

(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2001 - 333782

(P2001 - 333782A)

(43)公開日 平成13年12月4日(2001.12.4)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>              | 識別記号 | F I            | テ-マコード* ( 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 39/395 | U 4 B 0 2 4    |
| A 6 1 K 38/00                          |      | 45/00          | 4 B 0 6 3      |
| 39/395                                 |      | A 6 1 P 35/00  | 4 B 0 6 4      |
| 45/00                                  |      | C 0 7 K 14/00  | 4 B 0 6 5      |
| 審査請求 未請求 請求項の数 22 O L ( 全 19数 ) 最終頁に続く |      |                |                |

(21)出願番号 特願2000 - 161252(P2000 - 161252)

(22)出願日 平成12年5月30日(2000.5.30)

(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 木庭 幸子  
東京都国分寺市新町2 - 12 - 36  
(72)発明者 藤田 知信  
東京都板橋区幸町9 - 3  
(74)代理人 100107984  
弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト悪性黒色腫抗原

(57)【要約】

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

【解決手段】 悪性黒色腫細胞株から得られたmRNAを用いてRT - PCR法によりcDNAを作製し、このcDNAをλ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メラノーマ細胞cDNAライブラリー、合計 $7 \times 10^5$ 個のλファージcDNAクローンを、悪性黒色腫患者血清IgGを用いてスクリーニングすることにより、健常人とは反応せず、腫瘍細胞に選択的に発現するヒト悪性腫瘍抗原KU - MEL - 1を単離する。

## 【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 9 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 9 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 8 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 9 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 9 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 又は 5 記載のタンパク質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 又は 5 記載のタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 13】 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 記載の非ヒト動物。

【請求項 14】 被検物質と、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドとを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの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】 被検物質と、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの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】 請求項 14 又は 15 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 17】 請求項 14 又は 15 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 18】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド、又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項 19】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、又は請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド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 20】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ。

【請求項 21】 請求項 20 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癌の診断薬。

【請求項 22】 癌の診断薬が、悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、膀胱癌、腎癌、乳癌から選ばれた 1 または 2 以上の癌の診断薬であることを特徴とする請求項 21 記載の癌の診断薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、悪性黒色腫患者血清 IgG 抗体を用いて単離された悪性黒色腫抗原及びそれをコードする DNA、並びに悪性黒色腫抗原を用いた免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法、悪性黒色腫抗原を有効成分とする抗腫瘍剤、悪性黒色腫抗原をコードする DNA を用いる癌の診断用プローブ等に関する。

## 【0002】

【従来の技術】各種免疫療法の解析からヒト悪性黒色腫の生体内腫瘍拒絶には悪性黒色腫抗原を特異的に認識する CD8+T 細胞が重要な役割を果たすことが知られている。本発明者らは悪性黒色腫反応性 T 細胞を用いて cDNA 発現クローニング法を中心として様々な癌抗原を単離し (Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado C.H., et al : Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515-3519, 1994., Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. : Human tumor antigens recognized by T-cells. Immunol Res 16:313-339, 1997., Kawakami, Y. : Immunotherapy Using T Cell Defined Tumor Antigens for Melanoma. Microbiol. Immunol. 42:803-813, 1998.)、各種免疫療法を開発して臨床試験に参加してきた。本発明者らが作製した高 MHC 親和性改変 gp100 抗原ペプチドを用いた臨床試験では、現在効果的治療のない進行悪性黒色腫患者に対して 42% の奏

効率を認めている (Parkhurst, MR., Salgaller, M., Southwood, S., et al : Improved induction of melanoma reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp 100 modified at HLA-A0201 binding residues.

J. Immunol. 157:2539-2548, 1996., Rosenberg, S. A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D., et al : Immunologic and therapeutic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. Nature Med. 4:321-327, 1998.)。

【0003】また最近、担癌患者の腫瘍細胞の mRNA から作製した蛋白質を患者の自己血清でスクリーニングする S E R E X 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) が報告され (Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., et al : Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11810-11813, 1995)、悪性黒色腫、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌等において I g G 抗体が認識する癌抗原を、上記 S E R E X 法により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)。またこの S E R E X 法により患者血清中の I g G 抗体が反応する癌細胞蛋白は、C D 4+T 細胞だけでなく、C D 8+T 細胞の標的抗原にもなりうる事が明らかになった (Old, L. J. and Chen, Y. T.: New paths in human cancer serology. J Exp Med. 187:1163-1167, 1998)。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。本発明の課題は、癌の診断・治療に応用することができる悪性黒色腫抗原や、それをコードする遺伝子等を提供することにある。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、悪性黒色腫細胞株から得られた mRNA を用いて R T - P C R 法により c D N A を作製し、この c D N A を λ 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悪性黒色腫細胞 c D N A ライブラリー、合計  $7 \times 10^5$  個の λ ファージ c D N A クローンを、悪性黒色腫患者血清中の I g G 抗体を用いて逐一スクリーニングし、健康人血清とは反応せず、腫瘍細胞に選択的に発現するヒト悪性黒色腫抗原 K U - M E L - 1 を見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする D N A (a) 配列番号 9 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 9 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 8 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 D N A (請求項 2) や、請求項 2 記載の D N A 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 D N A (請求項 3) や、配列番号 9 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 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質 (請求項 5) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド (請求項 6) や、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、マーカートンパク質及び / 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) に関する。

【0007】また本発明は、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 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) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質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 又は 5 記載のタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物 (請求項 12) 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 記載の非ヒト動物 (請求項 13) に関する。

【0008】さらに本発明は、被検物質と、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドとを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの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 14)

や、被検物質と、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの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、請求項 14 又は 15 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 16) や、請求項 14 又は 15 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 17) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド、又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を有

効成分として含有する抗腫瘍剤（請求項 18）や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、又は請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド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 19）や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ（請求項 20）や、請求項 20 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癌の診断薬（請求項 21）や、癌の診断薬が、悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、腎癌、乳癌から選ばれた 1 または 2 以上の癌の診断薬であることを特徴とする請求項 21 記載の癌の診断薬（請求項 22）に関する。

#### 【0009】

【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 9 に示される悪性黒色腫由来の悪性黒色腫抗原 KU-MEL-1 や、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質を例示することができ、ここで免疫誘導活性とは、抗体産生、細胞性免疫、免疫寛容等の免疫反応を誘導する活性をいい、かかる免疫誘導活性の中でも、末梢血の細胞障害性 T 細胞（CTL）前駆細胞の頻度を上昇させる T 細胞誘導活性を有するものが特に好ましい。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「本悪性黒色腫抗原」ということがある。なお、本悪性黒色腫抗原の由来はヒトに限定されるものではない。

【0010】本発明の対象となる DNA としては、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 KU-MEL-1 をコードする DNA、配列番号 9 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 8 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、あるいは該 DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA であれば特に制限されるものではないが、配列番号 8 に示される悪性黒色腫抗原 KU-MEL-1 をコードする cDNA をより具体的に例示することができる。かかる悪性黒色腫抗原 KU-MEL-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、悪性黒色腫細胞株から得られた mRNA を用いて RT-PCR 法により増幅した cDNA を λ 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悪性黒色腫細胞 cDNA ライブラリーを、進行悪性黒色腫患者血清を用いてスクリーニングし、悪性黒色腫患者血清のみに反応し、健康人血清とは反応せず、悪性黒色腫を含む癌細胞に発現する本悪性黒色腫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。

