

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-529825

(P2015-529825A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B 0 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
CO 7 K 7/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	CO 7 K 7/04 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-529319 (P2015-529319)	(71) 出願人	304027279 国立大学法人 新潟大学 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
(86) (22) 出願日	平成25年9月3日(2013.9.3)	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月30日(2015.4.30)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/074172	(72) 発明者	各務 博 新潟県新潟市中央区旭町通1-757 国立大学法人新潟大学内
(87) 国際公開番号	W02014/038682	(72) 発明者	成田 一衛 新潟県新潟市中央区旭町通1-757 国立大学法人新潟大学内
(87) 国際公開日	平成26年3月13日(2014.3.13)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-193757 (P2012-193757)		
(32) 優先日	平成24年9月4日(2012.9.4)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 癌幹細胞に発現する分子をターゲットとした癌を診断、治療する方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、新たな、がんの悪性度判定方法、がんの診断方法及び予後判定方法、がん治療剤、及びがん転移抑制剤ワクチンを提供することを課題とする。

【解決手段】 がんの悪性度の評価方法であって、がん組織中のDDX3X発現量を測定する段階、及び当該DDX3X発現量に基づき当該がん組織の悪性度を評価する段階を含む方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんの悪性度の評価方法であって、
がん組織中の D D X 3 X 発現量を測定する段階、及び
当該 D D X 3 X 発現量に基づき当該がん組織の悪性度を評価する段階
を含む方法。

【請求項 2】

D D X 3 X に対する抗体、あるいは D D X 3 X の m R N A 又はそれに対応する c D N A に
特異的に結合するポリヌクレオチドを含有し、
当該抗体又は当該ポリヌクレオチドが、がん組織中の D D X 3 X 発現量の測定のために用
いられる
がん悪性度評価用キット。

10

【請求項 3】

がんの予後の評価方法であって、
がん患者の血中の D D X 3 X 特異的 T 細胞を検出する段階、及び
当該検出結果に基づきがんの予後を評価する段階
を含む方法。

【請求項 4】

D D X 3 X 又はその部分ペプチドを含有し、
当該 D D X 3 X 又はその部分ペプチドが、がん患者の血中の D D X 3 X 特異的 T 細胞の検
出のために用いられる
がん予後評価用キット。

20

【請求項 5】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、
配列番号 2 ~ 8 7 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した 9 ~ 2 0 個のア
ミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 6】

がん抗原ペプチドである請求項 5 に記載のペプチド。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のペプチドを含有するがんワクチン。

30

【請求項 8】

がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制用である請求項 7 に記載のがんワクチン。

【請求項 9】

抗原提示能を有する細胞を D D X 3 X 又はその部分ペプチドでパルスする段階
を含む、養子免疫用細胞の製造方法。

【請求項 10】

D D X 3 X 又はその部分ペプチドでパルスされた抗原提示細胞。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の抗原提示細胞を有効成分として含む D D X 3 X 特異的 T 細胞の誘導剤
。

40

【請求項 12】

抗原提示能を有する細胞を D D X 3 X 又はその部分ペプチドに暴露して当該 D D X 3 X 又
はその部分ペプチドに由来する抗原を提示する細胞を得る段階、及び
当該細胞を用いて D D X 3 X 特異的 T 細胞を誘導する段階
を含む、養子免疫用細胞組成物の製造方法。

【請求項 13】

前記 D D X 3 X 特異的 T 細胞が D D X 3 X 特異的 C D 4 陽性 T 細胞である請求項 12 に記
載の製造方法。

【請求項 14】

がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制における使用のための D D X 3 X の発現又は

50

活性を阻害する化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌幹細胞に発現する分子をターゲットとした癌を診断、治療する方法、特に、がんの悪性度の判定方法、がんの予後の評価方法、がん抗原ペプチド、養子免疫用細胞組成物の製造方法、並びにがんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの証拠が、ほとんどの固形悪性腫瘍は不均一の腫瘍細胞で構成され、比較的少数の細胞の群が、高い腫瘍形成能、非接着性の細胞塊（スフェア）形成能、無限の自己複製能、及び非対称性分化能等のユニークな特性をもつことを示している。この特徴的な細胞群は、生物学的、生化学的、及び分子的特徴が正常な幹細胞と共通していることから、がん幹細胞（CSC）と呼ばれている。古典的なCSCモデルでは、CSC細胞群と比較的分化した大多数を占めるがん細胞群のヒエラルキーは厳密であり、一方向性であるとされていた。しかし、最近のデータは、CSCと分化したがん細胞が制御されたバランスの下で、相互に変換できることを示唆している（非特許文献1）。

細胞傷害性化学療法と分子標的治療後に生き残るごく少数のがん細胞が一様にCSCマーカーの1つとされているCD133を発現していたことが報告されている（非特許文献2、非特許文献3）。CSCは細胞死から逃れる複数のメカニズムを有している。変異クロマチン状態、多剤排出トランスポーター、抗アポトーシス因子、DNA修復遺伝子産物及び幹細胞に特徴的な生存シグナルなどにより、CSCは、細胞傷害性抗がん剤、分子標的治療薬、放射線療法などにより生じる致死的环境下でも生き残ることができる。このユニークながんの集団は、致死的环境下を生き延びることで、遺伝子変異により永続的な薬剤耐性を獲得するがん細胞の母細胞として機能することができる（非特許文献2）。したがって、CSCシステムは、ほとんどの治療の失敗とがんの再発を担っている可能性が高い。CSCの細胞群を根絶するための効果的な治療法が開発されない限り、持続的な治療を達成することは非常に困難である。よって、CSCの細胞群を根絶するための効果的な治療法が求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Li Y, Laterra J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer research*. 2012;72:576-80.

【非特許文献2】Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141:69-80.

