin VIII (M81844)	Hs.82110	vascular anticoagulant
KU-BL-38	0.8	1	Ribosomal protein L28 (U14969)	(5: D6S471-D6S393)	ribosomal protein
KU-BL-40	1.5	1	Pyruvate dehydrogenase-alpha subunit (J03503)	(10q11.2; D10S604-D10S220)	metabolic enzyme
KU-BL-41	0.8	1	Ribosomal protein L19 (X63527)	Hs.87268	ribosomal protein
KU-BL-42	0.7	1	Ribosomal protein L37a (AA548296)	(19q13.4; D19S418-qTEL)	metabolic enzyme
KU-BL-43	0.9	1	Ribosomal protein S6 (X67309)	Hs.1023	ribosomal protein
KU-BL-45	2.3	1	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (A1074259)	(Xp22.2-p22.1)	metabolic enzyme
KU-BL-46	0.8	1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U (AL049570)	(5: D6S498-D6S408, 17q11)	receptor-like protein
KU-BL-48	2	2	Finch protein (U09284)	Hs.184109	elimination of senescent cells
				(2: D2S164-D2S163, D2S137-D2S164)	
				(9p21; D9S1808-D9S162)	
				Hs.469	
				(5p15; DTEL-D6S678)	
				Hs.19718	
				(1p35.1-35.3; DIS2843-D1S417)	
				Hs.112378	
				(2; D2S293-D2S121)	

【 0 0 4 4 】

【 表 3 】

クローン名	サイズ (kb)	単離されたクローン数	同一性 (GenBank, アクセッション番号)	Unigeneクラスター (染色体; 位置)
KU-BL-1	1.7	2	EST (AI075753)	putative lipoic acid synthetase Hs. 53531
KU-BL-3	3.2	8	EST (AI377951)	Hs. 26481 (7; D7S629-D7S673, D7S493-D7S629)
KU-BL-4	2.7	7	KIAA0603 (AB011175)	Hs.173802
KU-BL-15	2.4	2	KIAA0782 (AB018325)	Hs.21264 (11; D11S913-D11S916)
KU-BL-19	1.4	1	EST (AA360104)	none
KU-BL-22	0.9	1	EST (AA167526)	Hs173259 (6;D6S442-D6S1581)
KU-BL-31	1.7	1	EST (W81295)	Hs.7807 (2;D2S388-D2S113)
KU-BL-33	1.7	1	EST (H03139)	Hs.24683
KU-BL-34	0.7	1	EST (AL047740)	none
KU-BL-36	0.8	1	novel gene none	none
KU-BL-39	1	1	EST (A1133640)	Hs.75442 (4q11-q13; D4S392-D4S2947)
KU-BL-44	2	1	human DNA sequence (AL031595)	Hs.8836 (22; D22S272-D22S274)
KU-BL-47	1	1	EST (T06548)	Hs.45109 (12; D12S78-D12S79)

【0045】48種類の抗原遺伝子のうち、以下の11種類の抗原遺伝子が癌と関連がある可能性があった。KU-BL-4/KIAA0603は頻回に単離されたクローンで、その全長と考えられるKIAA0603はtbc1ドメインを有していた。tbc1遺伝子はtre-2 oncogene、BUB2、cdc16などの有糸分裂 (mitosis) と関連のある遺伝子とホモロジーを持っていた。KU-BL-5/Golgin-84はRET protooncogene tyrosin kinase domainと組み換えを起こしてRET-II oncogeneを形成する遺伝子であった。KU-BL-6/alpha-enolaseは正常細胞にもubiquitousに存在するタンパクであるが、ある癌腫では癌細胞の産生する産物としても報告されている。また癌細胞から産生された - エノラーゼに対する抗体は、cancer-associated retinopathy syndromeの標的抗原であると言われている。KU-BL-7/67 kD laminin receptor 1は癌の浸潤、転移に関係する分子である。肝細胞癌においては67 kD laminin receptor 1を含む数種のlaminin receptorの発現は癌の進展と予後と相関があると報告されている。KU-BL-8/mitosinは細胞周期における増殖期にのみ発現されるタンパクであり、G0期においては発現されない。乳癌においては、mitosinの発現がフローサイトメトリーにおけるS-phase fractionの増加と正の相関があり、免疫染色でmitosinが強い発現を認めることは、癌の再発の予測因子であると報告されている。それ故、mitosinは癌組織のように多くの増殖期細胞が含まれている組織の場合には高発現しているのではないと思われる。

【0046】KU-BL-9/PM5 protein は前立腺癌

細胞株LNCaPにおいて、発現の低下が癌の進展に関与している可能性がある。KU-BL-12/alpha-actinin 4は細胞骨格の一部をなすタンパクであり、細胞の不死化と癌の浸潤に関与している可能性がある。乳癌においては、alpha-actinin 4が細胞質に存在することは、浸潤性の組織型、ひいては予後の不良を示唆する因子である。KU-BL-14/LBc protooncogeneはoncogeneではないが、oncogeneに反応して産生されたIgG抗体が交叉反応を起こして検出された可能性がある。LBc protooncogeneはchromosome 5に位置するがonco-LBcはLBc proto-oncogeneのN末端がchromosome 7に由来する短いC末端に置き換わることによって活性化されると報告されている。KU-BL-27/thrombospondin-1は細胞膜外のglycoproteinsであり、細胞接着、不老化細胞増殖、血管新生などに関与している。食道扁平上皮癌において癌の間質にthrombospondin-1が染色されることは高い臨床病期 (high clinical stage)、リンパ節転移、脈管侵襲があることと相関している。KU-BL-37/annexinVIIIは急性前骨髄性白血病やその他の血球系の悪性腫瘍において発現が高いと報告されている。

【0047】さらに未知の抗原遺伝子に関してはデータベース上のDNAクラスター (ESTなど) が由来する組織から推定してユニークな発現パターンが予想されるものがいくつかあった。KU-BL-1は、完全あるいはほぼ完全に一致するESTが胎児性組織 (胎児心臓: W76202、胎児: AI075753)、精巣腫瘍 (AI341095)、メラノサイト (N24845)、ヒト以外の生物 (Bos taurus: A

W346393、Sus scrofa : AW619434、mouse : AW743984) などに存在し、特異な発現パターンが予想された。ORF (Open reading frame) の5 側と一致するESTにはUnigeneは存在しなかった。さらにKU - BL - 3 / EST (Drosophila ring canal proteinと相同性がある分子) が一致するDNAクラスターは、胎児性心臓と精巣を混合したcDNAライブラリー (AI377951)、メランノサイトと妊娠子宮と胎児性心臓を混合したライブラリー (AA478899)、精巣腫瘍 (AI954716)、肺癌 (AI829079) 等の胎児性組織、癌組織、及び限られた正常組織であった。なお、KU - BL - 3のUnigene番号はHs. 26481であった。