【0011】また、配列番号 8 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種悪性黒色腫由来の DNA ライブラリーに対してストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズする DNA を単離することにより、悪性黒色腫抗原 KU-MEL-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。かかる 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 °C でのハイブリダイゼーション、及び 1 × SSC、0.1 % の SDS を含む緩衝液による 42 °C での洗浄処理を挙げることができ、65 °C でのハイブリダイゼーション、及び 0.1 × SSC、0.1 % の SDS を含む緩衝液による 65 °C 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エ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エンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

【0012】本発明の融合タンパク質や融合ペプチドとしては、本悪性黒色腫抗原とマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体の Fc 領域、HRP、GFP などを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Myc タグ、His タグ、FLAG タグ、GST タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTA と His タグの親和性を利用した悪性黒色腫抗原 KU-MEL-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、悪性黒色腫抗原 KU-MEL-1 等に対する抗体の定量、悪性黒色腫の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0013】本発明の前記タンパク質やペプチドに特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体

等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記悪性黒色腫抗原KU-MEL-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、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、例えば、悪性黒色腫等の診断、ミサイル療法等の治療ばかりでなく、悪性黒色腫等の悪性腫瘍の発症機構を明らかにする上で有用である。

【0014】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）に本悪性黒色腫抗原若しくはエピトープを含むその断片、又は該タンパク質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。

【0015】本発明の上記本悪性黒色腫抗原に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その本悪性黒色腫抗原を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本悪性黒色腫抗原やその抗原エピトープを含むペプチドに対する抗体は、悪性黒色腫等の診断や治療に使用できる可能性がある。そして、これら抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチドも、前記のように本発明の本悪性黒色腫抗原に包含される。

【0016】本発明はまた、上記本悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(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、スクレイピング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、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悪性黒色腫細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。

【0017】また、発現系としては、上記本悪性黒色腫抗原を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0018】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悪性黒色腫抗原は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel（Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997）らの方法などを用いることができ、また、かかる本悪性黒色腫抗原を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまた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、本悪性黒色腫抗原に対する抗体を結合させたカラムや、上記本悪性黒色腫抗原に通常のパеп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、本悪性黒色腫抗原を得ることができる。

【0019】本発明において、上記本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、本悪性黒色腫抗原を発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で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悪性黒色腫抗原を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、

本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0020】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、本悪性黒色腫抗原欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、本悪性黒色腫抗原のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

【0021】例えば、本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち本悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、本悪性黒色腫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悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲティングベクターを作製する。

【0022】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、本発明の本悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスを作製することができる。また、本悪性黒色腫抗原ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等

により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0023】本悪性黒色腫抗原のトランスジェニックマウスは、本悪性黒色腫抗原をコードするcDNAにチキンβ-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β-グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0024】また、上記本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子若しくはDNA、本悪性黒色腫抗原、本悪性黒色腫抗原とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質、本悪性黒色腫抗原に対する抗体、本悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞等は、以下に具体的に説明するように、悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、乳癌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、サプレッサー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。

【0025】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、被検物質と本悪性黒色腫抗原とを接触せしめ、該本悪性黒色腫抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検物質と本悪性黒色腫抗原を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該本悪性黒色腫抗原の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、前記本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、本発明の本悪性黒色腫抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができ、かかる細胞膜又は細胞と被検物質との接触方法としては、被検物質の存在下に本悪性黒色腫抗原を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養する方法や、本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物に被検物質を投与する方法等を挙げることができる。

【0026】上記被検物質と本悪性黒色腫抗原とを用い

たスクリーニング方法について、以下に具体的に例を挙げて説明するが、本発明のスクリーニング方法はこれらに限定されるものではない。上記被検物質と本悪性黒色腫抗原とを接触せしめ、該本悪性黒色腫抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、例えば、末梢血リンパ球から通常のインターロイキン-2を用いてインビトロで多量に増殖させた腫瘍浸潤T細胞の存在下に被検物質と本悪性黒色腫抗原とを接触せしめ、CTLなどのT細胞の誘導活性の増減を測定し、被検物質が非存在下の対照の場合と比較・評価する方法を具体的に例示することができる。また、上記被検物質と本悪性黒色腫抗原を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該本悪性黒色腫抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、本悪性黒色腫抗原発現細胞を被検物質の存在下で培養し、一定時間培養後細胞膜表面に発現された本悪性黒色腫抗原が減少又は増加したことを、本発明の本悪性黒色腫抗原に特異的に結合する抗体を用いて、ELISA等による免疫化学的に検出して、あるいはmRNAの発現が抑制又は促進したこと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。上記mRNAの検出法は、DNAチップ、ノーザンハイブリダイゼーション等の方法で行なうことができる他、本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつないだ遺伝子を導入した細胞を用いると、被検物質による本悪性黒色腫抗原をコードする遺伝子の発現抑制又は促進は、前記レポーター遺伝子の活性を指標に検出することが可能である。

【0027】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、本悪性黒色腫抗原又はこれに対する抗体を有効成分として含有する悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、腎癌、乳癌等に対する抗腫瘍剤に関する。例えば、本悪性黒色腫抗原を経口、静脈、皮内、皮下注射等により投与すると、インビボにおけるT細胞誘導活性が増大することによる抗腫瘍効果が期待できる。また上記抗体はミサイル療法に用いることができる。本発明はまた、本悪性黒色腫抗原とのインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞に関する。例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球にIL-2とともに本悪性黒色腫抗原で刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。また本悪性黒色腫抗原を強力な抗原提示細胞である樹状細胞にインビボあるいはインビトロで発現させて、その抗原発現樹状細胞投与により免疫誘導を行うことができる。

【0028】さらに本発明は、本悪性黒色腫抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一

部からなる癌の診断用プローブや、この癌の診断用プローブや本悪性黒色腫抗原に特異的に結合する抗体を含有する悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、腎癌、乳癌等の癌の診断薬に関する。上記診断用プローブとしては、本悪性黒色腫抗原をコードするDNA(cDNA)又はRNA(cRNA)のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ(少なくとも20ベース以上)を有するものが好ましく、例えば、検体から得られた遺伝子と、本悪性黒色腫抗原をコードするDNA配列とを比較することにより、悪性黒色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。

