

(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 - 112780

(P2002 - 112780A)

(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	H 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 6 3
39/00		A 6 1 P 13/10	4 B 0 6 4
45/00		35/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 29数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 304144(P2000 - 304144)

(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4.0×10⁵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 - 50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(SSX2/HOM-MEL-40、NY-ESO-1、SCP-1、CT7など)、分化抗原(galactin-4/NY-CO-27)、変異抗原(p53など)等の重要な抗原がある。これらの抗原の中で特にNY-ESO-1はHLA-A2拘束性のエピトープが決定されている。また、SEREX法を用いて単離された抗原の中には、e1F-4やHER2/neu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ある。このような癌に高発現する分子は、治療に応用しうら 20
だけではなく診断のマーカーや再発、予後を推定しう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CTLが直接認識する抗原として、正常組織にも発現を認めるKIAA0205抗原が変異を起こしたことにより抗原性を持った分子[MHCクラスI(HLA-B4403)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、T24膀胱腫瘍細胞株から作製したcDNA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SEREX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KOC3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も、前立腺癌のPSA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 4.0×10^5 個のファージcDNA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KU-BL-50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-50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-50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-50

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 - 50 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 × S S C , 0 . 1 % の S D S 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 × S S C , 0 . 1 % の S D S 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 F c 領域、H R P、G F P 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、H i s タグ、F L A G 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、N i - N T A と H i s タグの親和性を利用した膀胱癌抗原 KU - B L - 50 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 - B L - 50 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 - B L - 50 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 - B L - 50 エピトープあるいは該エピトープと H L A 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 H L A 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 E B V - 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 H L A 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、D E A E - 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 (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

ン、形質導入、スクレブローディング (scrape loading)、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、スポドブレラ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、Bowe's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、アデノアソシエートウイルス、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り以下説明する。

【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トンパク質及び/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等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] グレード3移行上皮癌の会陰転移からKU-19-19を、グレード1移行上皮癌からKU-7を、グレード2移行上皮癌からKU-1を樹立した。これら樹立した3つの膀胱癌細胞株をRPMI1640(10%のウシ胎児血清、100IU/mlのペニシリン、100µg/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%の条件下にて培養した。充分量の細胞を回収後、液体窒素にて凍結し-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、転移を伴う浸潤性膀胱腫瘍を有する71歳の患者の血清を使用した。なお、この患者の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。腫瘍の局所進達度

は、深部筋層に浸潤を認めており、リンパ管侵襲を伴っていた。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収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)2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3つの膀胱癌細胞株(各1×10⁸個)からグアニジン-塩化セシウム超遠心法により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mRNAを精製した。精製した3つの細胞株由来のポリ(A)RNAを混合し、混合した全RNA5µgを、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)を用いてZAPエキスプレクターに挿入し、2.0×10⁶ pfu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はならず、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、TBS-T(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 conjugat

ed, CAPPEL) を用いて反応させ、nitro blue tetrazolium (Roche) と5-bromo-4-chloro-3-indolyl (Sigma-Aldrich 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。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4.0 × 10⁵個のファージクローンをスクリーニング)を行い、39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38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 TAGGC-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シーク

エンシングを行い、まず300~650 bpの塩基配列を決定した。この結果28種類の異なった遺伝子が得られた。

【0042】上記決定された28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、癌細胞株、胎児性組織、精巢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 (17種類の既知抗原遺伝子) 及び表2 (11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; KAZUS A, 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-76 / pinch proteinには7個、KU-BL-49 / nucleophosmin homolog、KU-BL-50 / ecalectin homolog、KU-BL-52 / EST、KU-BL-55 / liprin beta-1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】

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-55	4	2	Liprin beta-1 (AF034802)	Hs.133207	LAR interacting protein
KU-BL-54	0.8	1	Ribosomal protein S2 (X17206)	Hs.182426 (9; D9S1808-D9S162, 16p13.3)	ribosomal protein
KU-BL-56	0.9	1	Ras GAP-related protein (U51903)	Hs.78993 (5; D5S1977-D5S428)	modulate signaling by Ras GTPase
KU-BL-57	2.2	1	Myosin 6 (U90236)	Hs.22564 (6q13; D6S1596-D6S284)	cytoskeletal protein
KU-BL-58	1.2	1	beta-tubulin (AF070561)	Hs.179661 (6; D6S1558-D6S1616)	microtubule
KU-BL-60	1.6	1	Elongation factor 2 (X51466)	Hs.75309 (19pter-q12; D19S425-D19S418)	protein translation
KU-BL-62	1.2	1	SFRS protein kinase 1 (U09564)	Hs.75761 (6p21.2-p21.3; D6S1558-D6S1616)	serine protein kinase
KU-BL-64	2.4	1	Homeodomain protein HOXB13 (U57052)	Hs.66731 (17q21.2; D17S791-D17S794)	Homeobox gene
KU-BL-65	1.3	1	Sperm adhesion molecule (X84347)	Hs.121494 (7q31; D7S655-D7S686)	sperm plasma membrane protein
KU-BL-67	2.8	1	Glycoprotein nmb (X76534)	Hs.82226 (7; D7S673-D7S2493)	glycoprotein
KU-BL-68	2.7	1	Plasminogen activator inhibitor-1 (M16006)	Hs.82085 (7q21.3-q22; D7S479-D7S2545)	Serine protease inhibitor
KU-BL-69	1.8	1	Ig superfamily protein (AL034397)	Hs.8904 (Xq12-13.3; DXS991DSX983)	Ig superfamily
KU-BL-70	1.1	1	40S ribosomal protein X55715	Hs.252259 (11q13.3-q13.5; D11S916-D11S911)	ribosomal protein
KU-BL-71	2.2	1	PDPK-1 (AF017995)	Hs.154729 (22; D22S420-D22S1144)	Ser/Thr protein kinase
KU-BL-74	4	1	High density lipoprotein binding protein (M64098)	Hs.177516 (2q37)	lipid transport
KU-BL-75	2.5	1	Lbc protooncogene (AF127481)	Hs.(-) (15q24-q25)	protooncogene
KU-BL-76	1.2	7	Pinch protein (U09284)	Hs.112378 (9; D2S293-D2S121)	elimination of senescent cells

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-49	1.3	2	none Nucleophosmin homolog	none
KU-BL-50	1.8	2	none possible galectin family	none
KU-BL-51	2	1	EST (H62686)	Hs.173094 (8; D8S270-D8S257, D8S257-D8S508)
KU-BL-52	3	2	EST (AW977412)	none
KU-BL-53	2.5	1	EST (AW514723)	Hs.183861
KU-BL-59	1	1	EST (AA203955)	none
KU-BL-61	0.4	1	EST (T25743)	Hs.71818 (12)
KU-BL-63	0.6	1	EST (AW607963)	none
KU-BL-66	1.8	1	none	none
KU-BL-72	1.5	1	EST (AI075753)	Hs.53531
KU-BL-73	2.5	1	EST (AI377951)	Hs. 26481 (7; D7S629-D7S673, D7S493-D7S629)