【0048】 [検出抗原における構造上の変化に関する検討] 単離された48の抗原遺伝子の塩基配列を検討した結果、KU - BL - 4 / KIAA0603、KU - BL - 5 / golgin-84、KU - BL - 10 / EBNA-2 coactivatorの3つの抗原遺伝子が、データベース上の配列と一部異なっていることが確認できた。KU - BL - 4 / KIAA0603は、患者Aの正常組織 (末梢血リンパ球) から抽出したmRNAを用いたRT - PCRとシーケンシングによる検討から、本患者の正常組織にも同様の変化が認められ癌化に伴う構造上の変化ではないことが明らかになった。KU - BL - 5 / golgin-84は前記のようにRETprotooncogeneと組み換えを起こしてRET oncogeneを形成する遺伝子であるが、一つの塩基配列がデータベース上の塩基配列と異なりGGTからGCTとなっていた。これはコドン67をGlyからAlaに変化させる。しかしこの変化は患者Aの正常細胞 (末梢血リンパ球) から作製したcDNAの塩基配列においても同様の変化を認めた。このことから、この変化は突然変異によるものではなく、対立遺伝子の多型 (allelic polymorphism) による可能性が高いと思われる。また、KU - BL - 10 / EBNA-2 coactivatorはN末端の250のアミノ酸 (コドン1 ~ 250) が既存のアミノ酸配列と比較すると欠落していた。この変異遺伝子に特異的なセンスプライマーを作製し、自己末梢血リンパ球やその他の正常組織のRNAを用いてRT - PCR法を行ったところ、この配列の欠落は正常細胞にも存在することがわかった。以上のことから、これらの変化と癌の関連性は少ないと考えられる。

【0049】 [健常人血清及び癌患者血清中の各単離抗原に対するIgG抗体の検出] 上記得られたファージクローンと、インサートが入っていない陰性コントロールファージ (cDNAインサートが挿入されていないファージ) とを1 : 1の割合で発現するようにそれぞれを混合し、15cmNZYアガロースプレートに計1 × 10⁴個 (単離クローン5 × 10³個とコントロールファージ5 × 10³個) のクローンを播き、15cmのニトロセルロースメンブレンにタンパクをトランスファーした

後、そのメンブレンを10枚にカットして以下のスクリーニングに用いた。なお、健常人および膀胱癌患者の血清は、TBSと5%の脱脂粉乳の混合液で100倍に希釈しスクリーニングを行った。

【0050】 文献的考察や一致するDNAクラスターの由来する組織の検討から、膀胱癌抗原候補遺伝子として、48種類の抗原遺伝子中36種類の抗原遺伝子が選ばれた。血清反応において、まず健常人血清中に抗体が存在するかどうかを上記スクリーニングにより検討した。なお、健常人血清は、採血時に健康体であり、自己免疫疾患の既往を有しない平均年齢27.8才の16例 (男性9例、女性7例) のボランティアから採血し、前記のように吸着処理した血清を用いた。この結果、36クローン中12クローンは、複数の健常人血清中の抗体と反応することがわかった。これらのクローンはその後の検討から除外した。健常人血清中に抗体が存在することが、癌との関連を必ずしも否定するものではないが、本研究においては複数の健常人患者血清と反応するクローンはその後の検討から除外した。ただし、健常人血清16例中1例のみに抗体を認めるクローン (KU - BL - 8及びKU - BL - 33) に関しては、文献上で癌との関連が散見されるなどの理由からその後の検討を行った。

【0051】 健常人血清を用いてスクリーニングされたクローンに対して、前記患者以外の27例の膀胱癌患者の血清中における抗体の存在を上記と同様の方法で調べた。IgG抗体の存在を検討した結果のうち19クローンについての結果を表4に示す。24クローン中13クローンは前記患者以外の膀胱癌患者の血清中における抗体と反応し、残り11クローンにおいては一次スクリーニングに用いた前記患者の血清中の抗体にのみ反応していた。最も多くのクローンが検出されたKU - BL - 3 (8クローンは、一次スクリーニングにより膀胱癌患者血清28例中8例 (28.6%) において抗体が検出された。KU - BL - 3に対する抗体の産生は、ある程度の割合で膀胱癌患者血清中に起こっているものと考えられ、KU - BL - 3の免疫原性が示唆された。前記患者以外の患者血清中に抗体が検出された13クローンのうち、5クローン (KU - BL - 4 / KIAA0603、KU - BL - 6 / alpha-enolase、KU - BL - 7 / laminin receptor、KU - BL - 8 / mitosin、KU - BL - 9 / PM5 protein) は癌との関連が示唆された。これら5つの抗原は、癌細胞に高発現し、発現量が高いために免疫系が反応して抗体が産生された可能性がある。またKU - BL - 1は28例中2例の膀胱癌患者血清中に抗体が検出されたが、健常人血清中には検出されなかった。

【0052】

【表4】

クローン名	同一性	健常人 (n=16)	膀胱癌 患者 (n=28)	前立腺癌 患者 (n=14)	メラノーマ 患者 (n=10)	脳腫瘍 患者 (n=10)	膵癌 患者 (n=10)	腎細胞癌 患者 (n=10)	食道癌 患者 (n=10)	大腸癌 患者 (n=7)	精巣腫瘍 患者 (n=6)
KU-BL-1	EST	0/16	2/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-2	Tat-CT1	0/16	2/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-3	EST	0/16	8/28	0/14	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-4	KIAA0603	0/16	3/28	1/14	0/10	1/10	0/10	0/10	1/10	0/7	0/6
KU-BL-5	Golgin-84	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-6	alpha-enolase	0/16	4/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-7	67kD laminin receptor 1	0/16	3/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-8	Mitotin	1/16	5/28	1/14	1/10	1/10	4/10	0/10	0/10	1/7	1/6
KU-BL-9	PM5 protein	0/16	5/28	0/14	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-10	EBNA-2 coactivator	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-11	HSP 70-1	0/16	4/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-12	alpha-actinin4	0/16	1/28	0/14	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10	1/7	0/6
KU-BL-13	High density lipoprotein binding protein	0/16	4/28	0/14	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-14	Lbc protooncogene	0/16	1/28	2/14	0/10	0/10	0/10	3/10	1/10	0/7	0/6
KU-BL-16	NC2 alpha-subunit	0/16	2/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-18	Kinectin 1	0/16	2/28	1/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-20	STE20-like kinase	0/16	1/28	3/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-22	EST	0/16	3/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-33	EST	1/16	1/28	0/14	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/7	0/6