【0029】

【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。

[細胞株と組織] ヒト悪性黒色腫細胞株(SKmel23、888mel、624mel、501mel、397mel、A375mel、928mel、526mel、586mel、1362mel及び1363mel)、ヒトグリオーマ細胞株(U87MO)、大腸癌細胞株(colo320、WIDv、SW837)、食道癌細胞株(TE1、TE2、TE3、TE4、TE5、TE6、TE8)、肺癌細胞株(K1S、EBC1、RERF-LC-MA)、白血病細胞株(HL60、K562、Molt 4)、腎細胞癌細胞株(RCCS)、乳癌細胞株(MDA231)、大腸癌細胞株(colo201、RCM-1)、前立腺癌細胞株(PC3)を、それぞれペニシリン(100IU/ml)とストレプトマイシン(100µg/ml)を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMIで培養した。膵癌細胞株(PK1、PK8、PK9、PK45、PK59)をそれぞれ、ペニシリン/ストレプトマイシン(1%)、L-グルタミン(1%)、HEPES(10mM)、EGF(6µg/l)、インシュリン(150U/l)、ヒドロコルチゾン(0.5mg/l)、トランスフェリン(10mg/l)を添加した10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640で培養した。腫瘍浸潤T細胞をリコンビナントIL2(6000IU/ml)、ペニシリン(100IU/ml)及びストレプトマイシン(100µg/ml)を添加した10%のhuman AB serum Iscoves DMEMで培養した。EBウイルス感染B細胞(EBV-B cell)、白血病患者の皮膚由来の線維芽細胞をペニシリン(100IU/ml)及びストレプトマイシン(100µg/ml)を添加した10%のウシ胎児血清を含む

RPMI 1640で培養した。色素細胞 (Honjou 博士から分与; Morinaga Institute of Biological Science) を血清の入っていないMM-4培地 (森永社製) で培養した。悪性黒色腫組織は手術時に患者から切除し、液体窒素にて凍結させ使用まで-80にて保存した。

【0030】[cDNAライブラリーの作製] 上記悪性黒色腫細胞株SKmel23及び培養色素細胞から塩化セシウム超遠心法により全RNAを単離し、oligo-dT (Oligotex-dT super, TAKARA, Kyoto, Japan) を用いたポリ(A)セレクションを2回行いmRNAを精製した。この得られたmRNA (5 µg) を用いてSKmel23のcDNAライブラリーを構築した。一本鎖cDNAは、Hind IIIランダムプライマー (Novagen, Madison, WI, USA) と5-methyl dCTPを用いて合成した。この一本鎖cDNAからT4 DNA polymeraseにより平滑末端を有する二本鎖cDNAを合成し、この二本鎖cDNAの両端に制限酵素サイト (Eco RI/Hind III) を含むリンカーを付加した。cDNAフラグメントをバクテリオファージ発現ベクターλスクリーン (Novagen, Madison WI, USA) に挿入し、 $1.8 \times 10^6$ 個のクローンからなるcDNAライブラリーが得られた。また、SKmel23及び培養色素細胞の各mRNA (5 µg) を用いてcDNAライブラリーを構築した。一本鎖cDNAは、内部Xho I部位及び5-methyl dCTPとともにoligo-dTプライマーを用いて合成した。cDNAをEco RIアダプターに連結し、Xho Iで消化した。cDNAフラグメントをバクテリオファージ発現ベクターλZap II (Stratagene) に挿入してファージ粒子としてE.coliをトランスフォームするのに用い、それぞれ $3 \times 10^6$ 個と $1 \times 10^6$ 個のクローンからなるcDNAライブラリーが得られた。

【0031】[血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング] 上記作製したSKmel23のcDNAライブラリーを15 cm<sup>2</sup> XYTアガロースプレートに $1 \times 10^4$ クローンで播き、37で6時間培養して大腸菌BL21 (DE3) pLysE上で10 mMのIPTGにより誘導し、発現させ、ニトロセルロースメンブラン (Hybond-c, Amersham, Buckinghamshire, England) に転写し、TBS-Tween [0.5%のTween 20を含むTBS (10 mMのTris-HCl, 150 mMのNaCl; pH 7.5)] でフィルターを洗浄することにより吸着したバクテリア、ファージを除去した後、5%の脱脂粉乳を含むTBS-Tweenにて非特異反応を抑制した。このフィルターを100倍希釈した患者血清と室温で3~4時間反応させた。

【0032】上記患者血清としては、悪性黒色腫に尋常性白斑を合併し、原発巣の一部が自然退縮を示した82歳の女性患者から採取した血清を用いた。これらの血清

は-80で保存し、使用直前に5容量%の脱脂粉乳を含むTBS-Tween (0.5%のpolyoxyethylenes orbitan monolaurateを含むTBS-Tween) 溶液で100倍に最終的に希釈したものをを用いた。この希釈した血清を、大腸菌のライセートと1:5の割合で混合し、4で8時間放置後15000回転にて20分間遠心し上清を回収したものをを用いた。

【0033】かかる処理血清と上記融合蛋白質をプロットしたニトロセルロースフィルターとを室温で3~4時間反応させて血清中の抗体が反応したコロニーを、二次抗体として4000倍に希釈した抗ヒトIgG-Fc抗体 (anti human IgG Fc goat antibody alkaline phosphate conjugated CAPPEL) を用いて反応させ、Nitroblue tetrazolium (Boehringer) と5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl (SIGMA) を用いた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コロニーを15 cm<sup>2</sup> XYT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MgSO<sub>4</sub>, 50 mMのTris-HCl, 0.01%のgelatin; pH 7.5) に溶解させた。発色反応陽性コロニー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と反応する $7 \times 10^5$ 個のファージクローンをスクリーニングして、陽性クローン50個を単離した。

【0034】上記得られた50個の陽性クローンからPCR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ExTaq (TAKARA) を用い、センスプライマーにSP6 (5'-ATTTAGGTGACACTAATA-3'; 配列番号1)、アンチセンスプライマーにT7-terminator (5'-GCTAGTTATTTGCTCAGCGG-3'; 配列番号2) 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94で1分間熱変性させ、55で2分間アニーリングし、72で3分間伸張反応させるというサイクルで35サイクル繰り返し行った。得られたPCR産物を、Big Dye DNA Sequencing Kit (ABI) とABI Prism (Perkin Elmer) とを用いてDNAシーケンスを行い、塩基配列の決定されたDNAを、米国国立生体工学情報センターの遺伝子データベース又はESTデータベースにおいて登録されている遺伝子情報との間で比較し、既知の遺伝子との相同性を検索した。この結果、上記50個の陽性クローンは、20種類の既知蛋白をコードするcDNA (表1) と6種類の機能不明蛋白をコードするcDNA (表2) の26種類の抗原cDNAであることがわかった。