【非特許文献3】Rappa G, Fodstad O, Loricco A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells*. 2008;26:3008-17.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、新たな、がん組織の悪性度の判定方法、がんの予後の評価方法、がん抗原ペプチド、養子免疫用細胞組成物の製造方法、並びにがんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、以前の研究で、腫瘍所属リンパ節中で腫瘍抗原によりプライミングされたエフェクターT細胞が、脳、肺、皮膚転移モデルにおいて、抗腫瘍治療活性を有してい

10

20

30

40

50

ることを報告した(Kagamu H, Shu S. Purification of L-selectin(low) cells promotes the generation of highly potent CD4 antitumor effector T lymphocytes. J Immunol. 1998;160:3444-52., Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, et al. CD40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. J Immunol. 2001;167:5678-88.). さらに近年、本発明者らは、CSCマーカーの一つであるCD133に着目し、メラノーマ細胞全体の1%未満を占めるCD133陽性メラノーマを純化することに成功した。このCD133陽性メラノーマはCSCの特性を有していた。このメラノーマCSCワクチン接種が、特異的なCD8陽性T細胞及びタイプ17 Tヘルパー(Th17)細胞、及びTh1細胞を誘導することを見いだした。特に、メラノーマCSC特異的CD4陽性T細胞は、腫瘍組織におけるエフェクターT細胞とMHC Class IIを高発現した活性型樹状細胞の長時間の集積を引き起こし、高い抗腫瘍効果を示した。さらに、メラノーマCSC特異的CD4陽性T細胞を移入したマウスでは、腫瘍組織内で通常見られる制御性T細胞(Treg)の誘導が認められなかった。この治療は、CD133陽性腫瘍細胞を根絶させ、最終的には親株メラノーマを治癒させた。以上の結果は、CD133陽性メラノーマ細胞は特異的な免疫原性抗原を有しており、その抗原特異的T細胞は、CSCを根絶することでこれまでにない高い抗腫瘍活性をもつことを示している。

10

【0006】

また、本発明者らは、CD133陽性腫瘍細胞に優位に発現する免疫原性タンパク質を解明するため、二次元電気泳動を使ってタンパク質発現を比較し、4つのタンパク質を見出した。質量分析(MS/MS)の解析データのMascotサーチから、その一つが、DEAD/H(Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X)であると同定した。

20

このタンパク質は、X染色体に座位するATP依存的RNAヘリカーゼのDEADボックスファミリーのタンパク質(DEADボックスヘリカーゼ)である。DEADボックスヘリカーゼは、RNAスプライシング、mRNAの核から細胞質への搬出、転写翻訳制御、RNA分解、リボソームの構築など複数の機能を有している(Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. Nature reviews Molecular cell biology. 2004;5:232-41.)。DDX3Xは、進化上で、酵母からヒトまで保存されており、細胞の生存に必須であることが示唆されている。DDX3Xのホモログには、Y染色体上に座位するDDX3Yがあり、両者の遺伝子は胎児発生の過程で働く。ヒトにおいては、DDX3Xの欠損又は、機能不全は、胚細胞形成不全と関連するとされている(Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol. 2002;4 Suppl:s41-9.)。

30

【0007】

本発明者らは、本発明において、DDX3XがCD133陽性メラノーマ細胞の主要な免疫原性標的タンパク質であることを見出した。また、合成DDX3Xのワクチン接種は、皮膚メラノーマ治療モデルにおいて腫瘍退縮効果を示した。また、DDX3Xは、CSCマーカーを発現するヒトのがん細胞株で強く発現するものの、正常ヒト上皮細胞、正常ヒト内皮細胞では、わずかにしか発現されていなかった。

40

これらのことから、本発明者らは、
 がん組織におけるDDX3Xの発現量は、がんの悪性度の指標となること；
 また、がん患者の血中のDDX3X特異的T細胞の有無は、がんの予後を評価する指標となること；
 DDX3Xの部分ペプチド(フラグメント)ががんワクチンとなること；
 また、抗DDX3X免疫療法は、CSCを根絶させ、それによってがんを治癒する有望な方法となること
 を着想し、更なる研究の結果、本発明を完成するに至った。

【0008】

本発明は、次の態様を含む。

50

【 0 0 0 9 】

項 1 .

がんの悪性度の評価方法であって、
がん組織中の D D X 3 X 発現量を測定する段階、及び
当該 D D X 3 X 発現量に基づき当該がん組織の悪性度を評価する段階
を含む方法。

項 2 .

D D X 3 X に対する抗体、あるいは D D X 3 X の m R N A 又はそれに対応する c D N A に
特異的に結合するポリヌクレオチドを含有し、
当該抗体又は当該ポリヌクレオチドが、がん組織中の D D X 3 X 発現量の測定のために用
いられる
がん悪性度評価用キット。

10

項 3 .

がんの予後の評価方法であって、
がん患者の血中の D D X 3 X 特異的 T 細胞を検出する段階、及び
当該検出結果に基づきがんの予後を評価する段階
を含む方法。

項 4 .

D D X 3 X 又はその部分ペプチドを含有し、
当該 D D X 3 X 又はその部分ペプチドが、がん患者の血中の D D X 3 X 特異的 T 細胞の検
出のために用いられる
がん予後評価用キット。

20

項 5 .

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、
配列番号 2 ~ 8 7 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した 9 ~ 2 0 個のア
ミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチド。

項 6 .

がん抗原ペプチドである項 5 に記載のペプチド。

項 7 .

項 5 に記載のペプチドを含有するがんワクチン。

30

項 7 - 2 .

がんに対するワクチン接種における使用のための項 5 に記載のペプチド。

項 8 .

がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制用である項 7 に記載のがんワクチン。

項 9 .

抗原提示能を有する細胞を D D X 3 X 又はその部分ペプチドでパルスする段階
を含む、養子免疫用細胞の製造方法。

項 1 0 .

D D X 3 X 又はその部分ペプチドでパルスされた抗原提示細胞。

項 1 1 .

項 1 0 に記載の抗原提示細胞を有効成分として含む D D X 3 X 特異的 T 細胞の誘導剤。

40

項 1 1 - 2 .

D D X 3 X 特異的 T 細胞の誘導における使用のための項 1 0 に記載の抗原提示細胞。

項 1 2 .