【0053】また、メラノーマ10例、脳腫瘍10例、膵癌10例、食道癌10例、腎細胞癌10例、前立腺癌14例、大腸癌7例、精巣腫瘍6例の血清を使用し、膀胱癌以外の癌患者血清における単離抗原に対するIgG抗体の検出も行った(表4)。これらの血清中に抗体が存在したクローンは少なかった。しかし、KU-BL-8/mitosinとKU-BL-14/Lbc protooncogeneは膀胱癌以外の数種の癌患者血清中に抗体を認めた。KU-BL-8/mitosinは14例中1例の前立腺癌患者血清、10例中1例のメラノーマ患者血清、10例中1例の脳腫瘍患者血清、10例中4例の膵癌患者血清、7例中1例の大腸癌患者血清、6例中1例の精巣腫瘍患者血清中に抗体を認め、さらに16例中1例の健常人血清中にも抗体を認めた。また、KU-BL-14/Lbc protooncogeneは14例中2例の前立腺癌患者血清、10例中3例の腎細胞癌患者血清、10例中1例の膵癌患者血清中に抗体を認めたが、健常人血清中においては抗体の存在は認められなかった。以上のことから、膀胱癌以外の癌患者血清中の抗体とも反応する抗原遺伝子は、膀胱癌以外の癌腫においても免疫系が認識しており、膀胱癌以外の抗原になりうるものと思われる。

【0054】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのRT-PCR法]健常人血清中に比較的高頻度(16例中2例以上)に抗体を認めた抗原を除いた24種類の抗原遺伝子の各組織における発現特異性をRT-PCR法により調べてみた。正常組織、培養増殖細胞及び培養癌細胞株から抽出したRNAを用いてcDNAのパネルを作製しRT-PCR法を行った。脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、平滑筋、肺、精巣、胎盤、胃、大腸などの正常組織の全RNAはクローンテック社(Palo Alto, CA)から購入した。正常膀胱組織はインビトロジェン社(Carlsbad, CA)から購入した。膀胱癌細胞株(FY, KU1, KU7, KU19-19, NBT, T24)、増殖細胞(培養線維芽細胞、腫瘍浸潤T細胞; TIL1364、EBウイルス感染B細胞; 1088EBV-B)、膀胱癌以外の培養癌細胞株[脳腫瘍(U8

7-Mo)、メラノーマ(SKmel23)、慢性骨髄性白血病(K-562)、急性骨髄性白血病(HL-60)、食道癌(TE8)、腎細胞癌(KU-19-20)、前立腺癌(PC3)、肺癌(K1S)、膵癌(PK1)]をそれぞれ $0.5 \sim 1.0 \times 10^8$ 個になるまで培養し、グアニジン-塩化セシウム超遠心法により全RNAを抽出した。

【0055】上記全RNAを各5μgづつ使用し、逆転写酵素Super Script II reverse transcriptase(GIBCO/BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)と、オリゴ(dT)プライマーを用いてcDNAのパネルを作製した。一次スクリーニングで得られたクローンの塩基配列より300~700bpのPCR産物が出来るように特異的なプライマーを設計し、反応酵素にEx-Taq(Takara)を使用し、熱変性94℃で1分間、アニーリングはそれぞれのプライマーの至適温度で2分間、伸長反応72℃で2分間という条件で25サイクルのPCRを行った。アニーリング温度はプライマーの至適Tm値を考慮して設定した。

【0056】KU-BL-1には、センスプライマー(5'-GGA AAT GTC TCT ACG CTG CG-3:配列番号5)と、アンチセンスプライマー(5'-AAC ATG ATC GTG GCT GTG GC-3:配列番号6)を作製し399bpのバンドを検出した。アニーリング温度は62.5℃とした。コントロールのアクチンには、センスプライマー(5'-ATCTGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTGCG-3:配列番号7)、アンチセンスプライマー(5'-CGT CATACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3:配列番号8)を作製し、熱変性94℃で30秒間、アニーリング68℃で2分間、伸長反応72℃で2分間にて25サイクルのPCRを行い、838bpのバンドを検出した。なお、KU-BL-2には、センスプライマー(5'-GGG AGG TGT AGA GAA CAG A

T-3 : 配列番号9)と、アンチセンスプライマー(5-TCT TCT TCC TCC TCTTC C TC-3 : 配列番号10)を、KU-BL-3には、センスプライマー(5-GGT GGA GAA GAG CAG CAA GAA G-3 : 配列番号11)と、アンチセンスプライマー(5-GGT CCT CTG GAG ACA GTA GAT G-3 : 配列番号12)を、KU-BL-8には、センスプライマー(5-ACA GAT GAA CTC AGA CCT GC-3 : 配列番号13)と、アンチセンスプライマー(5-AGA GCT TGC TGC ACT GTC T-3 : 配列番号14)を、KU-BL-19には、センスプライマー(5-AGA GAA AAGTCG CGT GCC CT-3 : 配列番号15)と、アンチセンスプライマー(5-GGC GAG CTT TGT GTT TGC TC-3 : 配列番号16)を用いてPCRを行った。

【0057】上記得られたPCR産物の解析には3%のアガロースゲル電気泳動法を用い、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。その結果、ほとんどの単離した抗原遺伝子は正常組織にも広く発現を認めた。しかし、5種類の抗原遺伝子(KU-BL-1/EST、KU-BL-2/Tat-CT1、KU-BL-3/EST、KU-BL-8/mitosin、KU-BL-19/EST)は膀胱癌細胞株、その他の癌細胞株、限られた正常組織にのみ発現を認めた。これらの5つのクローンにおけるRT-PCRの結果を表5に示す。また、RT-PCR法により特異的な発現パターンが認められた上記5種のクローンに関しては、上記と同じ条件で30サイクル及び35サイクルのPCRを行い、さらに膀胱癌組織23個のパネルにおいてもRT-PCR法を行い発現を検討した。特に有望と思われたKU-BL-1においては、各種癌のRT-PCRのパネルを広げて、メラノーマ11例、グリオーマ2例、肺癌6例、乳癌2例、腎細胞癌11例、膵癌6例、血球系悪性腫瘍(白血病とリンパ腫)4例、大腸癌7例、食道癌16例、胃癌3例、前立腺癌3例における検討を行った。

【0058】

【表5】

	KU-BL-1 (EST)	KU-BL-2 (Tat-CT1)	KU-BL-3 (EST)	KU-BL-8 (mitosin)	KU-BL-19 (EST)
正常組織					
脳	+	-	+	-	+
心臓	-	-	+	-	+
腎臓	-	-	+	-	+
脾臓	-	-	-	-	-
肝臓	-	-	-	-	-
小腸	+	-	+	-	+
平滑筋	+	-	+	-	-
肺	-	-	+	-	+
精巣	++	-	++	+	++
胎盤	-	-	+	-	+
胃	-	-	+	-	-
大腸	-	-	-	-	-
膀胱	+	-	-	-	-
増殖細胞					
EBV B 細胞	+	-	+	+	-
TIL	-	-	-	+	-
腺維芽細胞	-	-	+	+	-
癌細胞株					
U87-Mo	+	-	+	-	-
K1S	+	-	+	+	-
TE8	+	-	+	-	-
PK1	+	-	+	-	-
KU19-20	+	-	+	-	+
PC3	+	-	+	+	-
SK mel 23	+	-	+	-	-
HL60	+	-	+	-	-
K562	+	-	+	+	-
膀胱癌細胞株					
KU1	-	-	-	+	-
FY	++	+	+	++	+
NBT	-	-	-	+	-
KU7	++	++	+	+++	-
T24	++	-	++	++	+
KU19-19	++	+	+	+	-