【0035】

【表1】

| Name of cDNA | Number of positive clones | UniGene cluster | Protein feature                                 | Functional significant                  |
|--------------|---------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| NS 1         | 11                        | Hs.129673       | eukaryotic translation initiation factor 4A1    | translation                             |
| NS 2         | 5                         | Hs.621          | galectin-3                                      | cell proliferation, cell adhesion       |
| NS 3         | 2                         | Hs.74136        | eukaryotic translation initiation factor 2Bbeta | translation                             |
| NS 4         | 2                         | Hs.74456        | histone macro H2A1.2                            | construct of nucleosome                 |
| NS 5         | 2                         | Hs.74456        | RBP-1 like protein                              | unknown                                 |
| NS 6         | 1                         | Hs.4552         | ubiquitin 1                                     | unknown                                 |
| NS 7         | 1                         | Hs.8997         | heat shock protein 70                           | molecular chaperone                     |
| NS 8         | 1                         | Hs.84055        | heat shock protein 90                           | molecular chaperone                     |
| NS 9         | 1                         | Hs.108623       | thrombospondin-2                                | angiogenesis, adhesion, migration       |
| NS 10        | 1                         | Hs.169531       | Gu protein                                      | platelet aggregation                    |
| NS 11        | 1                         | Hs.76689        | HLA-DR associated protein 1                     | nucleolar RNA helicase                  |
| NS 12        | 1                         | Hs.124373       | anti-Fas induced apoptosis TOSO                 | inhibit T cell apoptosis                |
| NS 13        | 1                         | Hs.119122       | 60s ribosomal protein L13a                      |                                         |
| NS 14        | 1                         | Hs.79172        | G/T mismatch specific thymine DNA glycosidase   | mismatch repair                         |
| NS 15        | 1                         | Hs.66191        | adenine nucleotide translocator-2               |                                         |
| NS 16        | 1                         | Hs.66191        | topoisomerase III beta                          | enzyme for change number of DNA linking |
| NS 17        | 1                         | Hs.102824       | tropomyosin 4                                   | cytoskeleton                            |
| NS 18        | 1                         | Hs.62461        | ARP-2                                           | cytoskeleton                            |
| NS 19        | 1                         | Hs.110782       | beta actin                                      | cytoskeleton                            |
| NS 20        | 1                         | Hs.75653        | fumarase                                        | enzyme of citric acid cycle             |

## 【0036】

## 【表2】

| Name of cDNA | Number of positive clones | UniGene cluster | Accession number | Definition  | Chromosome location |
|--------------|---------------------------|-----------------|------------------|-------------|---------------------|
| NS 21        | 8                         | Hs.109005       |                  | EST         |                     |
| NS 22        | 1                         | Hs.6937         | R24771, AA379762 | EST         | chr.1               |
| NS 23        | 1                         | Hs.21572        |                  | EST         |                     |
| NS 24        | 1                         | Hs.15165        | DFKZP564G013     | Genomic DNA | chr.5               |
| NS 25        | 1                         |                 | AC005924         | Gene Bank   | chr.14              |
| NS 26        | 1                         | Hs.151195       | AA160412         | EST         |                     |

【0037】上記既知蛋白抗原をコードする遺伝子のうち、eukaryotic initiation factor4A1には11個、galectin-3には5個、eukaryotic initiation factor 2Bbetaやhistone macro H2A1.2やRBP-1 like proteinにはそれぞれ2個の同一クローンが検出され、残りのものについてはそれぞれ1個のみ検出された。また、上記6種類の機能不明蛋白をコードする遺伝子のうち、4種類の単離されたcDNAはESTデータベースに登録されており、他の2種類のcDNAは遺伝子DNAデータベースに登録されていた。NS21クローンにおいては8個の単離遺伝子が属していた。

【0038】[各種癌患者と健常人血清における各抗原に反応するIgG抗体の検出]癌患者に選択的に免疫反応が起こる抗原を検索するために、表3に示す11種類の抗原を用いて、これらを認識する血清中IgG抗体の存在を、cDNAスクリーニングに用いた患者を含む悪性黒色腫患者15人と、脳腫瘍、腎癌、大腸癌、食道癌患者各5人と、慢性骨髄性白血病患者1人と、健常人16人の100倍に希釈したそれぞれの血清を用いて検討

した(表3)。その結果、NS21(KU-MEL-1)、Gu protein(NS10)、及びNS25は悪性黒色腫患者や他の癌患者の血清において検出されたが、16人の健常人の血清においては検出することができなかった。galectin3(NS2)、NS15、及びNS23においては上記のcDNAのスクリーニングに用いた悪性黒色腫患者の血清だけに反応し、NS26においては15人の悪性黒色腫患者血清のうち4人の悪性黒色腫患者血清と、16人の健常人血清のうち1人の健常人血清に反応していた。また、eukaryotic initiation factor 4A1(NS1)、NS22、NS24、及びRBP-1 like protein(NS5)は癌患者と健常人の血清に反応していた。しかし、NS21(KU-MEL-1抗原)は、テストした全ての癌患者血清中において抗体が検出されたが、健常人血清中においては抗体を検出することができなかった。

## 【0039】

## 【表3】

18

|                     | Melanoma<br>n=15 | Brain tumor<br>n=5 | Renal cell ca.<br>n=5 | Esophageal ca.<br>n=5 | Colorectal ca.<br>n=5 | CML<br>n=1 | Healthy<br>individuals |
|---------------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------------|
| NS 21<br>(KU-MEL-1) | 2/15             | 2/5                | 1/5                   | 2/5                   | 3/5                   | 1/1        | 0/16                   |
| Gu protein          | 2/15             | 0/5                | 1/5                   | 1/5                   | 1/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 25               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 2/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| Galectin-3          | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 23               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 15               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 26               | 4/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 1/16                   |
| eIF 4A1             | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 1/16                   |
| NS 22               | 4/15             | 1/5                | 3/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 3/16                   |
| NS 24               | 5/15             | 2/5                | 1/5                   | 1/5                   | 1/5                   | 1/1        | 2/16                   |
| NS 5                | 4/15             | 2/5                | 2/5                   | 2/5                   | 2/5                   | 1/1        | 1/15                   |

【0040】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのRT-PCR法]次に癌患者血清のみと反応する抗原遺伝子、NS21(KU-MEL-1)、NS23、NS8、NS25、及びNS15の遺伝子の各組織における発現特異性を、腫瘍細胞株、正常細胞株、及び正常組織から得たmRNAを用いてRT-PCR法により調べてみた。腫瘍細胞株や悪性黒色腫組織由来の全RNAは、グアニジン-塩化セシウム超遠心法により単離した。また、正常組織由来の全RNAは全てクローンテック社より購入した。これらの全RNAを各2μgづつ使用し、DNA合成キット(Beckmann)によりcDNAを合成し、それぞれのcDNAに特異的なPCRプライマーセット(Taq kit, TAKARA)を使用して、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)を用いて94で30秒間熱変性させ、72で1分間伸張反応させるというサイクルで20、30及び35サイクル繰り返し行った。アニーリング温度はプライマーのTm値に合わせて設定した。このPCR産物をアガロースゲル電気泳動(1.5%)にかけ、エチジウムブロマイド(EtBr)で染色し、254nmの紫外線照射によりバンドを検出した。この結果から、NS23、NS8、NS25及びNS15は、多くの腫瘍細胞株だけではなく、正常組織及び細胞株においても発現していることがわかった。NS21においては、腫瘍細胞株及び培養色素細胞で強発現を示したが、脳組織ではわずかな発現が検出されただけであった。

【0041】また、上記KU-MEL-1(NS21)に対しては使用するパネルを増やし、再びRT-PCRを行った。使用したパネルは、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、大腸、脾臓、精巣、膵臓、胎盤、筋肉の正常組織11種(全てクローンテック社製より購入)と、T細胞、EBウイルス感染B細胞(888EBV-B及び1088EBV-B)、線維芽細胞、色素細胞の正常培養細胞5種と、SKmel23、888mel、A375mel、1363mel、928mel、624mel、5