抗原提示能を有する細胞を D D X 3 X 又はその部分ペプチドに暴露して当該 D D X 3 X 又
はその部分ペプチドに由来する抗原を提示する細胞を得る段階、及び
当該細胞を用いて D D X 3 X 特異的 T 細胞を誘導する段階
を含む、養子免疫用細胞組成物の製造方法。

項 1 3 .

前記 D D X 3 X 特異的 T 細胞が D D X 3 X 特異的 C D 4 陽性 T 細胞である項 1 2 に記載の

50

製造方法。

項 1 4 .

DDX3Xの発現又は活性を阻害する化合物を含有するがんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤。

項 1 4 - 2 .

がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制における使用のためのDDX3Xの発現又は活性を阻害する化合物。

【発明の効果】

【0010】

本発明のペプチドはがん抗原であり、これにより、がんの悪性度の判定方法、がんの予後の評価方法、がん抗原ペプチド、養子免疫用細胞組成物の製造方法、並びにがんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤等が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】ヒトDDX3Xのアミノ酸配列である。

【図2】CD8陽性T細胞によるIFNの産生を示すグラフである。(実施例1)

【図3】CD4陽性T細胞によるIFN及びIL-17の産生を示すグラフである。(実施例1)

【図4】CD8陽性T細胞によるIFNの産生を示すグラフである。(実施例1)

【図5】CD4陽性T細胞によるIFN及びIL-17の産生を示すグラフである。(実施例1)

20

【図6】ワクチン接種したマウスにおける腫瘍成長曲線のグラフである。(実施例2)

【図7】ワクチン接種した、形成した皮膚腫瘍を有するマウスにおける腫瘍成長曲線のグラフである。(実施例3)

【図8】ワクチン接種したマウスにおける腫瘍成長曲線のグラフである。(実施例4)

【図9】DD3Cの部分ペプチドの刺激によるIFN産生を示すグラフである。(実施例5)

【図10】DD3Cの部分ペプチドの刺激によるIFN産生を示すグラフである。(実施例6)

【図11】ワクチン接種したマウスにおける腫瘍成長曲線のグラフ(B)である。(実施例7)

30

【図12】CD133を発現を示すフローサイトメトリーのグラフである。(実施例8)

【図13】DDX3X及びアクチンに対する抗体を用いた、腫瘍細胞に対するイムノプロットである。(実施例8)

【図14】細胞キズ修復実験の傷修復の経過の写真である。(実施例9)

【図15】スフェロイド形成能の検討におけるスフェロイドの写真である。(実施例11)

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明において、「がん」とは、生体における異常な細胞の非制御の増殖であり、その例としては、例えば、固形腫瘍(例えば、癌種、肉腫等)、リンパ腫及び白血病等が挙げられる。

40

【0013】

より具体的には、がんとしては、例えば、

星細胞腫、悪性の髄芽腫、胚細胞腫瘍、頭蓋咽頭腫、上衣腫等の小児の脳腫瘍；

グリオーマ、神経膠腫、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫等の成人の脳腫瘍；

上顎洞癌、咽頭癌(上咽頭癌、中咽頭癌、下咽頭癌)、喉頭癌、口腔癌、口唇癌、舌癌、耳下腺癌等の頭頸部癌；

小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胸腺腫、中皮腫等の胸部癌及び腫瘍；

食道癌、肝臓癌、原発性肝癌、胆嚢癌、胆管癌、胃癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌

50

、膵癌、膵内分泌腫瘍等の消化器癌及び腫瘍；
 陰茎癌、腎盂・尿管癌、腎細胞癌、精巣（睾丸）腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、ウイルス腫瘍、尿路上皮癌等の泌尿器癌及び腫瘍；
 外陰癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、絨毛癌、腔癌、乳癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍等の婦人科癌及び腫瘍；
 成人及び小児の軟部肉腫；骨肉腫、ユーイング腫瘍等の骨の腫瘍；
 副腎皮質癌、甲状腺癌等の内分泌組織の癌及び腫瘍；悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、形質細胞性腫瘍、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、成人T細胞白血病リンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病等の悪性リンパ腫及び白血病；
 慢性骨髄増殖性疾患、悪性黒色腫（メラノーマ）、有棘細胞癌、基底細胞癌、菌状息肉症等の皮膚の癌及び腫瘍；
 前記腫瘍及び癌の転移巣等が挙げられる。

【0014】

中でも、本発明は、例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌等の胸部癌及び腫瘍；悪性黒色腫（メラノーマ）等の皮膚の癌及び腫瘍；及び乳癌等の婦人科癌及び腫瘍に好適に適用される。

【0015】

「DDX3X」とは、DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linkedである。

前述したように、このタンパク質は、X染色体に座位するATP依存的RNAヘリカーゼのDEADボックスファミリーのタンパク質（DEADボックスヘリカーゼ）である。そのアミノ酸配列は公知である。ヒトDDX3Xの配列（UniProtKB/Swiss-Prot: O00571.3）を図1（配列番号1）に示す。

【0016】

本明細書における塩基配列（ヌクレオチド配列）や核酸又はアミノ酸などの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138; 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作製のためのガイドライン」（日本特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0017】

本明細書中、塩基配列は、特に記載しない限り、5'末端から3'末端の方向に記載する。

本明細書中、アミノ酸配列は、特に記載しない限り、N末端からC末端の方向に記載する。

【0018】

本明細書中、「遺伝子」には、特に限定しない限り、2本鎖DNA、及び1本鎖DNA（センス鎖）、並びに当該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）、及びそれらの断片のいずれもが包含される。また、本明細書で「遺伝子」とは、特に限定しない限り、調節領域、コード領域、エクソン、及びイントロンを区別することなく示すものとする。

【0019】

本明細書中、「ヌクレオチド」（又は「ポリヌクレオチド」）は、核酸と同義であって、DNA及びRNAの両方を包含するものとする。また、これらは2本鎖であっても1本鎖であってもよい。本明細書中、ある配列を有する「ヌクレオチド」（又は「ポリヌクレオチド」）は、特に限定しない限り、これに相補的な配列を有する「ヌクレオチド」（又は「ポリヌクレオチド」）も包括的に意味するものとする。