【0059】上記の結果から、25サイクルのRT-PCRを行った場合、KU-BL-1は数種の正常組織において弱い発現が認められ、精巣においては強い発現が認められた。しかし、35サイクルのRT-PCRを行った場合では、ほとんどの正常組織においてKU-BL-1の発現が認められた。また、25サイクルのRT-PCRにおいて、KU-BL-1は6例中4例の膀胱癌

細胞株(FY, KU7, T24, KU19-19)で発現が認められ、その他の癌細胞株においても検討した全ての細胞株で発現が認められた。さらに、KU-BL-1は23例の膀胱癌組織のmRNAの全てにおいて発現が認められ、癌腫の種類をさらに広げたmRNAのパネルにおいてもKU-BL-1は多くの癌腫に高頻度に発現が認められた(表6)。

【0060】

* * 【表6】

癌種	ポジティブ/トータル
メラノーマ	10/11
グリオーマ	2/2
肺癌	6/6
乳癌	2/2
腎細胞癌	11/11
膵癌	1/6
血球系悪性腫瘍	3/4
大腸癌	5/7
食道癌	14/16
胃癌	3/3
前立腺癌	2/3
膀胱癌	23/23

【0061】KU-BL-2/Tat CT1は25サイクルのRT-PCRにおいて膀胱癌細胞株6例中3種類(FY, KU7, KU19-19)に発現していたが、正常組織や膀胱癌以外の癌で発現を認めなかった。しかし35サイクルでは、多くの正常組織に発現を認めた。また膀胱癌組織23例では19例に発現を認めた。KU-BL-3/ESTはRT-PCRにおいて、ほとんどの正常組織に発現を認めたが、特に精巣に強く発現していた。またKU-BL-3はほとんどの癌細胞株に発現を認め、また6種類の膀胱癌培養細胞株中4例(FY, KU7, T24, KU19-19)に発現を認めた。KU-BL-8/mitosinは25サイクルのRT-PCRにおいて、正常組織では精巣のみに発現を認めたが、その他の組織には認められなかった。またKU-BL-19/ESTも正常組織では精巣に強く、そのほかは限られた正常組織にのみ発現を認めた。

【0062】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのノーザンプロット法]上記の25サイクルのRT-PCRにおいて特異的な発現パターンが認められた5種のクローンに対して、ノーザンプロット法による検討を加えた。16の正常組織(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、子宮、小腸、大腸、末梢血リンパ球)のパネルに関しては、各組織由来のpoly A+ RNAが2µgずつ各レーンにプロットしてあるヒトマルチプルノーザンプロット(Human Multiple Northern Blot)I及びIV(クローンテック社製)を用いた。また、正常膀胱、膀胱癌細胞株(FY, KU1, KU7, KU19-19, NBT, T24)、膀胱癌組織のパネルに関しては、細胞株又は組織から抽出した全RNAを20µgずつ各レーンにプロットしたものをを用いた。これらの全RNAを、ホ

20 ルムアミドとホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン(Hybond-N+, Amersham Pharmacia biotech, Tokyo, Japan)にトランスファーした。

【0063】上記5種の遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法により長さ400~1000bpのDNA断片を作製し、このDNA断片をHigh Prime DNA Labeling Kit(Boehringer)を用いて³²Pでラベルした。ラベル化したこれらDNA断片をプローブとし、Quick Hyb(Stratagene, La Jolla, CA)をハイブリダイゼーションバッファーとして用い、Salmon sperm DNAとともに68で30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中68で2時間ハイブリダイゼーションした。メンブレンの洗浄は2×SSC、0.1%のSDSを用いて室温で15分間×2回、0.1×SSC、0.1%のSDSを用いて63で30分間×1回行った。放射性シグナルの検出はImaging Screen-K(35×43cm) autoradiography films(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)に露出させた後、Molecular Imager FX(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用いて行った。なお、プローブをはがした後、ヒト-アクチンcDNAコントロールプローブ(Clontech, Palo Alto, CA)を用いて、上記と同様にハイブリダイゼーションを行った。

【0064】上記のノーザンプロットの結果から、KU-BL-1は正常組織では精巣と膀胱に高い発現を認め、その他、心臓や肝臓に極々弱い発現を認めるのみであった。RT-PCRの結果と同様に、膀胱癌細胞株においては6例中4例に強い発現を認めた。また、膀胱癌組織においても全例に高い発現を認めた。なお、KU-BL-1のバンドは約1.7kbp前後に認められた

(図1)。KU-BL-2に関しては、正常組織に広く発現を認めたと、精巣での発現量が他の正常組織に比べ高かった。KU-BL-2のバンドのサイズは約3.7 kbpであった。膀胱癌細胞株に関しては6例中4例に高い発現を認めた。正常膀胱と膀胱癌組織の発現パターンの比較を行ったが膀胱癌組織により高い発現の傾向が見られた。

【0065】KU-BL-3は3.1~3.2 kbp、2.0 kbp、1.0 kbpにバンドを認めた。3.1~3.2 kbpのバンドは正常組織では心臓と精巣に強く発現し、その他の正常組織には極々弱く発現した。精巣のみに1.0 kbpのバンドが認め、すべての膀胱癌細胞株において2.0 kbpのバンドが認められた。3.1~3.2 kbpのバンドは、3つの細胞株(FY, KU7, KU-19-19)において認められた。膀胱癌組織との比較において、正常、癌組織いずれにも2.0 kbpにバンドを認めたが、3.1~3.2 kbpのバンドは膀胱癌組織のみに認められた。シーケンスの結果、KU-BL-3は3112 bpであったことからノーザンプロットの3.1~3.2 kbpのバンドがKU-BL-3と思われた。3.1~3.2 kbpのバンドは正常組織では限られた組織のみ強く発現するので、膀胱癌組織に発現が高くなることには何か意味があるのかもしれない。KU-BL-8/mitosinは正常組織においても広い発現が認められた。正常膀胱と膀胱癌組織との比較において膀胱癌組織に発現が高いのは、癌組織には有糸分裂期(mitotic phase)の細胞が多いことが原因だと思われる。KU-BL-19/ESTに関しては正常組織に広く発現を認め、発現の特異性は明らかではなかった。