【0045】28種類の抗原遺伝子の中で7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-49はnucleophosminと塩基配列レベルで94.7%、アミノ酸配列レベルで98.3%の相同性があり、そのアミノ酸配列からnucleophosminのファミリー遺伝子である可能性が高い。Nucleophosminには癌関連の多くの報告がある。例えばanaplastic large cell lymphomaでは、nucleophosminはALK遺伝子と融合し悪性転化を起こすと報告されている。また乳癌においては、nucleophosminに対する抗体価は乳癌の再発を予知すると報告されている。KU-BL-49も同様な機能を持つとすれば、癌と関連する分子である可能性が高い。KU-BL-50もガレクチンファミリーのeagalactinと塩基配列レベルで75.6%、アミノ酸配列レベルでは79.2%の相同性があった。EagalactinはTリンパ球から分泌されるeosinophilの誘引物質(chemoattractant)であると報告されている。最近、ガレクチンファミリーは癌との関連性が報告されている。例えばGalectin-9はHodgkin' diseaseにおいて高発現していると報告されている。またgalectin-4は大腸癌のSEREX法により単離されたものだが、消化管に限定された発現パターンを示し大腸癌抗原候補のひとつである。KU-BL-50をガレクチンファミリーのひとつであるとすれば、これらのガレクチンと同様に癌と関連する可能性はある。

【0046】KU-BL-67/nmb geneはメラノーマ細胞株で遺伝子導入において転移能が減弱することが証明され、biological activitiesのnegative regulatorであることが示唆されている。KU-BL-68/plasminogen activator inhibitor-1は腫瘍の転移、浸潤、

遊走性(migration)に関与していると考えられている。KU-BL-72(=KU-BL-1)、KU-BL-73(=KU-BL-3)は、一致するDNAクラスターの由来する組織が特異な集団であり重要な抗原であるが、膀胱癌細胞株FYとautologousの血清を用いたSEREX法による検討により単離されている。またKU-BL-75/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 protooncogene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。

【0047】また、その他の未知遺伝子に関しても一致するDNAクラスターの由来する組織を考慮すると、特異な発現パターンが予想される分子がいくつかあった。KU-BL-51はEST(H62686, Unigene番号: 173094)と一致する分子であった。多くの一致するESTが胎児組織(e.g.胎児肝臓および脾臓、胎児など)由来のものであった。KU-BL-52はEST(AW977412)と一致していたがUniGeneには登録されていなかった。ほぼ一致するESTはgerminal center B細胞や、胎児及び新生児脳組織や、カルチノイドなどであった。KU-BL-53はEST(AW514723, Hs. 183861)とほぼ一致していた。ほぼ一致するESTの由来は癌組織(e.g.,子宮内膜癌)や正常前立腺などであった。

【0048】[健康人血清及び癌患者血清中の各単離癌抗原に対する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。

【0049】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、28種類の抗原遺伝子中24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、24クローン中3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-55/liprin beta-1)に関しては、健常人血清中に抗*

*体が存在していても低い割合で献上人血清中に抗体が存在しているのであれば、NY-CO-38のように重要な抗原が含まれていることがある(Int. J. Cancer 76, 652-8, 1998)ことからその後の検討を行った。

【0050】健常人血清を用いてスクリーニングされた21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14クローンについての結果を表3に示す。21クローン中7クローンは、上記のスクリーニングに用いた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14クローンにおいては一次スクリーニングに用いた患者A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-73(8クローンは)、膀胱癌患者においてある程度の割合で免疫反応が起こっているものと考えられた。また、KU-BL-50も28例(前記患者血清を含む)の膀胱癌患者血清中に3例の抗体を認めた。その他に、KU-BL-55/liprin beta-1、KU-BL-56/RasGAP-related protein、KU-BL-62/SFRS protein kinase 1、KU-BL-74/high density lipoprotein binding protein、KU-BL-72/EST(=KU-BL-1)等のクローンにおいても前記患者以外の膀胱癌患者血清中にIgG抗体が検出された。

【0051】

【表3】

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)	肺癌 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-49	Nucleophosmin homolog	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-50	Ecalectin homolog	0/16	3/28	5/14	0/10	0/10	1/10	3/10	6/10	0/7	0/6
KU-BL-51	EST	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-52	EST	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-53	EST	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-55	Liprin-beta 1	1/16	4/28	1/14	0/10	0/10	3/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-56	Ras GAP-related protein	0/16	2/28	0/14	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-58	Beta-tubulin	0/16	1/28	1/14	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-62	SFRS protein kinase 1	0/16	4/28	0/14	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-67	nmb	0/16	1/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-72(=1)	EST	0/16	2/28	0/14	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-73(=3)	EST	0/16	8/28	0/14	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/7	0/6
KU-BL-74(=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-75(=14)	Lbc protooncogene	0/16	1/28	2/14	0/10	0/10	0/10	3/10	1/10	0/7	0/6

【0052】また、メラノーマ10例、脳腫瘍10例、肺癌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、上記21クローンについてこれらの膀胱癌以外の癌患者血清中にIgG抗体が存在するかどうかを調べてみたが(表3)、膀胱癌以外の癌患者血清中に抗体が存在したクローンは少なかった。その中でも、KU-BL-50/ecalectin homolog、KU-BL-55/liprin-beta-1、KU-BL-75/Lbc protooncogeneなどは膀胱癌以外の癌患者血清中にIgG抗体の存在を認めた。特に、KU-BL-50は数種の癌患者血清中に抗体に存在を認めた。KU-BL-50は28例中3例の膀胱癌患者血清中に抗体を認め、10例中6例の食道癌患者、

14例中5例の前立腺癌患者、10例中3例の腎癌患者、10例中1例の膀胱癌患者血清中においても抗体の存在が認められ、食道癌、腎細胞癌、前立腺癌においてはいずれも30%以上の割合でIgG抗体が存在していたことから、KU-BL-50は膀胱癌だけではなく、それ以外の癌においても免疫原性のある抗原であると考えられた。また、KU-BL-75/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。

【0053】[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(U87-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(K15)、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。

【0054】上記全RNAを各 $5 \mu\text{g}$ 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 $300 \sim 700 \text{ bp}$ 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°C 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°C 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 T_m 値を考慮して設定した。