【0020】

本明細書中、「ポリヌクレオチド」は、特に限定しない限り、「オリゴヌクレオチド」

10

20

30

40

50

を包含するものとする。

【0021】

また、「ヌクレオチド」（又は「ポリヌクレオチド」）は、特に限定しない限り、修飾された核酸又は核酸類似体（例、PNA、LNA）を包含するものとする。

【0022】

なお、「ヌクレオチド」（又は「ポリヌクレオチド」）がRNAである場合、配列表に示される塩基記号「T」は「U」と読み替えられるものとする。

【0023】

本明細書中、「cDNA」は、特に限定しない限り、mRNAに相補的な塩基配列を有する一本鎖DNA（一本鎖cDNA）、並びに当該一本鎖cDNA及びその相補鎖からなる二本鎖DNA（二本鎖cDNA）の両方を包含するものとする。

10

【0024】

本明細書中、「特異的にハイブリダイズする」とは、通常ハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジентなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA、第2版、1989に記載の条件）において、試料中の他のポリヌクレオチドとのクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする」条件として具体的には、例えば、 $6 \times S S C$ 、 $0.5\% S D S$ 及び 50% ホルムアミドの溶液中で $42^{\circ}C$ で加温した後、 $0.1 \times S S C$ 、 $0.5\% S D S$ の溶液中で $68^{\circ}C$ で洗浄した場合に、陽性のハイブリダイズのシグナルが観察される条件が挙げられる。

20

【0025】

本明細書中、「タンパク質」は、特に限定しない限り、糖鎖などによって修飾されているタンパク質及び非修飾のタンパク質の両方を包含するものとする。このことは、タンパク質であることが明記されていないタンパク質についても同様である。

【0026】

本明細書中、 $DDX3X$ 又はその部分ペプチドに由来するペプチドを、 $DDX3X$ 由来ペプチドと称する場合がある。

【0027】

本明細書中、 $DDX3X$ の部分ペプチド（又はフラグメント）とは、 $DDX3X$ のアミノ酸配列の一部からなるペプチドを意味する。

30

【0028】

がんの悪性度の評価方法

本発明のがんの悪性度の評価方法は、
がん組織中の $DDX3X$ 発現量を測定する段階、及び
当該 $DDX3X$ 発現量に基づき当該がんの悪性度を評価する段階
を含む。

【0029】

本明細書中、「がんの悪性度」とは、当該がんが、臨床的に、その宿主をどの程度早く死に至らしめてしまうかを示すものであり、具体的には、当該がん起因する死亡率の高さ、当該がんの転移の可能性の高さ、当該がんの予後の悪さ、又は当該がんの治療の困難さとして考えることができる。

40

【0030】

本明細書中、「がん組織」は、例えば、患者から検査のために採取されたがん組織、若しくは手術により摘出されたがん組織、又はそれらの一部であることができる。

【0031】

「 $DDX3X$ 発現量」の測定は、悪性度が高いがん組織における $DDX3X$ 発現量と悪性度が低いがん組織における $DDX3X$ 発現量の区別が可能な任意の手段を採用して行えばよい。

【0032】

50

本発明の一態様では、D D X 3 Xの発現量の測定は、タンパク質であるD D X 3 Xの量を測定することによって行うことができる。具体的には、例えば、必要に応じて前記のがん組織から通常の方法によりタンパク質を抽出又は調製し、次いで、後記に例示する方法などによってD D X 3 Xの発現量を測定する。タンパク質の抽出又は調製は、例えば、市販のキットを用いて実施することができる。

【0033】

D D X 3 Xの量を測定する方法としては、特定のタンパク質の量を測定できる方法であれば、特に制限されないが、例えば、ウエスタンブロット法、E L I S A法、蛍光抗体法、プロテインアレイ（プロテインチップ）法などが挙げられる。

【0034】

E L I S A法では、例えば、前記のがん組織から抽出又は調製したタンパク質を含有する溶液を、マイクロプレートのウェルの固相表面に吸着させた後、D D X 3 Xに対する抗体をアプライし、酵素反応によりD D X 3 Xの量を測定する。

【0035】

プロテインアレイ法では、例えば、D D X 3 Xに対する抗体を有するプロテインアレイ（例、抗体アレイ（抗体チップ））を準備し、当該プロテインアレイに、前記のがん組織から抽出したタンパク質をアプライし、抗体抗原反応をさせた後、前記抗体に結合したD D X 3 Xの量を、E L I S A法等を用いて測定する。

【0036】

前記抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体であり得る。

【0037】

また、前記抗体は、例えば、F a bフラグメント、F (a b ') 2フラグメント等の、抗原に特異的に結合し得る抗体フラグメントであってもよい。

【0038】

前記抗体は、公知の方法により製造できる。

【0039】

例えば、前記抗体がポリクローナル抗体の場合は、公知の方法により大腸菌などで発現させて調製したD D X 3 X又はその部分ペプチド、或いは公知の方法により合成したD D X 3 X又はその部分ペプチドを用いて、ウサギなどの非ヒト哺乳動物を免疫し、当該免疫動物の血清から慣用の方法により調製できる。

一方、前記抗体がモノクローナル抗体の場合は、公知の方法により大腸菌などで発現させて調製したD D X 3 X又はその部分ペプチドを抗原として用いて、マウスなどの非ヒト哺乳動物を免疫し、得られた抗体産生細胞をミエロームと細胞融合させて調製したハイブリドーマから調製できる。

【0040】

本発明において用いられるD D X 3 Xの部分ペプチドとしては、例えば、後記する本発明のペプチドが好ましい。

【0041】

D D X 3 X又はその部分ペプチドは、そのアミノ酸配列情報に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。当該方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含される。このようなペプチド合成法としては、例えば「ペプチド合成」（丸善；1975年発行）又はPeptide Synthesis, Interscience, New York, (1996)に記載の方法が例示される。また、例えばアプライドバイオシステムズ社のペプチド合成装置のような公知の化学合成装置を用いて製造することもできる。