【0066】[リアルタイム(Real time)PCRによるmRNAの発現量の比較]上記ノーザンプロットによる検討で癌に高発現する可能性があるKU-BL-2に関して、リアルタイムPCRを施行し、正常組織と癌組織との発現量の検討を行った。KU-BL-2フォワードプライマーとしては、5'-TCT TCC TAC ATT TCC CCG GA-3 (配列番号17)を、KU-BL-2リバースプライマーとしては、5'-GCA CTG CAG ACT GAG GA A CTG A-3 (配列番号18)を、KU-BL-2プロンプとして、5'-(FAM)AAG GA A GAG CAG TATATC GCC CAG TTC ACC-(TAMRA)-3を用いた。また、コントロールとしては-アクチンを用いた。-アクチンフォワードプライマーとしては、5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3 (配列番号19)を、-アクチンリバースプライマーとしては、5'-CAG CGG A AC CGC TCA TTG CCAATG G-3 (配列番号20)を、-アクチンプロンプとして

は、5'-(FAM)ATG CCC-X(TAMRA)-CCC CCA TGC CAT CCT GC GTP-3を用いた。これらのプライマーやプロンプは、Primer Expressソフトウェア(PE Biosystems, Foster city, CA)を用いて設計した。リアルタイムPCRの増幅プログラムとデータ解析にはABI Prism 7700 Sequence Detector System(PE Biosystems)を用いて行った。

【0067】1μlのKU-BL-2 cDNAを49 μlのマスターミックス(TagManバッファー、3.5 mMのMgCl₂、300 nMの上記各プライマー、200 mMのdATP、200 mMのdCTP、200 mMのdGTP、200 mMのdUTP、0.5 UのAmpliTaq Gold)に加えPCRを行った。PCRの条件は、UNG処理ステップとして50℃で2分間、rTth DNA Polymeraseによる逆転写反応の温度、時間設定として60℃で10分間、UNGの失活として95℃で10分間それぞれ行った後、95℃で15秒間熱変性し、それぞれのプライマーの至適温度で30秒間アニーリングするという条件で60サイクルのPCRを行った。各cDNAに対して、PCRの反応は2つのサンプルずつ行った。標準曲線を作製するために、それぞれのコントロールのcDNA(前記膀胱癌細胞株のRNAから作製したcDNA)のPCRを5段階希釈で行い、同時にPCRを行った。この結果、リアルタイムPCR法では正常膀胱と膀胱癌では発現量に差が認められた。

【0068】以上のことから、KU-BL-1及びKU-BL-3は膀胱癌の免疫治療のターゲット抗原、膀胱癌診断、予後を推定するマーカー等になる可能性があると考えられた。特に膀胱癌に特異性の高い腫瘍マーカーがない現在、KU-BL-1はmRNAの発現パターンが特異的であり、主に癌細胞に高い発現を認め、膀胱癌における発現頻度も高いことから、単離、同定された抗原遺伝子の中で、抗原特異的な免疫治療に応用しうる膀胱癌抗原として最も有力な分子であると考えられる。正常精巣ではMHC-クラスI分子が発現していないことから、抗原特異的免疫療法の際に副作用を生じる問題はないと考えられる。また、正常膀胱に発現を認めるが、KU-BL-1を免疫治療に応用したときにCTLが膀胱自体を攻撃したとしても生命に関わる副作用は起きにくいのではないかと考えられる。膀胱に対して根治手術(radical operation)後であればもちろん副作用は問題にならない。

【0069】[5'-RACE法によるKU-BL-1の同定と構造の解析]上記単離したKU-BL-1のクローンには、5'側においてORFがまだ完結していなかったことから、全長cDNAを単離するために5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)法を行った。5'-RACEのキットとしてMarathon TM cDNA

amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を用いた。膀胱癌細胞株 F Y から抽出した 1 μg の poly(A)+ RNA をテンプレートとして、少し変更を加えた oligo(dT) プライマーとトリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) の逆転写酵素を用いて第 1 鎖 cDNA を合成した。

【0070】第 2 鎖 cDNA の合成には大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (Escherichia coli DNA polymerase I)、RNase H 及び DNA リガーゼを混合し用いた。2 本鎖 cDNA は T4 DNA ポリメラーゼにより末端を平滑化し、次に T4 DNA リガーゼを用いて Marathon cDNA adaptor 1 (5'-CTA ATA CGACT C ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCGGG CAG GT-3 : 配列番号 21) を 5' 末端に付加し、cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーをテンプレートにして、アダプタープライマー (AP1: 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCACTA CTA TAG GGC-3 : 配列番号 22) と KU-BL-1 に特異的なプライマー GSP1 (5'-TCG TGG CTG TGG CGGTGG CAT ATT CT C C-3 : 配列番号 23) を用いて PCR を行った。PCR の条件は、94 × 30 分間、94 × 5 秒間、68 × 4 分間を 5 サイクル、94 × 5 秒間、70 × 4 分間を 5 サイクル、94 × 5 秒間、72 × 4 分間を 2.5 サイクル、最後に 72 × 4 分間を 1 サイクル行った。

【0071】上記得られた PCR 産物 5 μl を 1% のアガロースゲル中で泳動し、エチジウムブロマイドで染色すると非特異的なバンドも検出されたことから、残りの PCR 産物をトリシン-EDTA 緩衝液 (10 mM のトリシン、0.1 mM の EDTA) で 50 倍に希釈し、これをテンプレートにアダプタープライマー 2 (AP2: 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3 : 配列番号 24) と KU-BL-1 に特異的なプライマー GSP2 (5'-GGC ATA TTC TCC ACC TCC CCA ACA CTC-3 : 配列番号 25) を用いて nested PCR を行い、特異的なバンドを検出した。KU-BL-1 に特異的と思われるバンドを 1% のアガロースゲルより切り出し、PCR 産物を精製した後、pGEM-T (Promega Inc., Madison, WI, USA) を用いて TA クローニングを行った。コロニー PCR (Colony PCR) を行い、目的の長さのインサートのクローンを確認し、インサートの塩基配列を決定した。

【0072】上記の結果、KU-BL-1 のコードする cDNA の長さは 1668 bp であった。これはノーザンプロットによるバンドの長さ (1.6 ~ 1.7 bp) と一致していた。この cDNA の塩基配列および ORF のアミノ酸配列を図 2 に示す。ORF は 81 ~ 1196 bp であり、81 bp に始まるメチオニンは GXXAT

GT の Kozak rule を満たしていた。また、9 ~ 111 bp にストップコドン (TAA) が認められた。KU-BL-1 は 372 のアミノ酸からなるタンパクであると考えられた。塩基配列のホモロジー検索において、859 ~ 1611 bp の部分配列はヒトの推定の lipoic acid synthetase の部分配列 (GenBank アクセション番号: AJ224162、Unigene 番号: 53531) とほぼ一致しており、アミノ酸配列 (261 ~ 372) においても完全に一致していた。また、ヒトの EST に関しては、胎児心臓に由来する EST (W76202) と、KU-BL-1 の部分配列 (618 ~ 1106 bp) が一致していた。しかし、これより 5' 側に関しては、ホモロジーのある EST は存在するものの、多くはヒト以外動物の組織に由来するものであった。