86mel、526mel、501Amel、397mel、1362mel(悪性黒色腫細胞株)、MEL28(悪性黒色腫組織)、U87MO(ヒトグリオーマ細胞株)、K1S、EBC1、RERF-LC-MA(肺癌細胞株)、TE8(食道癌細胞株)、HL60、K562、Mol14(白血病細胞株)、RCCS(腎細胞癌細胞株)、PK1(膵癌細胞株)、MDA231(乳癌細胞株)、PC3(前立腺癌細胞株)の腫瘍培養細胞及び組織24種の合計40種を用いた。

【0042】KU-MEL-1には、センスプライマーとして(KU-MEL-1の遺伝子の360番目から381番目までの塩基配列:5'-CTATCTCCACATCCATTTTGCC-3';配列番号3)を、アンチセンスプライマーとしてT3プライマー(5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3';配列番号4)を作製し、熱変性94で30秒間、アニーリング56で30秒間、伸長反応72で1分間の条件で30サイクルのPCRを行った。コントロールとしてβアクチン(838bp)の発現を確認するため、βアクチンに特異的なセンスプライマー(5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3';配列番号5)とアンチセンスプライマー(5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3';配列番号6)を用いて、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分間の条件で25サイクルのPCRを行った。これらのPCRにより得られたPCR産物(cDNA)をアガロースゲル電気泳動(1.5%)にかけ、エチジウムブロマイド(EtBr)で染色し254nmの紫外線照射によりバンドを検出した。結果を図1に示す。

【0043】図1の結果から、ほとんどの悪性黒色腫細胞株と培養色素細胞ではKU-MEL-1が強く発現し、腺癌、扁平上皮細胞癌、及び悪性黒色腫組織においてもKU-MEL-1の発現を確認することができた。

しかし、KU-MEL-1は、精巢を除くほとんどの正常組織において発現していなかった。

【0044】[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]正常組織(肺、大腸、脾臓、精巢、子宮、胎盤、骨髄)由来のRNA7種、正常細胞[T細胞、EBウイルス感染B細胞(888EBV-B及び1088EBV-B)、線維芽細胞(Fibroblast A、Fibroblast B)、色素細胞]由来のRNA6種、悪性黒色腫細胞株(SKmel23、888mel、A375mel、1363mel、928mel、624mel、586mel、526mel、501mel、397mel)、悪性黒色腫組織(MEL6、MEL7、MEL10、MEL28)、ヒトグリオーマ細胞株(U87MO)、肺癌細胞株(K1S、EBC1、RERF-LC-MA)、食道癌細胞株(TE8)、白血病細胞株(HL60、K562、Molt 4)、腎細胞癌細胞株(RCCS)、MDA231(乳癌細胞株)由来のRNA24種の計37種のRNAでKU-MEL-1に対するノーザンブロットを行った。RNA(各5.5μg)を、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランフィルター(Hybond N+, Amersham)に移した。

【0045】次にKU-MEL-1に特異的なセンスプライマー(配列番号3)とアンチセンスプライマー(KU-MEL-1の遺伝子の517番目から496番目までの塩基配列:5'-GGGCATAGAAAGGAAGAACTC-3';配列番号7)とを用いてPCRを行い、長さ152bpのKU-MEL-1の遺伝子断片を作製した。作製した遺伝子断片をHigh Prime DNA Labeling Kit(Boehringer)を用いて<sup>32</sup>Pでラベリングしたプローブとし、Quick Hyb solution(Stratagene)をハイブリダイゼーションバッファーとして用いてナイロンメンブランフィルターを浸し、68℃で20分間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中により68℃で1時間ハイブリダイゼーションした。次いで、このハイブリダイゼーションしたナイロンメンブランフィルターを洗浄液I(2×SSC、0.1%のSDS)で室温で15分間2回洗浄し、洗浄液II(0.1×SSC、0.1%のSDS)で60℃で30分間1回洗浄した。洗浄したナイロンメンブランフィルターを、Molecular Imager(BIORAD)を用いて放射性シグナルの検出を行った。結果を図2に示す。

【0046】図2に示されているように約2800bpの位置にバンドが認められ、KU-MEL-1はほとんどの悪性黒色腫細胞株及び培養色素細胞で発現することがわかった。しかし、4種類の悪性黒色腫細胞株においてはわずかの発現しか認められなかった。また、KU-\*

\*MEL-1は、脳腫瘍、肺ガン、食道ガン、乳ガン等、さまざまな癌細胞株で発現していたが、悪性造血細胞(hematopoietic malignant cells)においては発現が確認できなかった。試験した正常組織のうち、僅かではあるが精巢でKU-MEL-1の発現が認められたが、ほとんどの正常組織では発現がみられなかった。正常培養細胞では、線維芽細胞においてわずかだが発現が確認できた。このように、KU-MEL-1はRT-PCR及びノーザンブロットの結果より、腫瘍細胞においてKU-MEL-1が高発現することや、正常細胞では培養色素細胞以外にはわずかにしか発現が認められないことや、抗KU-MEL-1抗体が癌患者にのみ存在することから、KU-MEL-1が診断・治療方法の発展に役立つと考えられる。

【0047】[KU-MEL-1抗原の塩基配列とアミノ酸配列の決定]KU-MEL-1の全長cDNAは、oligo-dTプライマーを用いて作製したSKmel23又は色素細胞のλファージのcDNAライブラリーからPCRで作製したNS21プローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行うことにより単離した。単離したKU-MEL-1の全長cDNAをノーザンブロット法により解析した結果、全長がおよそ2.8kbであることがわかった。この2.8kbのcDNAのうち、3'末端から2196bpの塩基配列(配列番号8)を決定した。この決定した塩基配列中において、始めのATGの5'側にはコザック配列(AXXATGG)とストップコドン(TAA)が存在することから、ATGを第一メチオニンとする2007bpのopen reading frameをもつ669アミノ酸からなるKU-MEL-1の蛋白が明らかとなった。この塩基配列及びアミノ酸配列を用いてデータベース検索を行ったが、構造からこの蛋白の機能を推定できるような情報は得られなかった。また、KU-MEL-1のcDNA配列の1部分は、ESTデータベースに登録されているUniGene HS.109005と相同性を示していたが、他の部分においてはデータベース上においてホモロジーのある遺伝子が存在しなかったことから、KU-MEL-1は新規なタンパク質であることが確認できた。

#### 【0048】

【発明の効果】本発明によると、生理的に重要である悪性黒色腫抗原KU-MEL-1活性を有するタンパク質、それをコードするDNAを提供することができる。また、それら悪性黒色腫抗原や遺伝子DNAは、悪性黒色腫、食道癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、膵癌、腎癌、乳癌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に用いることができる。