【0042】

また、抗原として使用されるD D X 3 X、又はD D X 3 Xの部分アミノ酸配列からなるペプチドは、これをコードする遺伝子の塩基配列情報に基づくD N Aのクローニング、プラスミド構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養及び培養物からのタンパク質の回収などの操作を含む一般的な遺伝子工学的手法によって、発現ベクター又はクローニングベクター等を用いて製造することもできる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

組み換えベクターは、D D X 3 X 又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより得られる。

ベクターDNAは、宿主の種類及び使用目的により適宜選択すればよい。ベクターDNAは、天然に存在するDNAであってもよく、天然DNAから増殖に必要な部分以外のDNA部分が一部欠落しているものでもよい。ベクターDNAとしては、例えば、染色体、エピソーム又はウイルス等に由来するベクターが挙げられる。具体的には、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス（例えばパキウウイルス、パポバウイルス、SV40、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及びレトロウイルス等）等に由来するベクター及びそれらを組み合わせたベクター、プラスミド及びバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター（例えばコスミド及びファージミド等）が挙げられる。

10

【 0 0 4 4 】

前記ポリヌクレオチドを、公知の方法によりベクターDNAに挿入することにより、当該ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターが得られる。具体的には、例えば、適当な制限酵素を用いてDNA及びベクターDNAを特定部位で切断し、混合してリガーゼにより再結合することができる。また、前記ポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターDNAのマルチクロニングサイトへ挿入することによっても前記組み換えベクターを得ることができる。

20

【 0 0 4 5 】

前記ポリヌクレオチドが組み込まれた組み換えベクターを、公知の宿主、例えば大腸菌（例えばK12）、パチルス属細菌（例えばMI114）のような細菌、酵母（例えばAH22）、昆虫細胞（例えばSf細胞）又は動物細胞（例えばCOS-7細胞、Vero細胞、CHO細胞等）等に公知の方法で導入することにより、当該組み換えベクターが導入された形質転換体得られる。

【 0 0 4 6 】

遺伝子導入方法としては、遺伝子の安定性を考慮すれば、染色体内へのインテグレート法が好ましく挙げられる。簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を用いることができる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989)等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、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、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷 (Scrape loading)、パリスティック導入 (ballistic introduction) 及び感染等を例示できる。

30

【 0 0 4 7 】

また、D D X 3 X は、商業的にも入手可能である。

【 0 0 4 8 】

また、抗D D X 3 X 抗体は、商業的にも入手可能である。

40

【 0 0 4 9 】

D D X 3 X の量の測定に用いられる抗体は、例えば、酵素標識、放射標識、及び蛍光標識などの公知の標識方法で標識されていてもよく、ビオチンなどにより修飾されていてもよい。

【 0 0 5 0 】

本発明の別の態様では、D D X 3 X の発現量の測定は、D D X 3 X のmRNAの量を測定することによって行うことができる。具体的には、例えば、必要に応じて前記のがん組織から慣用の方法によりmRNAを抽出又は調製し、後記に例示する方法などによってD D X 3 X のmRNAの量を測定する。mRNAの抽出又は調製は、例えば、市販のキットを用いて実施することができる。

50

【0051】

DDX3XのmRNAの量を測定する方法は、特定のmRNAの量を測定できる方法であれば、特に制限されないが、例えば、DDX3XのmRNA又はそれに対応するcDNAに特異的に結合するポリヌクレオチドであるプローブ又はプライマーを用いた、サザンブロット法、*in situ* ハイブリダイゼーション法、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)、定量PCR(例、リアルタイムPCR)、又はインベーター(商品名、HOLOGIC社、米国)法等の公知の方法を採用して行うことができる。

【0052】

マイクロアレイ法では、例えば、DDX3XのmRNAに特異的に結合するプローブが配置された核酸アレイ(核酸チップ)を準備し、当該核酸アレイに、前記のがん組織から抽出し、及び蛍光標識等で標識したmRNA試料をアプライし、前記プローブに結合したDDX3XのmRNAの標識シグナルを測定して解析する。

10

【0053】

リアルタイムPCRでは、例えば、前記のがん組織から抽出又は調製したmRNAを、逆転写酵素を用いてcDNAに逆転写し、そのcDNAを鋳型として用い、DDX3XのcDNAに特異的に結合するプライマーを用いて、所定の領域をPCRで増幅し、増幅産物の生成をリアルタイムでモニタリングする。

【0054】

mRNAの量の測定に用いられるプローブは、DDX3XのmRNA又はcDNAと特異的にハイブリダイズするように設計される。

20

【0055】

プローブとしてのポリヌクレオチドは、好ましくは、例えば、DDX3X mRNAの塩基配列の全体配列、部分配列、及びそれらの相補配列からなるポリヌクレオチド、並びに、前記ポリヌクレオチドにおいて1~数个(例、1~10個、1~5個、1~3個)の塩基が、欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドなどである。プローブとしてのポリヌクレオチドの長さは、通常、15~500塩基長、好ましくは20~200塩基長、より好ましくは20~50塩基長である。

【0056】

プローブとしてのポリヌクレオチドは、DDX3XのmRNAの量の測定を可能とするために、適当な標識物、例えば蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質等が付加されていてもよい。

30

【0057】

定量PCRなどによるmRNAの量の測定に用いられるプライマーは、DDX3XのmRNA又はcDNAと特異的にハイブリダイズするように設計される。プライマーの設計は、特に制限されないが、公知の方法、例えば、プライマー設計用アルゴリズムやソフトウェアなどを利用して行なうことができる。プライマーは通常、フォワードプライマー及びリバースプライマーの一对からなるプライマーセットとして使用される。

【0058】

プライマーとしてのポリヌクレオチドは、好ましくは、例えば、DDX3XのmRNAの塩基配列の全体配列、部分配列、及びそれらの相補配列からなるポリヌクレオチド、並びに、前記ポリヌクレオチドにおいて1~数个(例、1~10個、1~5個、1~3個)の塩基が、欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドなどである。プライマーとしてのポリヌクレオチドの長さは、通常、15~30塩基長である。