【0073】また、アミノ酸配列によるホモロジー検索も行って見た。その結果、KU-BL-1 と最も相同性のある分子は *Drosophila melanogaster* の CG5231 protein (GenBank アクセション番号: AAF51596) であり、アミノ酸配列で 65% のホモロジーがあった。しかし、この分子の機能に関する情報は得られなかった。また、KU-BL-1 は、*Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母) の probable lipoic acid synthetase (013642) と 59%、*Schizosaccharomyces pombe* の lipoic acid synthetase precursor (BAA21430) と 26.5 アミノ酸の長さにおいて 67%、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母の一種) の lipoic acid synthetase, Lip5p (NP#014839) と 56% の相同性を有していた。

【0074】上記塩基配列及びアミノ酸配列のホモロジー検索結果から、KU-BL-1 は種々の lipoic acid 恐らくヒトの lipoic acid synthetase のひとつであると考えられる。特徴的なアミノ酸配列としては、Cys (137)、Cys (141)、Cys (144) の 3 つのシスチンの組み合わせが上げられる (図 2 の下線部)。これは CXXXCXXC を満たす配列であり、金属結合部位 (metal-binding site) を示唆する配列 (iron-sulfur cluster) であり、過去に報告された lipoic acid synthetase において共通して存在するものであることがわかった。これは sulfur を lipoic acid に取り入れることに関与していると考えられる。図 3 に KU-BL-1 と、*Schizosaccharomyces pombe* の probable lipoic acid synthetase と、*Saccharomyces cerevisiae* の lipoic acid synthetase との相同性を示す。このことから、KU-BL-1 は、いずれの lipoic acid synthetase とも高い相同性を示しており、いずれ配列にも CXXXCXXC の配列が保存されていた (図中の * 印の部分)。

【0075】

【発明の効果】本発明によると、膀胱癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膀胱癌抗原や、それをコードする遺伝子等を提供することができる。

【0076】

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY
 <120> Human Bladder Cancer Anti
 gens
 <130> 000000100
 <140>
 <141>
 <160> 25

 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1693
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (81)..(1199)
 <400> 1
 gagcgacgta atttcgacct gtcctttccc ggga
 gttagc gatccctcaa ccctgcact 60
 gcgctagtcc taaagaggaa atg tct cta cgc
 tgc ggg gat gca gcc cgc acc 113
 Met Ser Leu Arg Cys Gly Asp
 Ala Ala Arg Thr
 1 5 10
 ctg ggg ccc cgg gta ttt ggg aga tat ttt
 tgc agc cca gtc aga ccg 161
 Leu Gly Pro Arg Val Phe Gly Arg Tyr Phe
 Cys Ser Pro Val Arg Pro
 15 20 25
 tta agc tcc ttg cca gat aaa aaa aag gaa
 ctc cta cag aat gga cca 209
 Leu Ser Ser Leu Pro Asp Lys Lys Lys Glu
 Leu Leu Gln Asn Gly Pro
 30 35 40
 gac ctt caa gat ttt gta tct ggt gat ctt
 gca gac agg agc acc tgg 257
 Asp Leu Gln Asp Phe Val Ser Gly Asp Leu
 Ala Asp Arg Ser Thr Trp
 45 50 55

 gat gaa tat aaa gga aac cta aaa cgc cag
 aaa gga gaa agg tta aga 305
 Asp Glu Tyr Lys Gly Asn Leu Lys Arg Gln
 Lys Gly Glu Arg Leu Arg
 60 65 70 75

 cta cct cca tgg cta aag aca gag att ccc
 atg ggg aaa aat tac aat 353
 Leu Pro Pro Trp Leu Lys Thr Glu Ile Pro
 Met Gly Lys Asn Tyr Asn

gat gcc agt gag ccc tac aat act gca aag
gca att gca gaa tgg ggt 593
Asp Ala Ser Glu Pro Tyr Asn Thr Ala Lys
Ala Ile Ala Glu Trp Gly
160 165 170

ctg gat tat gtt gtc ctg aca tct gtg gat
cga gat gat atg cct gat 641
Leu Asp Tyr Val Val Leu Thr Ser Val Asp
Arg Asp Asp Met Pro Asp
175 180 185

ggg gga gct gaa cac att gca aag acc gta
tca tat tta aag gaa agg 689
Gly Gly Ala Glu His Ile Ala Lys Thr Val
Ser Tyr Leu Lys Glu Arg
190 195 200

aat cca aaa atc ctt gtg gag tgt ctt act
cct gat ttt cga ggt gat 737
Asn Pro Lys Ile Leu Val Glu Cys Leu Thr
Pro Asp Phe Arg Gly Asp
205 210 215

ctc aaa gca ata gaa aaa gtt gct ctg tca
gga tta gat gtg tat gca 785
Leu Lys Ala Ile Glu Lys Val Ala Leu Ser
Gly Leu Asp Val Tyr Ala
220 225 230 2

35
cat aat gta gaa aca gtc ccg gaa tta cag
agt aag gtt cgt gat cct 833
His Asn Val Glu Thr Val Pro Glu Leu Gln
Ser Lys Val Arg Asp Pro
240 245 250

cgg gcc aat ttt gat cag tcc cta cgt gta
ctg aaa cat gcc aag aag 881
Arg Ala Asn Phe Asp Gln Ser Leu Arg Val
Leu Lys His Ala Lys Lys
255 260 265

gtt cag cct gat gtt att tct aaa aca tct
ata atg ttg ggt tta ggc 929
Val Gln Pro Asp Val Ile Ser Lys Thr Ser
Ile Met Leu Gly Leu Gly
270 275 280

gag aat gat gag caa gta tat gca aca atg
aaa gca ctt cgt gag gca 977
Glu Asn Asp Glu Gln Val Tyr Ala Thr Met
Lys Ala Leu Arg Glu Ala
285 290 295

gat gta gac tgc ttg act tta gga caa tat
atg cag cca aca agg cgt 1025
Asp Val Asp Cys Leu Thr Leu Gly Gln Tyr
Met Gln Pro Thr Arg Arg
300 305 310 3