#### 【0049】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<120> Human Malignant Melanoma  
Antigens  
<130> 2000-017  
<140>  
<141>  
<160> 9  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:SP6 Primer  
<400> 1  
atttaggtga cactaata  
18  
<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:T7-terminator  
Primer  
<400> 2  
gctagttatt gctcagcgg  
19  
<210> 3  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:KU-MEL-1 Sense  
Primer  
<400> 3  
ctatctccac atccattttg cc  
22  
<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:T3 Primer  
<400> 4  
aattaaccct cactaaaggg  
20  
<210> 5  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:Beta-Actin  
 Specific Antisense Primer  
 <400> 6  
 cgtcactc ctgcttgctg atccacatct gc  
 32  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:KU-MEL-1  
 Antisense Primer  
 <400> 7  
 gggcatagaa aggaagaaac tc  
 22  
 <210> 8  
 <211> 2196  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (67)..(2073)  
 <400> 8  
 gcgagtgtcc gcggccgagc agcagagatt ttg  
 ctgtga gaattaatta ccagtaacag 60  
 ttcaat atg ggg gac att ctg gct cat gaa t  
 ct gaa tta ctt gga cta 108  
 Met Gly Asp Ile Leu Ala His Glu Ser  
 Glu Leu Leu Gly Leu  
 1 5 10  
 gtg aaa gag tat tta gat ttt gct gaa ttt  
 gaa gac acc ttg aaa aca 156  
 Val Lys Glu Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Phe  
 Glu Asp Thr Leu Lys Thr  
 15 20 25 30  
 ttt tca aaa gaa tgc aaa ata aaa gga aaa  
 cca ctg tgt aaa aca gta 204  
 Phe Ser Lys Glu Cys Lys Ile Lys Gly Lys  
 Pro Leu Cys Lys Thr Val  
 35 40 45  
 ggc gga tct ttc aga gac tcc aaa tca ttg  
 aca att cag aag gat ctt 252  
 Gly Gly Ser Phe Arg Asp Ser Lys Ser Leu  
 Thr Ile Gln Lys Asp Leu  
 50 55 60

|                                         |     |     |
|-----------------------------------------|-----|-----|
| 115                                     | 120 | 125 |
| tac ttc aaa acc tac ctg gag acc aaa ggg |     |     |
| gca gcc ttg agc cag acc 492             |     |     |
| Tyr Phe Lys Thr Tyr Leu Glu Thr Lys Gly |     |     |
| Ala Ala Leu Ser Gln Thr                 |     |     |
| 130                                     | 135 | 140 |
| aca gag ttt ctt cct ttc tat gcc ctt cct |     |     |
| ttt gtt ccc aac cct atg 540             |     |     |
| Thr Glu Phe Leu Pro Phe Tyr Ala Leu Pro |     |     |
| Phe Val Pro Asn Pro Met                 |     |     |
| 145                                     | 150 | 155 |
| gtg cac ccc tca ttt aaa gaa ctc ttc cag |     |     |
| gat tcc tgg act cca gag 588             |     |     |
| Val His Pro Ser Phe Lys Glu Leu Phe Gln |     |     |
| Asp Ser Trp Thr Pro Glu                 |     |     |
| 160                                     | 165 | 170 |
| tta aag ttg aag ttg gaa aag ttt cta gct |     |     |
| tta ata tct aaa gcc agc 636             |     |     |
| Leu Lys Leu Lys Leu Glu Lys Phe Leu Ala |     |     |
| Leu Ile Ser Lys Ala Ser                 |     |     |
| 175                                     | 180 | 185 |
| 90                                      |     | 1   |
| aac acg cca aag ctt tta aca ata tat aag |     |     |
| gag aat gga caa agt aac 684             |     |     |
| Asn Thr Pro Lys Leu Leu Thr Ile Tyr Lys |     |     |
| Glu Asn Gly Gln Ser Asn                 |     |     |
| 195                                     | 200 | 205 |
| aaa gaa atc ttg cag cag ctc cac cag cag |     |     |
| ctg gtt gaa gct gaa cgt 732             |     |     |
| Lys Glu Ile Leu Gln Gln Leu His Gln Gln |     |     |
| Leu Val Glu Ala Glu Arg                 |     |     |
| 210                                     | 215 | 220 |
| agg tca gtg aca tac ctc aaa cgg tac aat |     |     |
| aag atc cag gcc gac tac 780             |     |     |
| Arg Ser Val Thr Tyr Leu Lys Arg Tyr Asn |     |     |
| Lys Ile Gln Ala Asp Tyr                 |     |     |
| 225                                     | 230 | 235 |
| cac aat ctc att gga gtc aca gca gag ctg |     |     |
| gtg gat tct cta gag gcc 828             |     |     |
| His Asn Leu Ile Gly Val Thr Ala Glu Leu |     |     |
| Val Asp Ser Leu Glu Ala                 |     |     |
| 240                                     | 245 | 250 |
| aca gtc agc ggc aag atg atc acc cct gag |     |     |
| tac ctc cag agc gtc tgt 876             |     |     |
| Thr Val Ser Gly Lys Met Ile Thr Pro Glu |     |     |
| Tyr Leu Gln Ser Val Cys                 |     |     |
| 255                                     | 260 | 265 |
| 70                                      |     | 2   |
| gtc cgc ctg ttc agt aac cag atg cgg cag |     |     |
| agc ctg gcg cat agt gtg 924             |     |     |
| Val Arg Leu Phe Ser Asn Gln Met Arg Gln |     |     |
| Ser Leu Ala His Ser Val                 |     |     |

acg agc gac gtg gtg cgg cag tac atg gcc  
 agg ctc atc aat gct ttt 1260  
 Thr Ser Asp Val Val Arg Gln Tyr Met Ala  
 Arg Leu Ile Asn Ala Phe  
 385 390 395  
 gcg tca ctg gca gaa ggt cgc ctc tac ctt  
 gcc cag aac aca aag gtg 1308  
 Ala Ser Leu Ala Glu Gly Arg Leu Tyr Leu  
 Ala Gln Asn Thr Lys Val  
 400 405 410  
 ctg cag atg ctg gag gga agg ctg aag gag  
 gag gac aag gat atc atc 1356  
 Leu Gln Met Leu Glu Gly Arg Leu Lys Glu  
 Glu Asp Lys Asp Ile Ile  
 415 420 425 4  
 30  
 acc agg gag aat gtt ctt ggg gcc ctg cag  
 aag ttc agt ctc agg cgc 1404  
 Thr Arg Glu Asn Val Leu Gly Ala Leu Gln  
 Lys Phe Ser Leu Arg Arg  
 435 440 445  
 ccg ctg cag aca gcg atg att caa gac ggc  
 ctc atc ttc tgg ctg gtt 1452  
 Pro Leu Gln Thr Ala Met Ile Gln Asp Gly  
 Leu Ile Phe Trp Leu Val  
 450 455 460  
 gat gtt ctg aag gac cct gac tgc ctg tct  
 gac tac acg ctg gag tac 1500  
 Asp Val Leu Lys Asp Pro Asp Cys Leu Ser  
 Asp Tyr Thr Leu Glu Tyr  
 465 470 475  
 tcg gtg gct ttg ctc atg aac ctc tgc ctc  
 cgc agc aca ggg aag aac 1548  
 Ser Val Ala Leu Leu Met Asn Leu Cys Leu  
 Arg Ser Thr Gly Lys Asn  
 480 485 490  
 atg tgt gcc aag gtg gca ggc ctc gtg ctc  
 aaa gtc ctt tcg gat ctt 1596  
 Met Cys Ala Lys Val Ala Gly Leu Val Leu  
 Lys Val Leu Ser Asp Leu  
 495 500 505 5  
 10  
 ctt ggc cat gaa aac cat gag ata cag ccg  
 tat gtg aat gga gct ctg 1644  
 Leu Gly His Glu Asn His Glu Ile Gln Pro  
 Tyr Val Asn Gly Ala Leu  
 515 520 525  
 tac agc atc ctt tct gtt cca tcc att cgt  
 gag gaa gca aga gca atg 1692  
 Tyr Ser Ile Leu Ser Val Pro Ser Ile Arg  
 Glu Glu Ala Arg Ala Met  
 530 535 540