40

【0059】

プライマーとしてのポリヌクレオチドは、DDX3XのmRNAの量の測定を可能とするために、適当な標識物、例えば蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質等が付加されていてもよい。

【0060】

ポリヌクレオチドは、遺伝子工学的的手法 [Methods in Enzymology, 2005; 392: 24-35,

50

73-96,173-185, 405-419.; Nucleic Acids Res. 1984;12:9441 ; 続生化学実験講座 1 「遺伝子研究法 I I」、日本生化学会編, 105頁(1986)など]、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段 [J Am Chem Soc. 1967; 89(2): 450-3.; J Am Chem Soc. 1967; 89 (26): 7146-7147.] 及びそれらの組合せ方法などにより製造できる。また、RNAの合成は市販の Applied Biosystems 社製 ABI 3900 ハイスループット DNA 合成器等とともに RNA 合成用試薬を用いてホスホロアミダイト法により合成することもできる。

【0061】

さらに、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの合成を受託している会社又は部門に合成を委託することにより得ることもできる。

【0062】

また、DDX3Xの発現量の測定は、がん組織中に、DDX3Xを発現している細胞数の測定によっても行うことができる。DDX3Xを発現している細胞数の測定は、蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質等で標識した抗DDX3X抗体を用いて、免疫組織染色したがん組織中のDDX3X発現細胞を観察すること、又はがん組織中のDDX3X発現細胞の数をフローサイトメトリー等によって計測することなどの方法によっても行うことができる。

【0063】

本発明のがんの悪性度の評価方法においては、測定されたDDX3Xの発現量が高い場合、がん組織の悪性度は高いと評価され、測定されたDDX3Xの発現量が低い場合、がん組織の悪性度は低いと評価される。

【0064】

DDX3Xの発現量の高さと、がん組織の悪性度の高さととは、例えば、非がん組織、従来法で悪性度が高いと評価されたがん組織、及び従来法で悪性度が低いと評価されたがん組織等の各DDX3Xの発現量の高さに基づいて、統計学的手法(例えば、student t検定、Kaplan-Meier法)を利用して、関係づけることができる。

【0065】

本発明のがんの悪性度の評価方法の評価方法は、他のがんの悪性度の評価方法と組み合わせ実施してもよい。

【0066】

がん悪性度評価用キット

本発明のがん悪性度評価用キットは、本発明のがんの悪性度の評価方法に用いることができる。

【0067】

本発明のがん悪性度評価用キットは、DDX3Xに対する抗体、あるいはDDX3XのmRNA又はそれに対応するcDNAに特異的に結合するポリヌクレオチドを含有する。

【0068】

本発明の一態様において、がん悪性度評価用キットは、DDX3Xに対する抗体を含有する。

当該抗体は、タンパク質であるDDX3Xの量を測定するために用いられる。

当該抗体としては、「がんの悪性度の評価方法」について説明した抗体と同様の抗体を用いることができる。

【0069】

当該抗体は、プロテインアレイ(例、抗体アレイ、抗体チップ)を構成していてもよい。当該プロテインアレイは、基板及び前記抗体を有し、当該抗体は基板上に配置されている。当該基板としては、タンパク質をその上に配置できるものであれば特に制限されないが、例えば、ガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ、及びキャピラリー等を挙げることができる。当該プロテインアレイ(抗体チップ)は、例えば、インクジェット技術を利用する方法等の、プロテインアレイの製造における慣用の方法を用いて前記抗体を基板上に固定することによって製造できる。

10

20

30

40

50

【0070】

本発明の別の態様において、本発明のがん悪性度評価用キットは、DDX3XのmRNA又はそれに対応するcDNAに特異的に結合するポリヌクレオチドを含有する。

当該ポリヌクレオチドは、DDX3XのmRNAの量を測定するために用いられる。

当該ポリヌクレオチドとしては、「がんの悪性度の評価方法」について説明したポリヌクレオチドと同様のポリヌクレオチドを用いることができる。

【0071】

当該ポリヌクレオチドは、核酸アレイを構成していてもよい。当該核酸アレイは、当該核酸アレイは、基板及び前記ポリヌクレオチドを有し、当該ポリヌクレオチドは基板上に配置されている。前記ポリヌクレオチドとしては、「がんの悪性度の評価方法」について説明したポリヌクレオチドが挙げられる。当該基板としては、核酸をその上に配置できるものであれば特に制限されないが、例えば、ガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ、及びキャピラリー等を挙げることができる。当該核酸アレイは、例えば、市販のスポットターを利用する方法、又はインクジェット技術を利用する方法等の、核酸アレイの製造における慣用の方法を用いて前記ポリヌクレオチドを基板上に固定することによって製造できる。

10

【0072】

本発明のがん悪性度評価用キットは、その目的及び形態に応じて、酵素、緩衝液、若しくは試薬、又は取り扱い説明書などを含有してもよい。

【0073】

がんの予後の評価方法

本発明のがんの予後の評価方法は、がん患者の血中のDDX3X特異的T細胞を検出する段階、及び当該検出結果に基づきがんの予後を評価する段階を含む。

20

【0074】

本明細書中、「がんの予後」とは、将来におけるがんの経過を意味する。

【0075】

がん患者の血中のDDX3X特異的T細胞の検出は、好ましくは、がん患者から得た血液試料中のDDX3X特異的T細胞の検出によって行われる。

当該血液試料の取得は、慣用の方法で実施すればよい。

30

【0076】

血液試料中のDDX3X特異的T細胞の検出は、例えば、³H-チミジン取込アッセイ等の抗原依存的増殖の分析、⁵¹Cr放出アッセイ等の細胞傷害性測定、MHC-ペプチド・テトラマー染色法、Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT)アッセイ、又は細胞内サイトカインアッセイ等の慣用の抗原特異的T細胞の検出方法により、実施できる。