【0055】KU-BL-50には、センスプライマー(5'-CTC ATG TCCAGT GGA AGC AG-3 : 配列番号5)と、アンチセンスプライマー(5'-ACC ACC GCG TTC TCC TTG AA-3 : 配列番号6)を作製し 626 bp のバンドを検出した。アニーリング温度は 57.5°C 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 CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3 : 配列番号8)を作製し、熱変性 94°C で30秒間、アニーリング 68°C で2分間、伸長反応 72°C で2分間にて25サイクルのPCRを行い、 838 bp のバンドを検出した。なお、KU-BL-49には、センスプライマー(5'-

GCC ACC AAC CCA TGG AAG AT-3 : 配列番号9)と、アンチセンスプライマー(5'-GGC TGG AGT ATC CCG TAT TG-3 : 配列番号10)を、KU-BL-51には、センスプライマー(5'-ATA CAG CTG GGG AGG TAG CT-3 : 配列番号11)と、アンチセンスプライマー(5'-GGA GAA GCT TGA GAT GCT CC-3 : 配列番号12)を、KU-BL-52には、センスプライマー(5'-CCC GCG CCG ATG TGAATT ATT-3 : 配列番号13)と、アンチセンスプライマー(5'-CCG CAT CTC CAG GGT CTT TAA-3 : 配列番号14)を、KU-BL-53には、センスプライマー(5'-AAG GAG CTG CTA CAG CCA CA-3 : 配列番号15)と、アンチセンスプライマー(5'-GCA CGC TGA AGC CAT AAC AG-3 : 配列番号16)を用いてPCRを行った。

【0056】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 254 nm の紫外線照射によりバンドを検出した。その結果、多くの単離抗原は正常組織にも広く発現を認めた。その中で7つの遺伝子は、膀胱癌細胞株、その他の癌細胞株、限られた正常組織のみ発現を認めた。これらの7つのクローンはKU-BL-49/nucleophosmin homolog、KU-BL-50/ecalectin homolog、KU-BL-51/EST、KU-BL-52/EST、KU-BL-53/EST、KU-BL-72/EST(=KU-BL-1)、KU-BL-73/EST(=KU-BL-3)であった。これらのうち、5種類のクローン(KU-BL-49、KU-BL-50、KU-BL-51、KU-BL-52、KU-BL-53)の結果を表4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。また、KU-BL-50及びKU-BL-52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。

【0057】

【表4】

	KU-BL-49	KU-BL-50	KU-BL-51	KU-BL-52	KU-BL-53
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	+	-	++	-	-

【0058】上記の結果から、KU-BL-50は膀胱癌に発現を認めたと、他の正常組織、正常増殖細胞及び癌細胞株では25サイクル及び35サイクルのRT-PCRにおいて発現が認められなかった。また、KU-BL-50は、6例中2例の膀胱癌細胞株(KU-1とNBT)や23例中13例の膀胱癌組織においても発現を認めたと(表5)。膀胱癌以外の癌腫についてRT-PCR*

*Rのパネルを広げて検討したところ、食道癌、腎細胞癌、胃癌、メラノーマなどの限られた癌腫で発現を認めた。特に腎細胞癌における発現頻度は高かった。これらの結果から、KU-BL-50は膀胱癌だけでなく他の多くの癌腫にも発現していると考えられた。

【0059】

【表5】

KU-BL-50 KU-BL-52

	KU-BL-50	KU-BL-52
メラノーマ	1/11	4/11
グリオーマ	0/2	0/2
肺癌	0/6	2/6
乳癌	0/2	0/2
腎細胞癌	33/72	4/11
膵癌	0/6	5/6
血球系悪性腫瘍	0/4	0/4
大腸癌	0/7	6/7
食道癌	2/16	11/16
胃癌	1/3	3/3
前立腺癌	0/3	2/3
膀胱癌	13/23	14/23

【0060】KU-BL-49/nucleophosmin homolog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が認められ、30サイクルでは多くの正

常組織に弱い発現が認められた。また6例の膀胱癌細胞株全例に強い発現が認められた。KU-BL-51/ESTは25サイクルのRT-PCRにおいて正常組織で

は精巣、肺、膀胱、腎臓、筋肉、脳に発現が認められた。この中で、特に精巣において発現量が高いと考えられた。増殖細胞では線維芽細胞に、また6例中2例の膀胱癌細胞株(FY、KU19-19)に発現が認められた。しかし、35サイクルではすべての正常組織に広く発現していた。KU-BL-52/ESTは25サイクルのRT-PCRにおいて、正常では脳、膀胱に発現を認めた。癌細胞株においてはメラノーマ、食道癌、脳腫瘍(グリオーマ)、6例中3例の膀胱癌細胞株(KU1、KU7、NBT)に発現を認めた。35サイクルのRT-PCRにおいてはいくつかの正常組織にも発現が認められた。KU-BL-52は30サイクルのRT-PCRにおいて、23例中14例の膀胱癌組織に発現が認められた。また、膀胱癌以外の癌腫のパネルを広げ、RT-PCRによる発現の検討を行ったところ、様々な癌腫において発現を認めた(表5)。

【0061】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのノーザンブロット法]上記5種類のクローンに対してノーザンブロット法を行った。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polyA+ RNAが2μgずつ各レーンにプロッティングしてあるヒトマルチプルノーザンブロット(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ティングしたものを用いた。これらの全RNAを、ホ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。

【0062】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500~1000bpのDNA断片(プローブ)を作製し、このDNA断片をHigh PrimeDNA 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。

【0063】上記ノーザンブロットの結果から、KU-BL-50はRT-PCRと同様に正常組織には全く発現を認めず、6例中2例の膀胱癌細胞株(KU1とNBT)に発現を認めた。また代表的な12例の膀胱癌組織においては8例に約1.5~1.6kbpのバンドを認めた(図1)。KU-BL-49は、正常組織においても弱い発現が認められ、RT-PCRと同様に精巣にやや強く発現していた。膀胱癌細胞株には強く発現し、正常膀胱組織と膀胱癌組織との比較において癌組織において強い発現が認められた。KU-BL-51は、正常組織に広く発現が認められたが、精巣における発現量は非常に高かった。正常膀胱と膀胱癌組織との比較において、癌組織において強い発現が認められた。KU-BL-52は、正常組織では脳に発現を認め、膀胱癌細胞株(KU1、NBT)では6例中2例に発現を認めた。また膀胱癌組織においても弱い発現を認めた。