15

```

tccagcctgg gtgacaagag caaaactcca tctc
aaataa ataaaaagga aaaaaaagtc 1639
aataaactgt acaaatttaa ttacagtaaa aaaa
aaaaaa aaaaaaaaaa aaaa      1693
<210> 2
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Ser Leu Arg Cys Gly Asp Ala Ala Arg
Thr Leu Gly Pro Arg Val
      1          5          10          15
Phe Gly Arg Tyr Phe Cys Ser Pro Val Arg
Pro Leu Ser Ser Leu Pro
              20          25          30
Asp Lys Lys Lys Glu Leu Leu Gln Asn Gly
Pro Asp Leu Gln Asp Phe
              35          40          45
Val Ser Gly Asp Leu Ala Asp Arg Ser Thr
Trp Asp Glu Tyr Lys Gly
              50          55          60
Asn Leu Lys Arg Gln Lys Gly Glu Arg Leu
Arg Leu Pro Pro Trp Leu
      65          70          75          80

Lys Thr Glu Ile Pro Met Gly Lys Asn Tyr
Asn Lys Leu Lys Asn Thr
              85          90          95
Leu Arg Asn Leu Asn Leu His Thr Val Cys
Glu Glu Ala Arg Cys Pro
              100          105          110
Asn Ile Gly Glu Cys Trp Gly Gly Gly Glu
Tyr Ala Thr Ala Thr Ala
              115          120          125
Thr Ile Met Leu Met Gly Asp Thr Cys Thr
Arg Gly Cys Arg Phe Cys
              130          135          140
Ser Val Lys Thr Ala Arg Asn Pro Pro Pro
Leu Asp Ala Ser Glu Pro
      145          150          155          1
60
Tyr Asn Thr Ala Lys Ala Ile Ala Glu Trp
Gly Leu Asp Tyr Val Val
              165          170          175
Leu Thr Ser Val Asp Arg Asp Asp Met Pro
Asp Gly Gly Ala Glu His
              180          185          190
Ile Ala Lys Thr Val Ser Tyr Leu Lys Glu
Arg Asn Pro Lys Ile Leu
              195          200          205
Val Glu Cys Leu Thr Pro Asp Phe Arg Gly
Asp Leu Lys Ala Ile Glu
      210          215          220

```

340 345 350
 Tyr Lys Ala Gly Glu Phe Phe Leu Lys Asn
 Leu Val Ala Lys Arg Lys

355 360 365
 Thr Lys Asp Leu

370

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:T3

<400> 3

aattaaccct cactaaaggg

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:T7

<400> 4

gtaatacgac tcacataggg c

21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:KU-BL-1 Sense

Primer

<400> 5

ggaaatgtct ctacgctgcg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:KU-BL-1

Antisense Primer

<400> 6

aacatgatcg tggctgtggc

20

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-actin
Antisense Primer
<400> 8
cgtcatactc ctgcttgctg atccacatct gc
32

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-2 Forward
Primer
<400> 9
tcttcctaca tttccccgga
20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-2 Sense
Primer
<400> 10
gggaggtgta gagaacagat
20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-2
Antisense Primer
<400> 11
tcttcttctt cctcttctc
20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-3 Sense
Primer

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-3
Antisense Primer
<400> 13
ggtcctctgg agacagtaga tg
22
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-8 Sense
Primer
<400> 14
acagatgaac tcagacctgc
20
<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-8
Antisense Primer
<400> 15
agagcttgct gcactgtct
19
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-19 Sense
Primer
<400> 16
agagaaaagt cgcgtgccct
20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-19
Antisense Primer
<400> 17
ggcgagcttt gtgtttgctc
20
<210> 18

gcactgcaga ctgaggaact ga
22

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-actin
Forward Primer
<400> 19
tcaccacac tgtgccatc tacga
25

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-actin
Reverse Primer
<400> 20
cagcgaacc gctcattgcc aatgg
25

<210> 21
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Marathon cDNA
adaptor 1
<400> 21
ctaatacgac tcaactatagg gctcgagcgg ccgc
ccgggc aggt 44

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:AP1
<400> 22
ccatcctaatac gactcact actatagggc
30

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:GSP1
<400> 23

<400> 24
 actcactata gggctcgagc ggc
 23

<210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:GSP2
 <400> 25 38
 ggcatttct ccacctcccc aacactc

39

【図面の簡単な説明】

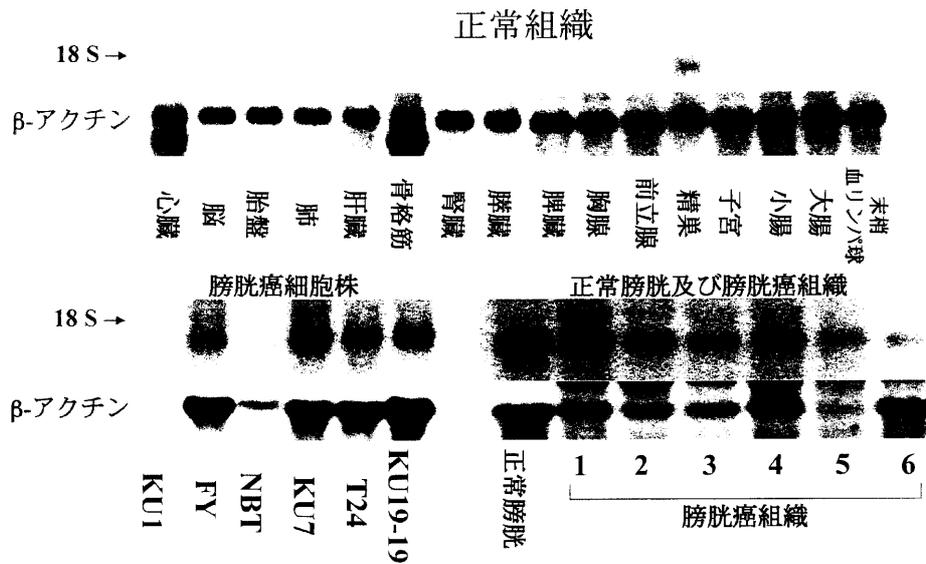
27

【図1】本発明のヒト膀胱癌抗原KU-BL-1 mRNA発現をノーザンプロットにより調べた結果を示す図である。

【図2】本発明のヒト膀胱癌抗原KU-BL-1のDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図3】本発明のヒト膀胱癌抗原KU-BL-1と他のlipoic acid synthetase とのアミノ酸配列の比較結果を示す図である。

【図1】



【図3】

KU-EL-1 M SL RC GD AA RT LG PR VF GR YF CS FV RP LS SL PD KK 35

KU-EL-1 KE LD NS FD LQ DFVS - ED LA DR ST WD - E Y 62
 SCLAS EK LA KG PS FAD FLNM DKP LFA DEA FELDR 57
 LIP 5 ED LA NS FD LQ DFVS - EK LA SK MI LD - P L 107

KU-EL-1 KS NL KR QK GE R L LP WL KT E FM JK NY NK 92
 SCLAS KV EL PNGS IHK R LP WL KT VE LG T NF NR 86
 LIP 5 - ERARQNT EAK KL ER WL KV FL EK ET N Y HK 136

KU-EL-1 LKN TL RN LN LHTV C EE AR CP NIG EC WG G S E 122
 SCLAS IK H LN RS SH LHTV C EE AK CP NIG EC WG G K D 116
 LIP 5 LK S D V K EL S L HTV C EE AR CP NIG EC WG G K D 166

KU-EL-1 YAT T A T I M L M G D T C T R G C R F C S V K T A R N P 152
 SCLAS KSR A T A T I M L M G D T C T R G C R F C S V K T S R R P 146
 LIP 5 KSR A T A T I M L M G D T C T R G C R F C S V K T N R P 196