【0077】

これらの検出方法で用いられる抗原は、前記「がんの悪性度の評価方法」において説明したものが挙げられる。

【0078】

がん患者の血中にDDX3X特異的T細胞が検出された場合、予後が良いと評価され、一方、検出されなかった場合、予後が悪いと評価される。

40

【0079】

本発明のがんの予後の評価方法は、他のがんの予後の評価方法と組み合わせて実施してもよい。

【0080】

がん予後評価用キット

本発明のがん予後評価用キットは、本発明のがんの悪性度の評価方法に用いることができる。

【0081】

50

本発明のがん予後評価用キットは、DDX3X又はその部分ペプチドを含有する。

当該DDX3X又はその部分ペプチドは、がん患者の血中のDDX3X特異的T細胞の検出のために用いられる。

当該DDX3X又はその部分ペプチドは、「がんの悪性度の評価方法」について説明したDDX3X又はその部分ペプチドと同じである。好ましくは、DDX3X又はその部分ペプチドとして、後記で説明する本発明のペプチドが用いられる。

【0082】

ペプチド

本発明のペプチドは、

前記の配列番号1で表されるアミノ酸配列において、

後記の配列番号2～87のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した9～20個のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列からなる。

前述したように、配列番号1は、DDX3Xのアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0083】

配列番号2：F L L D L L N A T

配列番号3：N I T Q K V V W V

配列番号4：I Q M L A R D F L

配列番号5：T F P K E I Q M L

配列番号6：K Y D D I P V E A

配列番号7：R Y I P P H L R N

配列番号8：R N I N I T K D L

配列番号9：K Q Y P I S L V L

配列番号10：I G L D F C K Y L

配列番号11：I E L T R Y T R P

配列番号12：T R Y T R P T P V

配列番号13：M G N I E L T R Y

配列番号14：L V L A P T R E L

配列番号15：Y P I S L V L A P

配列番号16：Q Y P I S L V L A

配列番号17：L E D F L Y H E G Y

配列番号18：F L D E Y I F L A

配列番号19：L L V E A K Q E V

配列番号20：F L L P I L S Q I

配列番号21：D F L D E Y I F L

配列番号22：S H V A V E N A L

配列番号23：V A V E N A L G L

配列番号24：A L G L D Q Q F A

配列番号25：L G L D Q Q F A G

配列番号26：G L D Q Q F A G L

配列番号27：D Q Q F A G L D L

配列番号28：N S S D N Q S G G

配列番号29：K G R Y I P P H L

配列番号30：P H L R N R E A T

配列番号31：R G R G D Y D G I

配列番号32：Y D G I G S R G D

配列番号33：R S G F G K F E R

配列番号34：K P L P P S E R L

配列番号35：L F S G G N T G I

配列番号36：F S G G N T G I N

配列番号37：I N F E K Y D D I

配列番号 38 : Y D D I P V E A T
 配列番号 39 : T G N N C P P H I
 配列番号 40 : E I I M G N I E L
 配列番号 41 : I I M G N I E L T
 配列番号 42 : I P I I K E K R D
 配列番号 43 : G S G K T A A F L
 配列番号 44 : T A A F L L P I L
 配列番号 45 : A A F L L P I L S
 配列番号 46 : I Y A D G P G E A
 配列番号 47 : L A V Q I Y E E A 10
 配列番号 48 : I Y E E A R K F S
 配列番号 49 : R P C V V Y G G A
 配列番号 50 : C V V Y G G A D I
 配列番号 51 : L L V A T P G R L
 配列番号 52 : A T P G R L V D M
 配列番号 53 : G L D F C K Y L V
 配列番号 54 : L D F C K Y L V L
 配列番号 55 : L V L D E A D R M
 配列番号 56 : V L D E A D R M L
 配列番号 57 : G F E P Q I R R I 20
 配列番号 58 : F S A T F P K E I
 配列番号 59 : Y I F L A V G R V
 配列番号 60 : R V G S T S E N I
 配列番号 61 : A T G K D S L T L
 配列番号 62 : S L T L V F V E T
 配列番号 63 : F L Y H E G Y A C
 配列番号 64 : L Y H E G Y A C T
 配列番号 65 : L H Q F R S G K S
 配列番号 66 : Q F R S G K S P I
 配列番号 67 : I L V A T A V A A 30
 配列番号 68 : T A V A A R G L D
 配列番号 69 : I S N V K H V I N
 配列番号 70 : L P S D I E E Y V
 配列番号 71 : E Y V H R I G R T
 配列番号 72 : L G L A T S F F N
 配列番号 73 : T S F F N E R N I
 配列番号 74 : F F N E R N I N I
 配列番号 75 : N I T K D L L D L
 配列番号 76 : D L L D L L V E A
 配列番号 77 : E V P S W L E N M 40
 配列番号 78 : A Y E H H Y K G S
 配列番号 79 : E H H Y K G S S R
 配列番号 80 : S R F S G G F G A
 配列番号 81 : F G A R D Y R Q S
 配列番号 82 : G G G Y G G F Y N
 配列番号 83 : G G Y G G F Y N S
 配列番号 84 : G G F Y N S D G Y
 配列番号 85 : S D G Y G G N Y N
 配列番号 86 : G G N Y N S Q G V
 配列番号 87 : N Y N S Q G V D W 50

【0084】

このようなアミノ酸配列としては、例えば、前記配列番号2～87に加えて、後記配列番号88～92で表されるアミノ酸配列が挙げられる。

配列番号88：KQYPISLVLAPTREL

配列番号89：EIIIMGNIELTRYTRPTPV

配列番号90：KGADSLLEDFLYHEGY

配列番号91：FVETKKKGADSLLEDFLYHEGY

当該配列の末端のグルタミン残基は、環化されてピログルタミン酸を形成していてもよい。このような配列としては、例えば、

配列番号92：pyroEYPISLVLA

が挙げられる。

10

【0085】

ここで、「配列番号2～87のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した9～20個のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチド」とは、1～数個（例、1～10個、1～5個、1～3個、1～2個、1個）のアミノ酸残基の置換、欠失、及び/又は付加などを有する「配列番号2～87のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した9～20個のアミノ酸配列」からなるペプチドであることができる。