【0064】[リアルタイム(Real time)PCRによるmRNAの発現量の比較]KU-BL-49とKU-BL-51はノーザンブロットによる検討において正常膀胱と膀胱癌組織との間で発現量に差があることが示唆された分子である。またこれらの分子の特徴としては、正常組織において精巣における発現量が極めて高いことである。この発現パターンはHer2/neuなどの癌関連分子の発現パターンに似ており、KU-BL-49とKU-BL-51も癌に高く発現する分子である可能性がある。癌における高発現を証明するために正常膀胱、その他の正常組織、膀胱癌組織に対してリアルタイムPCRを行い、正常組織と癌組織との発現量の検討を行った。KU-BL-49フォワードプライマーとしては、5'-CAAAGTGGAGC CAA GTT CAT C-3(配列番号17)を、KU-BL-49リバースプライマーとしては、5'-CTGCCAGAGATCTTG AAT AGC C-3(配列番号18)を、KU-BL-49プローブとしては、5'-(FAM)AAG AAT TGT TTC CGG ATG ACT GAC CAG G-(TAMRA)-3を用いた。KU-BL-51フォワードプライマーとしては、5'-AAC CAG AAG GCC AAG TGG AT-3(配列番号19)を、KU-BL-51リバースプライマーとしては、5'-CAG AAC TGT AGA GCA AGC GCA G-3(配列番号20)を、KU-BL-51プローブとしては、5'-(FAM)TGC TGG CAA ACC CTG AAC CTG TCT-(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' - T C A C C C A C A C T G T G C C C A T C T A C G A - 3' (配列番号21)を、-アクチンリバースプライマーとしては、5' - C A G C G G A A C C G C T C A T T G C C A A T G G - 3' (配列番号22)を、-アクチンプローブとしては、5' - (FAM) A T G C C C - X (TAMRA) - C C C C C A T G C C A T C C T G C G T p - 3' を用いた。これらのプライマーやプローブは、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。

【0065】1 μ lのKU-BL-49又はKU-BL-51のcDNAを49 μ lのマスターミックス (TagManバッファー、3.5mMのMgCl₂、300nMの上記各プライマー、200mMのdATP、200mMのdCTP、200mMのdGTP、200mMのdUTP、0.5UのAmpErase Uracil N-glycosylase (UNG)、1.25UのAmpliQ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ で10分間、UNGの失活として95 $^{\circ}$ で10分間それぞれ行った後、95 $^{\circ}$ 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、正常膀胱にくらべ膀胱癌組織において高発現する傾向は認められた。

【0066】以上のことから、KU-BL-50は、検討した正常組織のいずれにも発現を認めず、癌細胞にのみ発現されており、癌細胞に発現することにより免疫系が認識するのではないかと考えられる。膀胱癌以外にも主に他の上皮系の癌 (腎細胞癌、食道癌、胃癌) に発現しており、特に腎細胞癌においては発現頻度が高く、これらの癌共通の抗原となる可能性もある。

【0067】[5' - RACE法によるKU-BL-50の同定と構造の解析] 上記単離したKU-BL-50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、その説明書に従って操作を行った。膀胱癌細胞株KU1から抽出した1 μ g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。

【0068】第2鎖cDNAの合成には大腸菌DNAポリメラーゼI (Escherchia 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' - C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C T C G A G C G G C C G C C C G G G C A G G T - 3' : 配列番号23) 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' - C C A T C C T A A T A C G A C T C A C T A C T A T A G G G C - 3' : 配列番号24) とKU-BL-50に特異的なプライマーGSP1 (5' - C C T C C C G T T C A C T G T C A C C T G G A A C T G C - 3' : 配列番号25) を用いてPCRを行った。PCRの条件は、94 $^{\circ}$ x 30分間、94 $^{\circ}$ x 5秒間、68 $^{\circ}$ x 4分間を5サイクル、94 $^{\circ}$ x 5秒間、70 $^{\circ}$ x 4分間を5サイクル、94 $^{\circ}$ x 5秒間、72 $^{\circ}$ x 4分間を2.5サイクル、最後に72 $^{\circ}$ x 4分間を1サイクル行った。

【0069】上記得られたPCR産物5 μ l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 (10mMのトリシン、0.1mM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' - A C T C A C T A T A G G G C T C G A G C G G C - 3' : 配列番号26) とKU-BL-50に特異的なプライマーGSP2 (5' - T G T T G C A G A C C A C G T A G C C G C C C T C T - 3' : 配列番号27) を用いてnested PCRを行い、特異的なバンドを検出した。KU-BL-50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。

【0070】上記の結果、KU-BL-50をコードするcDNAの長さは1547bpであった。これはノーザンブロットによるバンドの長さは1.5~1.6kbp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46~1032bpであり、64bpに始まるメチオニンはGXXATGTのKozak ruleを満たしていた。また、43~45bpにストップコドン (TAA) が認められた。KU-

BL-50は323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、5側の46~1002bpの部分はSus scrofaのurate transporter/channel protein (GenBankアクセッション番号: AJ131826) とほぼ一致していた。ただしurate transporter/channel proteinに対する情報はデータベース上では得られなかった。46~1005bpの部分においてはヒトのgalectin-9のisoformとされるecalectin (GenBankアクセッション番号: AB005894) と塩基レベルで83%一致していた。また、galectin-9 (GenBankアクセッション番号: NM#002308.2) とも相溶性が高かった。

【0071】アミノ酸配列によるホモロジー検索において、最も相溶性のある分子はやはりSus scrofaのSus scrofaのurate transporter/channel proteinであり、1~313アミノ酸が高いホモロジーを認めた。ヒトにおいてはecalectinがアミノ酸配列において1~323のアミノ酸が79.2%の相溶性があり、ガレクチンファミリーの中で最も相溶性が高かった(図3)。また、KU-BL-50は多数のgalectinと高い相溶性を示していた。モチーフ検索による特徴的なアミノ酸配列としては、galactosidase binding signature (galectin signature) があり、galectosidaseが結合することが示唆された。相溶性のあるGalectin familyのecalectin、galectin-4 (GenBankアクセッション番号: AB006781)、galectin-8 (GenBankアクセッション番号: X91790) との相溶性を図4に示す。Galectin-4とgalectin-8は2つのcarbohydrate-binding regionを有する2つのドメイン (galectin-4-N terminal domain(Nt)、galectin-4-C terminal domain(Ct)とgalectin-8-N terminal domain(Nt)、galectin-8-C terminal domain(Ct)) を有し、それらをlink peptideがつないでいることが知られている (Yaron RH., J. B. C. 270, 3447-53, 1994)。図4の結果から、KU-BL-50とecalectinも同様に2つのドメインを有すると考えられた。なお、図中の(+)*