Leu Ala Asn Val Gln Trp Ser Gly Asp Glu  
Pro Leu Gln Arg Pro Val

640 645 650

acc ccc ggc ggc cac agt aaa cgg gta ccc  
agt gta agt cag ggc 2073

Thr Pro Gly Gly His Ser Lys Arg Val Pro  
Ser Val Ser Gln Gly

655 660 665

taaaggaagc gggaattgac tttcttaagc ttg  
ttttga ttacagtgt agatgtatgt 2133

atttttaaaa ttcaaaataa agcattcatt taga  
aaaaaa aaacaaaaaa aaaaaaaaaa 2193

aaa

2

196

<210> 9

<211> 669

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gly Asp Ile Leu Ala His Glu Ser Glu  
Leu Leu Gly Leu Val Lys

1 5 10 15

Glu Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Phe Glu Asp  
Thr Leu Lys Thr Phe Ser

20 25 30

Lys Glu Cys Lys Ile Lys Gly Lys Pro Leu  
Cys Lys Thr Val Gly Gly

35 40 45

Ser Phe Arg Asp Ser Lys Ser Leu Thr Ile  
Gln Lys Asp Leu Val Ala

50 55 60

Ala Phe Asp Asn Gly Asp Gln Lys Val Phe  
Phe Asp Leu Trp Glu Glu

65 70 75 80

His Ile Ser Ser Ser Ile Arg Asp Gly Asp  
Ser Phe Ala Gln Lys Leu

85 90 95

Glu Phe Tyr Leu His Ile His Phe Ala Ile  
Tyr Leu Leu Lys Tyr Ser

100 105 110

Val Gly Arg Pro Asp Lys Glu Glu Leu Asp  
Glu Lys Ile Ser Tyr Phe

115 120 125

Lys Thr Tyr Leu Glu Thr Lys Gly Ala Ala  
Leu Ser Gln Thr Thr Glu

130 135 140

Phe Leu Pro Phe Tyr Ala Leu Pro Phe Val  
Pro Asn Pro Met Val His

145 150 155 1

60

Pro Ser Phe Lys Glu Leu Phe Gln Asp Ser

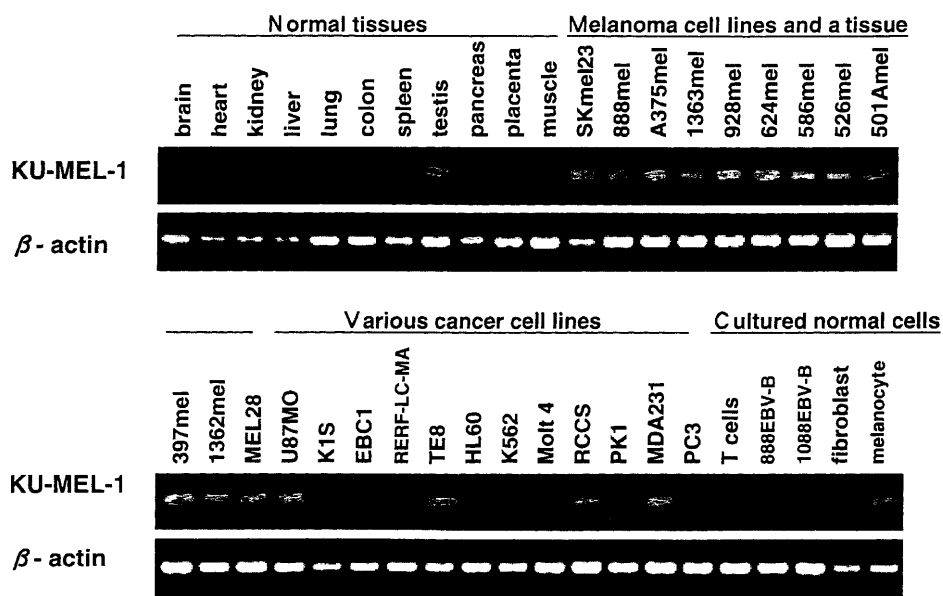
Thr Arg Pro Gly Thr Ala Ser Thr Met Leu  
 Arg Ala Ser Leu Ala Pro  
 290 295 300  
 Val Lys Leu Lys Asp Val Pro Leu Leu Pro  
 Ser Leu Asp Tyr Glu Lys  
 305 310 315 3  
 20  
  
 Leu Lys Lys Asp Leu Ile Leu Gly Ser Asp  
 Arg Leu Lys Ala Phe Leu  
 325 330 335  
 Leu Gln Ala Leu Arg Trp Arg Leu Thr Thr  
 Ser His Pro Gly Glu Gln  
 340 345 350  
 Arg Glu Thr Val Leu Gln Ala Tyr Ile Ser  
 Asn Asp Leu Leu Asp Cys  
 355 360 365  
 Tyr Ser His Asn Gln Arg Ser Val Leu Gln  
 Leu Leu His Ser Thr Ser  
 370 375 380  
 Asp Val Val Arg Gln Tyr Met Ala Arg Leu  
 Ile Asn Ala Phe Ala Ser  
 385 390 395 4  
 00  
 Leu Ala Glu Gly Arg Leu Tyr Leu Ala Gln  
 Asn Thr Lys Val Leu Gln  
 405 410 415  
 Met Leu Glu Gly Arg Leu Lys Glu Glu Asp  
 Lys Asp Ile Ile Thr Arg  
 420 425 430  
 Glu Asn Val Leu Gly Ala Leu Gln Lys Phe  
 Ser Leu Arg Arg Pro Leu  
 435 440 445  
 Gln Thr Ala Met Ile Gln Asp Gly Leu Ile  
 Phe Trp Leu Val Asp Val  
 450 455 460  
 Leu Lys Asp Pro Asp Cys Leu Ser Asp Tyr  
 Thr Leu Glu Tyr Ser Val  
 465 470 475 4  
 80  
  
 Ala Leu Leu Met Asn Leu Cys Leu Arg Ser  
 Thr Gly Lys Asn Met Cys  
 485 490 495  
 Ala Lys Val Ala Gly Leu Val Leu Lys Val  
 Leu Ser Asp Leu Leu Gly  
 500 505 510  
 His Glu Asn His Glu Ile Gln Pro Tyr Val  
 Asn Gly Ala Leu Tyr Ser  
 515 520 525  
 Ile Leu Ser Val Pro Ser Ile Arg Glu Glu  
 Ala Arg Ala Met Gly Met  
 530 535 540