KU-EL-1 PE L DA SE PY NT AK A IA EW GL V V LT S V DR 182
 SCLAS GE L D P NE PE NT AE A IK QW LS V V LT S V DR 176
 LIP 5 SK P D P ME PE NT AE A IK RW GL V V LT S V DR 226

KU-EL-1 DD M DD GG AE HI AK T V S Y LK ER NE K LL VE L 212
 SCLAS DD L TD LS AN HI AK TH Q IK EK AE H LL VE A L 206
 LIP 5 DD L VD GG AN HI AE T VR K IK Q K AE N TL VE P L 256

KU-EL-1 TP D F R G D L K A IE K V A S G L D V Y A H N V E T V 242
 SCLAS TP D F S ER M D L VE I V AK S G L D V F A H N V E T V 236
 LIP 5 SG D F R G D L K M V D I MA Q C G L D V Y A H N L E T V 286

KU-EL-1 EL Q S K V R DP R AN F DS LR VL K H AK V Q ED V 272
 SCLAS EL P P F V R DR R AN F RS LS VL K H V K K Q CH L 266
 LIP 5 SL T P H V R DR R AN F RS LS V LE RA KA T VE S L 316

KU-EL-1 IS K T S I M L G L G EN DE Q V Y AT M KA LR EA DV D 302
 SCLAS IP K T S I M L G L G EP DA E I L TT L K D LE H NV D 296
 LIP 5 IP K T S I M L G L G EP DE Q T Q EL K D LR N I Q CD 346

KU-EL-1 CL L EQ Y M P TR R H L K V E Y H TE E K F K Y WE 332
 SCLAS VV EF EQ Y MR P TR R H L K V Q E Y H TE E K F E Y WK 326
 LIP 5 VV EF EQ Y MR P TR R H M K V Q E Y H TE E K F D Y WK 376

KU-EL-1 KV G NE LG FH Y IP AS G PL VR SS YK AGE F L KN 362
 SCLAS RV A E KL GF Y IP AS G PL VR SS YK AGE F M EN 356
 LIP 5 ER AL EM FL Y IP AS G PL VR SS YK AGE F IT EN 406

KU-EL-1 LV AK RK TK D L 372
 SCLAS LL KK RS GN PA SM SV 370
 LIP 5 VL KK RN MK 414

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト ¹ (参考)
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 16/32	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/82		19/00	4 C 0 8 5
16/32		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
19/00		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		21/08	
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
21/08		33/50	Z
C 1 2 Q 1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		33/574	A
		33/577	B
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A

33/574
33/577

A 6 1 K 37/02
C 1 2 N 5/00

A

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA29 AA40 BB20 CB01
CB02 CB17 DA12 DA13 DA14
DA36 DA78 FB02 FB03
4B024 AA01 BA36 BA45 CA04 CA09
DA06 EA04 GA11 HA01
4B063 QA01 QQ42 QR32 QR55 QR62
QS33 QS34
4B064 AG27 AG31 CA02 CA19 CC24
DA14
4B065 AA26X AA93Y AB01 BA02
CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA17 BA01 BA18 BA22
CA18 CA36 DA27 MA02 NA14
ZB261 ZB262 ZB272 ZC781
4C085 AA02 BB01 CC03 DD31 DD88
4H045 AA11 BA10 CA41 DA76 DA86
EA51 FA74

专利名称(译)	人膀胱癌抗原		
公开(公告)号	JP2002112779A	公开(公告)日	2002-04-16
申请号	JP2000304143	申请日	2000-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人 慶應義塾		
[标]发明人	河上裕 藤田知信 伊藤敬一		
发明人	河上 裕 藤田 知信 伊藤 敬一		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/56 G01N33/574 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/00.Z A61K45/00.101 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA18 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA36 4C084/DA27 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC781 4C085/AA02 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD31 4C085/DD88 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种可用于诊断和治疗包括膀胱癌和肿瘤在内的各种癌症的人膀胱癌抗原，以及一种编码该抗原的基因。 解决方案：通过使用从膀胱癌细胞系获得的mRNA制备cDNA并将cDNA导入λ噬菌体载体中以感染大肠杆菌（共1.2×10¹⁰）来制备膀胱癌细胞cDNA文库。6使用膀胱癌患者血清，仅与膀胱癌患者血清反应，不与健康人类血清反应并在膀胱癌细胞和组织中高表达的人类逐步筛选Lambda噬菌体cDNA克隆 创建膀胱癌抗原KU-BL-1等

名称	Accession No.	Accession No.	Accession No.
膀胱癌抗原	U00006	U00006	U00006
膀胱癌抗原	U00007	U00007	U00007
膀胱癌抗原	U00008	U00008	U00008
膀胱癌抗原	U00009	U00009	U00009
膀胱癌抗原	U00010	U00010	U00010
膀胱癌抗原	U00011	U00011	U00011
膀胱癌抗原	U00012	U00012	U00012
膀胱癌抗原	U00013	U00013	U00013
膀胱癌抗原	U00014	U00014	U00014
膀胱癌抗原	U00015	U00015	U00015
膀胱癌抗原	U00016	U00016	U00016
膀胱癌抗原	U00017	U00017	U00017
膀胱癌抗原	U00018	U00018	U00018
膀胱癌抗原	U00019	U00019	U00019
膀胱癌抗原	U00020	U00020	U00020
膀胱癌抗原	U00021	U00021	U00021
膀胱癌抗原	U00022	U00022	U00022
膀胱癌抗原	U00023	U00023	U00023
膀胱癌抗原	U00024	U00024	U00024
膀胱癌抗原	U00025	U00025	U00025
膀胱癌抗原	U00026	U00026	U00026
膀胱癌抗原	U00027	U00027	U00027
膀胱癌抗原	U00028	U00028	U00028
膀胱癌抗原	U00029	U00029	U00029
膀胱癌抗原	U00030	U00030	U00030
膀胱癌抗原	U00031	U00031	U00031
膀胱癌抗原	U00032	U00032	U00032
膀胱癌抗原	U00033	U00033	U00033
膀胱癌抗原	U00034	U00034	U00034
膀胱癌抗原	U00035	U00035	U00035
膀胱癌抗原	U00036	U00036	U00036
膀胱癌抗原	U00037	U00037	U00037
膀胱癌抗原	U00038	U00038	U00038
膀胱癌抗原	U00039	U00039	U00039
膀胱癌抗原	U00040	U00040	U00040
膀胱癌抗原	U00041	U00041	U00041
膀胱癌抗原	U00042	U00042	U00042
膀胱癌抗原	U00043	U00043	U00043
膀胱癌抗原	U00044	U00044	U00044
膀胱癌抗原	U00045	U00045	U00045
膀胱癌抗原	U00046	U00046	U00046
膀胱癌抗原	U00047	U00047	U00047
膀胱癌抗原	U00048	U00048	U00048
膀胱癌抗原	U00049	U00049	U00049
膀胱癌抗原	U00050	U00050	U00050