*はいずれのgalectinにも共通に保存されているアミノ酸を表す。その中で特に、(H-NPRF)・(-V-N)・(WG)のアミノ酸の組み合わせはガレクチンファミリーにおいて共通に保存されており、この部位はガレクチンのligandが結合する部位であると推定されている。

【0072】上記のことから、KU-BL-50も同様にN末端ドメインとC末端ドメインを有し、その間をlink peptideがつないでいるのではないかと考えられる。ガレクチンに共通の配列がKU-BL-50にも明らかに保存されているので、KU-BL-50もガレクチンファミリーの一種であると思われる。ガレクチンファミリーは最近、癌との関連性が考えられており、KU-BL-50の癌に限定された発現パターンや膀胱癌をはじめとして食道癌、腎癌など種々の癌患者血清中に抗体が存在することから、癌に関連して発現する可能性が高い。galectin-1とgalectin-3に関しては癌関連の論文が多くあり、galectin-1の高発現とgalectin-3の発現の低下が転移能に関係していると考えられている。さらにHodgkin's diseaseにおいてはgalectin-9が腫瘍細胞に高発現していることが確認されている。また大腸癌においてはgalectin-4が分化抗原となる可能性がある。また前立腺癌においてはLNCaPより、正常前立腺や前立腺肥大症には発現されず前立腺癌に発現されるPTCA-1が同定され、その配列上の相溶性からガレクチンファミリーのひとつであると報告されている。これらのことからもKU-BL-50がガレクチンファミリーのひとつである可能性がある。

【0073】

【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。

【0074】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> KEIO UNIVERSITY
<120> Human Bladder Cancer Antigens
<130> 000000101