【図面の簡単な説明】

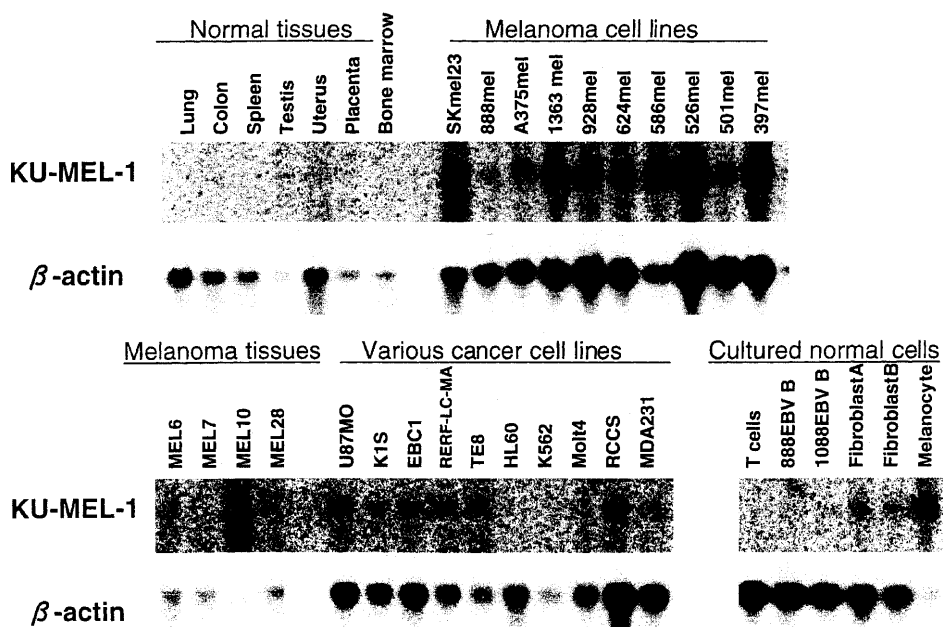
【図1】RT-PCRによる悪性黒色腫抗原KU-MEL-1の発現解析の結果を示す図である。

\*【図2】ノーザンブロット法による悪性黒色腫抗原KU-MEL-1の発現解析の結果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 14/00

識別記号

F I

C 0 7 K 14/47

16/18

テームコード<sup>8</sup> (参考)

4 C 0 8 4

4 C 0 8 5

|            |        |       |  |                 |  |           |
|------------|--------|-------|--|-----------------|--|-----------|
|            | 14/47  |       |  | 19/00           |  | 4 H 0 4 5 |
|            | 16/18  |       |  | C 1 2 N 1/15    |  |           |
|            | 19/00  |       |  | 1/19            |  |           |
| C 1 2 N    | 1/15   |       |  | 1/21            |  |           |
|            | 1/19   |       |  | C 1 2 Q 1/68    |  | A         |
|            | 1/21   |       |  | G 0 1 N 33/15   |  | Z         |
|            | 5/10   |       |  | 33/50           |  | K         |
| C 1 2 Q    | 1/68   |       |  |                 |  | Z         |
| G 0 1 N    | 33/15  |       |  | 33/53           |  | D         |
|            | 33/50  |       |  |                 |  | M         |
|            |        |       |  | 33/566          |  |           |
|            | 33/53  |       |  | 33/574          |  | A         |
|            |        |       |  | 33/577          |  | B         |
|            | 33/566 |       |  | C 1 2 P 21/02   |  | C         |
|            | 33/574 |       |  | C 1 2 R 1:91 )  |  |           |
|            | 33/577 |       |  | )               |  |           |
| // C 1 2 P | 21/02  |       |  | ( C 1 2 P 21/02 |  | C         |
| ( C 1 2 N  | 15/09  | Z N A |  | C 1 2 R 1:91 )  |  |           |
| C 1 2 R    | 1:91 ) |       |  | C 1 2 N 15/00   |  | Z N A A   |
| ( C 1 2 N  | 5/10   |       |  | A 6 1 K 37/02   |  |           |
| C 1 2 R    | 1:91 ) |       |  | C 1 2 N 5/00    |  | A         |
| ( C 1 2 P  | 21/02  |       |  | C 1 2 R 1:91 )  |  |           |
| C 1 2 R    | 1:91 ) |       |  |                 |  |           |

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA34 AA35 AA40 BB20  
 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36  
 DA78 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA36 BA45 CA04  
 CA09 DA02 EA04 FA10 GA11  
 GA14 HA01 HA12 HA15  
 4B063 QA01 QQ08 QQ79 QQ96 QR33  
 QR55 QR62 QR77 QS25 QS33  
 QS34  
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA05  
 DA14  
 4B065 AA90X AA90Y AA92X AB01  
 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA17  
 BA01 BA08 BA22 CA18 CA27  
 CA53 DA27 NA14 ZB082  
 ZB092 ZB262  
 4C085 AA14 AA19 BB01 CC13 DD22  
 DD33 EE01  
 4H045 AA11 BA10 BA41 CA41 DA86  
 EA28 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 人恶性黑色素瘤抗原                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2001333782A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 公开(公告)日 | 2001-12-04 |
| 申请号            | JP2000161252                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 申请日     | 2000-05-30 |
| [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<br>木庭幸子<br>藤田知信                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 发明人            | 河上 裕<br>木庭 幸子<br>藤田 知信                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| IPC分类号         | A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| FI分类号          | A01K67/027 A61K39/395.U A61K45/00 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.K G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A G01N33/577.B C12P21/02.C C12R1/91 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/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR33 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA27 4C084/CA53 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB01 4C085/CC13 4C085/DD22 4C085/DD33 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA74 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供可用于癌症的诊断和治疗的恶性肿瘤抗原，编码癌症的基因等。[解决问题的方法]通过使用从恶性黑色素瘤细胞系获得的mRNA通过RT-PCR制备cDNA，将该cDNA导入λ噬菌体载体并感染大肠杆菌而制备的黑素瘤细胞cDNA文库。用来自恶性黑色素瘤患者的血清IgG筛选总共7×10<sup>5</sup>个λ噬菌体cDNA克隆，使它们不与健康个体反应并在肿瘤细胞中选择性表达分离人恶性肿瘤抗原KU-MEL-1。

|                     | 18               |                    |                       |                       |                       |            |                        |
|---------------------|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------------|
|                     | Melanoma<br>n=15 | Brain tumor<br>n=5 | Renal cell ca.<br>n=5 | Esophageal ca.<br>n=5 | Colorectal ca.<br>n=5 | CML<br>n=1 | Healthy<br>individuals |
| NS 21<br>(KU-MEL-1) | 2/15             | 2/5                | 1/5                   | 2/5                   | 3/5                   | 1/1        | 0/16                   |
| Go protein          | 2/15             | 0/5                | 1/5                   | 1/5                   | 1/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 25               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 2/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| Galectin-3          | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 23               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 15               | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 0/16                   |
| NS 26               | 4/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 1/16                   |
| cIF4A1              | 1/15             | 0/5                | 0/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 1/16                   |
| NS 22               | 4/15             | 1/5                | 3/5                   | 0/5                   | 0/5                   | 0/1        | 3/16                   |
| NS 24               | 5/15             | 2/5                | 1/5                   | 1/5                   | 1/5                   | 1/1        | 2/16                   |
| NS 5                | 4/15             | 2/5                | 2/5                   | 2/5                   | 2/5                   | 1/1        | 1/15                   |