<140>
<141>
<160> 27
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1566
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS

```

<222> (46)..(1035)

<400> 1

ctagaatcca gcggccgctg aattctagaa ttca
gcggcc gctga att cta ggc ggt 57

Ile Leu Gly

Gly

1

gga gcg atg gcc ttc aga ggc gcc cag gct
ccc tac atg aac ccg atg 105

Gly Ala Met Ala Phe Arg Gly Ala Gln Ala
Pro Tyr Met Asn Pro Met

5

10

15

20

gtc ccc ttc aca ggg atg atc caa ggg ggc
ctc cag gac gga ctt cag 153

Val Pro Phe Thr Gly Met Ile Gln Gly Gly
Leu Gln Asp Gly Leu Gln

25

30

35

atc acc atc aat ggg acc gtt ctc atg tcc
agt gga agc agg ttt act 201

Ile Thr Ile Asn Gly Thr Val Leu Met Ser
Ser Gly Ser Arg Phe Thr

40

45

50

gtg aac ttg cag acc ggc cac agg gac aat
gac att gcc ttc cac ttc 249

Val Asn Leu Gln Thr Gly His Arg Asp Asn
Asp Ile Ala Phe His Phe

55

60

65

aac cct cgg ttc gaa gag ggc ggc tac gtg
gtc tgc aac acg aag cag 297

Asn Pro Arg Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Val
Val Cys Asn Thr Lys Gln

70

75

80

aat gga atc tgg ggg cct gag gag agg aag
atg caa atg ccc ttc cag 345

Asn Gly Ile Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys
Met Gln Met Pro Phe Gln

85

90

95

100

cgc gga cat cca ttt gag ctc agc ttc ctg
gtc cag agc tcg cag ttc 393

Arg Gly His Pro Phe Glu Leu Ser Phe Leu
Val Gln Ser Ser Gln Phe

105

110

115

cag gtg aca gtg aac ggg agg ctc ttt gtg
cag tac aca cac cgc gtg 441

Gln Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Phe Val
Gln Tyr Thr His Arg Val

120

125

130

ccc ttc cac cgg gtg gac acc atc tcc gtg
aca ggc atc gtc cag ctg 489

Pro Phe His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val

Tyr Ile Asn Leu Arg Ser Gly Ser Asp Ile
 Ala Phe His Leu Asn Pro
 230 235 240
 cgc ttc aag gag aac gcg gtg gtc cgc aac
 acg cag atc ggc agc tcc 825
 Arg Phe Lys Glu Asn Ala Val Val Arg Asn
 Thr Gln Ile Gly Ser Ser
 245 250 255 2
 60
 tgg ggg cct gag gag cga ggc ctg ccc cgg
 aag atg ccc ttc tcc aga 873
 Trp Gly Pro Glu Glu Arg Gly Leu Pro Arg
 Lys Met Pro Phe Ser Arg
 265 270 275
 ggc cag agc ttc ttg gtg tgg atc ctc tgt
 gaa agc cac tgc ttc aag 921
 Gly Gln Ser Phe Leu Val Trp Ile Leu Cys
 Glu Ser His Cys Phe Lys
 280 285 290
 gtg gcc gtg gac ggt cag cac cta ttt gaa
 tac tac cac cgc ctg aag 969
 Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu
 Tyr Tyr His Arg Leu Lys
 295 300 305
 cac ctg ccc acc atc aac tcc ctg gag gtg
 ggg ggc gac atc cag ctg 1017
 His Leu Pro Thr Ile Asn Ser Leu Glu Val
 Gly Gly Asp Ile Gln Leu
 310 315 320
 acg cac gtg cag cca tag acgagccccg ccct
 ggggt gaggctggg 1065
 Thr His Val Gln Pro
 325 330
 ccgaaaggct gtctgggtct gctcgtcacc cccc
 ttccca ggctgccagg acctggggct 1125
 tggctggaga gaccgtgtcc ttgcctggcc ctgc
 ttctgg ctgcagcctc ccctggagcg 1185
 gggaggacag ctggctggga cgccttctt ccac
 ctacgg aggaggtgcg gtctgagcag 1245
 gccggagccc cgtgttccct gccccggcc tctg
 cctggg tctggcctt cccaagctcc 1305
 cagcccaggc ctgcccacac ctgcctctcc accc
 cccac ccggccttcc agtcacctag 1365

 tccaagcca ccagctgtca ctccacgtgg gagg
 cagtat ccctcttct ttctccaagc 1425
 ttgaacctct ccttgacacc tgaccaact ctic
 cccgcc ccgtagct gctgaggac 1485
 accccaccga tgggagcttt ctccccttc cagc
 gtctt ccaataaaga aagaaaactg 1545
 ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
 1566

115 120 125
 Thr His Arg Val Pro Phe His Arg Val Asp
 Thr Ile Ser Val Thr Gly
 130 135 140
 Ile Val Gln Leu Ser Tyr Ile Ser Phe Gln
 Pro Pro Gly Arg Trp Pro
 145 150 155 1
 60
 Ala Asn Ser Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val
 Ile His Thr Val Gln Ser
 165 170 175
 Thr Pro Gly Gln Met Phe Pro Asn Pro Met
 Ile Pro Pro Met Ala Tyr
 180 185 190
 Pro Asn Pro Val Phe Pro Ile Pro Phe Phe
 Ala Ser Ile Pro Gly Gly
 195 200 205
 Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Met Val Ser
 Gly Thr Ile Leu Pro Ser
 210 215 220
 Ala Gln Ser Phe Tyr Ile Asn Leu Arg Ser
 Gly Ser Asp Ile Ala Phe
 225 230 235 2
 40
 His Leu Asn Pro Arg Phe Lys Glu Asn Ala
 Val Val Arg Asn Thr Gln
 245 250 255
 Ile Gly Ser Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg
 Gly Leu Pro Arg Lys Met
 260 265 270
 Pro Phe Ser Arg Gly Gln Ser Phe Leu Val
 Trp Ile Leu Cys Glu Ser
 275 280 285
 His Cys Phe Lys Val Ala Val Asp Gly Gln
 His Leu Phe Glu Tyr Tyr
 290 295 300
 His Arg Leu Lys His Leu Pro Thr Ile Asn
 Ser Leu Glu Val Gly Gly
 305 310 315 3
 20
 Asp Ile Gln Leu Thr His Val Gln Pro
 325

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:T3

<400> 3

aattaaccct cactaaaggg

<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-50 Sense
Primer
<400> 5
ctcatgtcca gtggaagcag
20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-50
Antisense Primer
<400> 6
accaccgct tctcctgaa
20
<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-actin
Sense Primer
<400> 7
atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg
32
<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-actin
Antisense Primer
<400> 8
cgtcactctc ctgcttgctg atccacatct gc
32
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-49
Forward Primer
<400> 9
gccaccaacc catggaagat
20
<210> 10
<211> 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-51
Forward Primer
<400> 11
atacagctgg ggaggtagct
20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-51
Reverse Primer
<400> 12
ggagaagctt gagatgctcc
20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-52
Forward Primer
<400> 13
ccgcgcccga tgtgaattat t
21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-52
Reverse Primer
<400> 14
ccgcatctcc aggtcttta a
21

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-BL-53

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-BL-53

Reverse Primer

<400> 16

gcacgctgaa gccataacag
20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-BL-49

Forward Primer

<400> 17

caaagtgga gccaaagtca tc
22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-BL-49

Reverse Primer

<400> 18

ctgccagaga tcttgaatag cc
22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-BL-51

Forward Primer

<400> 19

aaccagaagg ccaagtggat
20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-BL-51

Reverse Primer

<400> 20

cagaactgta gagcaagcgc ag

<223> Description of Artificial

Sequence:Beta-actin

Forward Primer

<400> 21

tcaccacac tgtgccatc tacga

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Beta-actin

Reverse Primer

<400> 22

cagcgaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Marathon cDNA

Adaptor1

<400> 23

aatacgaactc actatagggc tcgagcggcc gcc

gggcag gt 42

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:AP1

<400> 24

ccatcctaat acgactcact actatagggc

30

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:GSP1

<400> 25

cctcccgttc actgtcacct ggaactgc

28

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

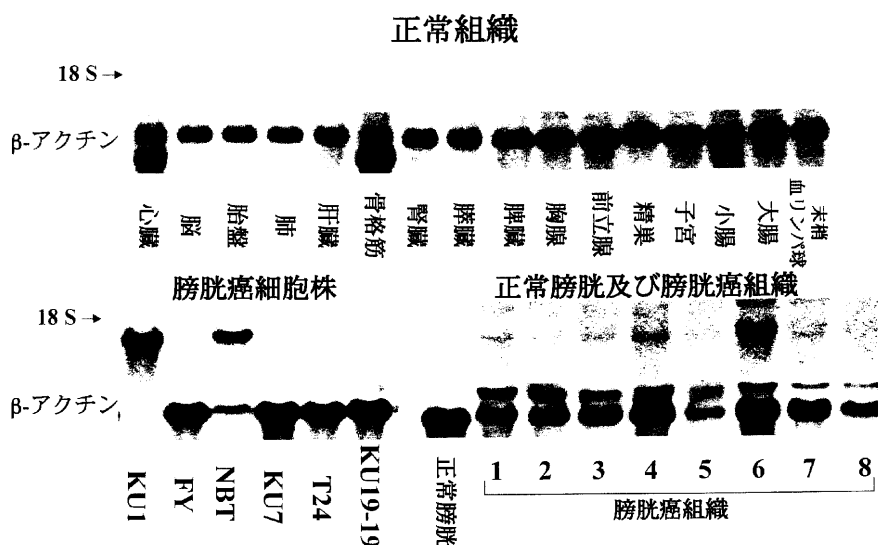
<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:GSP2
 <400> 27 35

36

【図面の簡単な説明】gttgagac cacgtagccg ccctct
 【図1】本発明のヒト膀胱癌抗原KU-BL2650mRNA発現をノーザンブ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-50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-50とeclectinとのアミノ酸配列の比較結果を示す図である。
 【図4】本発明のヒト膀胱癌抗原KU-BL-50とgalectin-4、galectin-8、eclectinとのアミノ酸配列の比較結果を示す図である。

【図1】



【 図 2 】

1 CTAGAATCCAGCGCGCTGAATTCTAGAATTACAGCGCGCTGAATTCTAGCGGTGGA 60
61 GCGATGCCCTTCAGAGCGCCAGGCTCCCTACATGAACCGGATGGTCCCTTCACAGGG 120
M A F R G A Q A P Y M N P M V P P T G
121 ATGATCCAAGGGGGCTCCAGGACGGACTTCAGATCACCATCAATGGGACCGTTCTCATG 180
M I Q G G L Q D G L Q I T I N G T V L M
181 TCCAGTGGAGCAGTTTACTGTGAATTCAGACCGGCCACAGGGACAATGACATTGCC 240
S S G S R F T Y N L Q T G H R D N D I A
241 TTCCACTCAACCTCGCTCGAAGAGGGGGCTACGTGGTCTGCAACAGGAGCAGAAT 300
F H F N P R F E E G G Y V V C N T K Q N
301 GGAATCTGGGGCTGAGGAGGAGCAATGCAAAATGCCCTTCAGCGCGGACATCCATT 360
G I W G P E E R K M Q M P P Q R G H P F
361 GAGTCCAGCTTCCTGGTCCAGAGCTTCGACGTTCCAGGTGACAGTGAACGGGAGGCTCTT 420
E L S F L V Q S S Q F Q V T V N G R L F
421 GTGCAGTACACACCGGCTGCCCTTCACCGGTGGACACCATCTCCGTGACAGGCATC 480
V Q Y T H R V P P H R V D T I S V T G I
481 GTCCAGTGTCTACATCAGCTTCAGCTCCAGGTGCGTGGCGGGCAACTCGGCTCCC 540
V Q L S Y I S F Q P P G R W P A N S A P
541 ATTACTCAAACCTCATCCACACTGTGACAGCACCCCTGGACAGATGTCCCTAATCCC 600
I T Q T V I H T Y Q S T P G Q M F P N P
601 ATGATCCACCTATGGCATATCCTAACCCAGTCTTCCCATCCCTTCTTCGCTCCATC 660
M I P P M A Y P N P V F P I P P F A S I
661 CCGGGCGGCTGACCCCTCCAAGACATCATGGTCTCGGGACCATCTGCCAGCGCT 720
P G G L Y P S K S I M V S G T I L P S A
721 CAGAGTTTACATCAACTTGGCTCGGGAGTGACATCGCTTCCACTGAATCCCGGC 780
Q S F Y I N L R S G S D I A F H L N P R
781 TTCAAGGAGAACGGGTGGTCCGCAACCGCAGATCGGAGCTCCTGGGGCTGAGGAG 840
F K E N A V V R N T Q I G S S W G P E E
841 CGAGCCTGCCCGGAAGATGCCCTTCCAGAGCCAGAGCTTCTGGTGGATCCTC 900
R G L P R K M P P S R G Q S F L V W I L
901 TGTGAAAGCCACTGCTTCAAGTGGGCGTGGACGGTCAACACATTTGAATACTACCAC 960
C E S H C F K V A V D G Q H L F E Y Y H
961 CCGCTGAAGCACCTGCCACCATCAACTCCTGGAGTGGGGGGCAGATCCAGCTGAGC 1020
R L K H L P T I N S L E V G G D I Q L T
1021 CACGTGACGCATAGACGAGCCCGCTGGGGTGGGCTGGGCGGAAAGGCTGTCTG 1080
H Y Q P *
1081 GGTCTGCTGACCCCTTCCAGGCTGCCAGGACCTGGGGCTGGCTGGAGAGACCG 1140
1141 TGCTCTGCTGGCCCTGCTTCTGGCTGAGCTCCCTGGAGCGGGAGGACAGCTGGC 1200
1201 TGGGACCGGCTTCTCCACCTACGGAGGAGTGGGCTTGGCAGGCGGAGCCCGGTG 1260
1261 TCCCTGCCCGGCTCTGCTGGTCTGGCTTCCCAAGCTCCAGCCAGGCTGCC 1320
1321 CACAGCTGCTTCCACCCCGGCTTCCAGTCCAGTCCCAAGCCAGGCTGCC 1380
1381 TGTCACTCCAGTGGGAGGAGTATCCCTCTTCTTCCAGCTTGAACCTCCTCTG 1440
1441 CACCTGACCACTTCTCCCGCCCGGATAGCTGCTGAGGACACCCACCGATGGGA 1500
1501 GCTTTCTCCCTTCCAGGCTCCTTCCAATAAAGAAAGAAACTGCTAAAAA 1560
1561 AAAAA 1566

【 図 3 】

Ecalectin mafsssqapylspavpfsgiqgglqdgliqi 31
KU-BL-50 MAPRGAQAPYMNPMVPFTGMIQGGLQDGLQI 31

Ecalectin tvngtvlsssgtrfavnfqtgfsndiafhf 62
KU-BL-50 TINGTFLMSSGSRFTVNLQTHRDNDIAFHF 62

Ecalectin nprfedgyvvcntrqngswgpeerkthmpf 93
KU-BL-50 NPRFEBGGYVVCNTRKQNGIWPPEERKMMPF 93

Ecalectin qkgmpfdlclfvqsdfkvmvngilfvqyfh 124
KU-BL-50 QRGHFPELSFLVQSSQFQVTVNGRLFVQYTH 124

Ecalectin rvpfhrvdtisvngsvqlysisfppgvwpa 155
KU-BL-50 RVPFHRVDTISVTGIVQLSYISFPPGRWPA 155

Ecalectin npapitqvtihvtvsapqmfstpaipppmy 186
KU-BL-50 NSAPITQVTIHTVQSTPGQMFPPNPIPMMAY 186

Ecalectin phpaypmpfittlgllypsk sillsgtvlp 217
KU-BL-50 PNPVFPPIPFASIPGGLYPSKSIMVSGTILP 217

Ecalectin saqrfhinlcsghniafhlnprfdenavvrn 248
KU-BL-50 SAQSFYINLRSGSDIAFHLPNPFKENAVVRN 248

Ecalectin tqidnswgseerslprkmpfvrgqsfvswil 279
KU-BL-50 TQIGSSWGPEERGLPRKMPFVRGQSFVSWIL 279

Ecalectin ceahclkvavdgqhlfeyyhrlnlptinrl 310
KU-BL-50 CESHCFKVAVDGQHLFEYHRLKHLPTINSL 310

Ecalectin evggdiqlthvqt 323
KU-BL-50 EVGGDIQLTHVQP 323

【図4】

Galectin-4-Nt	mayvpapgyqptlynpflpyyqipgglnvgmsvyyiqgva	39
Galectin-4-Ct	Instlptmegpptfnppvpyfgrlqggltarrtiiiikgyv	214
Galectin-8-Nt	MMLSLNLLQNIILYNPVIFFVGTIPDQLDPgTLIViRgltv	39
Galectin-8-Ct	PFARLNTPMGPgRTVVVKgEv	207
Ecalectin-Nt	--mafsssqapylspavpFsgliqggldqglqivngtv	37
Ecalectin-Ct	-----mmyphpaympfittilgglyPsksiilsglv	215
KU-BL-50-Nt	--MAFRGAQAPYMNPMVpFTGMiQggIQdLQiTiNgTv	37
KU-BL-50-Ct	-----mmyphpaympfittilgglyPsksiilsglv	215
Galectin-4-Nt	-selmkrffvnlvvgqdp--gsdva fhfnprfdgw-dk-	73
Galectin-4-Ct	-ppfgksfainfkvg----ssgdialhinprmg-n-g-t	245
Galectin-8-Nt	-PSADr fQvDLQNgSSMKPRAdVafhnprfKRA-G-C	75
Galectin-8-Ct	-NANAKSfVnDLAg----KSKdlalhlprLNIK--A	238
Ecalectin-Nt	Lssgtrfavnlqgfs----gndiafhfnprfedg-g-y	71
Ecalectin-Ct	Lp-sAqr fhnLcsg-----nhiafhlnprfden--a	244
KU-BL-50-Nt	LMSGSr fTvnLQTgHR----DNDiafhfnprfEEG-G-Y	71
KU-BL-50-Ct	Lp-sAqr fhnLcsg-----nhiafhlnprfden--a	244
Galectin-4-Nt	vvfntlqggkwgseer-krs-mpfkkg-aafelvfvla	109
Galectin-4-Ct	vvrsllngswgseek-kilthnplgg-qfdlsircgl	282
Galectin-8-Nt	IvCnTLINRkwgReel-TYD-TpFQKFKKSFEIVIMVLR	112
Galectin-8-Ct	FvRnSFLQESwgFeer-NITSPfSPg-MYFEMIiYCDV	275
Ecalectin-Nt	vvcnlrqngswgpeer-k-lhmpfkkg-mpfdcllvqs	107
Ecalectin-Ct	vvrtlqidnswgseerslprkmpfvrq-qsfsvwllcea	282
KU-BL-50-Nt	vvCnLQNGIwgPeer-K-MQMp fQRg-HPfELSFLYQS	107
KU-BL-50-Ct	vvrtlqidnswgseerslprkmpfvrq-qsfsvwllcea	282
Galectin-4-Nt	ehykvvngnpyeyghrl-plmvythlqvddlqlqsi	147
Galectin-4-Ct	drfkvyangqhlfdfahrIsafqvdtlleiagdvllsyv	321
Galectin-8-Nt	AKIqvAvngKhTLyGhrIGP-EKIdlIGIYgKVNIIISl	149
Galectin-8-Ct	REfkvAvngVhSLEyKhrfKEISSIdlIEINgdIHILEV	314
Ecalectin-Nt	sdfkvmvngilfvoyfhrv-pfhrvdtisvngsvqlsyi	145
Ecalectin-Ct	hclkvavdqhlfeyyhrlrnlptlnrlevggdiqlthv	321
KU-BL-50-Nt	SQIqvTvngrLFVQyThrv-PFHRVdLSvTglVQISYl	145
KU-BL-50-Ct	hclkvavdqhlfeyyhrlrnlptlnrlevggdiqlthv	321
Galectin-4-Nt	nfiggqplrpgppmppygpgghchq-----	175
Galectin-4-Ct	qi-----	323
Galectin-8-Nt	GFSPSSDLQSTQASSLELFEISRENVPKSGTPQLRL--	185
Galectin-8-Ct	RSW-----	318
Ecalectin-Nt	s fppgywpanpapiqlv i htvqsapqgm f s tpaipp	183
Ecalectin-Ct	qt-----	323
KU-BL-50-Nt	SPQPPGRWPANSAPITQTVIHTVQSTPGQMPNPMIPP	183
KU-BL-50-Ct	qt-----	323

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 [*] (参考)	
A 6 1 P	13/10	C 0 7 K	14/47	4 C 0 8 4
	35/00		16/30	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47		19/00	4 H 0 4 5
	16/30	C 1 2 N	1/15	
	19/00		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/08	A
	1/21	C 1 2 Q	1/02	Z
	5/10		1/68	D
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			Z
	33/566		33/577	B
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A

33/577

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

A

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 CA18 CB01 CB02
DA12 DA13 DA14 DA36 DA78
FB02 FB03

4B024 AA12 BA31 BA36 BA80 CA01
CA04 CA09 CA11 CA12 DA06
EA03 GA11 HA01 HA12

4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ03
QQ08 QQ13 QQ42 QQ53 QQ79
QR32 QR35 QR48 QR51 QR55
QR62 QR75 QR77 QR80 QR90
QS16 QS24 QS25 QS33 QS34
QS36

4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 CC24
DA14

4B065 AA19X AA26X AA49X AA50X
AA53X AA60X AA72X AA88X
AA90X AA93Y AB01 AB05
AC14 BA02 BA08 CA24 CA25
CA46

4C084 AA01 AA06 AA07 AA17 BA01
BA22 CA23 CA25 CA53 DA27
NA14 ZB262

4C085 AA03 BB01 CC03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41
CA40 CA41 DA75 DA76 DA86
EA51 FA72 FA73 FA74 HA05

专利名称(译)	人膀胱癌抗原		
公开(公告)号	JP2002112780A	公开(公告)日	2002-04-16
申请号	JP2000304144	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 A61P13/10 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/00.H A61K45/00 A61P13/10 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/30 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 G01N33/574.Z 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 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/BA31 4B024/BA36 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR90 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4B065/AA19X 4B065/AA26X 4B065/AA49X 4B065/AA50X 4B065/AA53X 4B065/AA60X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA23 4C084/CA25 4C084/CA53 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05		
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并将该cDNA导入λ噬菌体载体以感染大肠杆菌，从而制备了一个膀胱癌细胞cDNA文库，总共4.0 x 10⁵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-50等

カドシキ 番号 (種別記号)	分子量 (kDa)	単一性 (Glycosylated/Not glycosylated)	同源性 (GenBank/FASTA番号)	機能
K1-01-55	4	?	Hs.13207	5.8S rRNA
K1-01-56	0.5	1	Rosetta protein S1 (A93462)	ribosomal protein
K1-01-56	0.3	1	Rosetta protein S2 (A72966)	ribosomal protein
K1-01-57	2.2	1	Ba. C17-ribosomal protein (U35900)	modulator-binding of 50S C17 ribosomal protein
K1-01-58	1.1	1	Rosetta 5 (U36236)	ribosomal protein
K1-01-59	1.1	1	Rosetta 6 (U36237)	ribosomal protein
K1-01-60	1.6	1	Emagin factor 2 (A51469)	ribosomal protein
K1-01-62	1.4	1	SPT5 protein kinase 1 (U0954)	serine protein kinase
K1-01-64	2.4	1	Hemolysin protein (A03113)	hemolysin
K1-01-65	1.3	1	Sperm adhesion molecule (A58442)	sperm adhesion molecule protein
K1-01-66	2.8	1	Glucosylase mb (A76591)	glucosylase
K1-01-68	3.7	1	Phalloidin actin filamentin-1 (A08006)	actin filamentin
K1-01-69	1.8	1	Ig superfamily protein (U09497)	Ig superfamily
K1-01-70	1.1	1	46S ribosomal protein (A55751)	ribosomal protein
K1-01-71	2.2	1	PKS-1 (A51795)	serine protein kinase
K1-01-74	4	1	High density lipoprotein binding protein (A64088)	lipid transport
K1-01-75	2.3	1	L1c protease (A62746)	protease
K1-01-76	1.2	1	Phalloidin (A03094)	actin filamentin