本明細書中、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、80%以上（好ましくは85%以上、より好ましくは88%以上）の同一性を有するアミノ酸配列であることができる。

【0086】

置換は、保存的置換であることができる。

保存的置換の例としては、例えば、アスパラギン酸とグルタミン酸の間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、グリシンとアラニンとの間での置換等が挙げられる。

20

【0087】

配列番号2～87のいずれかで表されるアミノ酸配列の中でも好ましくは、例えば、配列番号2～17、40及び41のいずれかで表されるアミノ酸配列であり、より好ましくは例えば配列番号9、11～17、40、及び41のいずれかで表されるアミノ酸配列である。

30

本発明のがん抗原ペプチドは、好ましくは9～15アミノ酸残基、より好ましくは9～12アミノ酸残基、更に好ましくは9～11アミノ酸残基、特に好ましくは10アミノ酸残基からなる。

本発明のがん抗原ペプチドは、好ましくは前記の配列番号1で表されるアミノ酸配列において、後記の配列番号2～17及び88～92のいずれかで表されるアミノ酸配列を含有する連続した9～20個のアミノ酸配列からなる。

本発明のがん抗原ペプチドは、特に好ましくは、配列番号17、88又は89で表されるアミノ酸配列からなる。

【0088】

本発明のがん抗原ペプチドは、前記「がん組織の悪性度の評価方法」においてDDX3X、又はDDX3Xの部分アミノ酸配列からなるペプチドについて説明したように、公知の方法によって、単離されたペプチドとして調製することができる。

40

本明細書中、「単離された」とは天然に存在する状態ではないことを意味する。

【0089】

本発明のペプチドは、塩の形態であってもよい。当該塩としては、例えば、塩酸、及びリン酸のような無機酸の塩；ならびに酢酸、及び酒石酸のような有機酸の塩が挙げられる。

また、本発明のペプチドは、糖類、ポリエチレングリコール、脂質等が付加された複合体、放射性同位元素等による誘導体又は重合体等の形態として用いることもできる。

【0090】

50

本発明のペプチドは、がん抗原ペプチドであることができる。

本明細書中、「がん抗原ペプチド」とは、がん特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）に認識され、又はさらにCTLを誘導し、又は/及びCTLを活性化し得るペプチドを意味する。

【0091】

本明細書中、「認識される」とは、認識するものが、認識される対象を他のものと見分けて認知し、例えば認知した対象に結合することを意味することができる。本明細書において、ペプチドを認識するとは、ヒト白血球抗原（HLA）及び当該ペプチドにCTLがT細胞受容体を介して結合することを意味することができる。

【0092】

また、本明細書中、「活性化する」とは、ある活性若しくは作用を有するもの又はその状態を、さらに増強する又は作動させることを意味することができる。特に、「CTLが活性化する」とは、CTLがHLAにより提示されたペプチドを認識することにより、例えばIFN- γ のようなエフェクターを産生すること、又は、CTLが認識した標的細胞に対して細胞傷害性を示すことを意味することができる。

【0093】

また、本明細書中、「誘導する」とは、ある活性又は作用を殆ど有さないもの又は状態から、その活性又は作用を発生させることを意味する。特に、「抗原特異的なCTLを誘導する」とは、インビトロ又はインビボにおいて、ある抗原を特異的に認識するCTLを分化及び/又は増殖させることを意味することができる。

【0094】

また、本明細書中、抗体又は抗原に関して「特異的」とは、免疫学的に選択的に結合することが可能な性質を示す。

【0095】

がんワクチン

本発明のがんワクチンは、前記した本発明のペプチドをがん抗原として含有する。

【0096】

本発明のペプチドは、単独で、又は各種担体とともに、がんワクチンに製剤することができる。

本発明のがんワクチンの剤形は、経口投与剤又は非経口投与剤のいずれであってもよい。一般的には非経口投与剤が好ましい。非経口投与剤としては、皮下注射剤、筋肉内注射剤、静脈内注射剤、座剤などが挙げられる。

【0097】

本発明のがんワクチンが経口投与剤である場合は、本発明のペプチドを、薬学的に許容されており、かつ本発明のペプチドのがん抗原としての活性を妨げない賦形剤とともに、がんワクチンに製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、重合アミノ酸、及びアルブミン等が挙げられる。

【0098】

本発明のがんワクチンが非経口投与剤である場合は、本発明のペプチドを、薬学的に許容されており、かつ本発明のペプチドのがん抗原としての活性を妨げない担体とともに、がんワクチンに製剤することができる。当該担体としては、例えば、水、食塩、デキストロース、エタノール、グリセロール、及びDMSO等が挙げられる。

本発明のがんワクチンは、更に、所望により、アルブミン、湿潤剤、及び/又は乳化剤などを含んでいてもよい。

また、細胞性免疫の賦活化のために、本発明のペプチドは適当なアジュバントとともに使用することができる。本発明のがんワクチンは、当該アジュバントを含有してもよい。

【0099】

更に、本発明のペプチドは、細胞傷害性T細胞（CTL）によるこのペプチドの認識を増強する化合物、又は、このペプチドを免疫学的に認識する抗体などとともに使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。本発明のがんワクチンは、当該化合物及び／又は抗体を含有してもよい。

【0100】

本発明のがんワクチンは、その剤形に応じた慣用の方法で製造できる。

【0101】

本発明のがんワクチンは、好ましくは、がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制のために使用される。

【0102】

本発明のがんワクチンは、その剤形に応じた投与方法により、ヒトに投与できる。

【0103】

本発明のがんワクチンの投与量は、ヒト成人に対して、有効成分である本発明のペプチドとして、例えば、0.01mg～100mg/日程度、好ましくは0.1mg～30mg/日程度を投与できる。投与間隔は、患者の症状、及び投与目的等に応じて適宜定めればよい。

10

【0104】

養子免疫用細胞の製造方法

本発明の一態様において、養子免疫用細胞の製造方法は、抗原提示能を有する細胞をDDX3X又はその部分ペプチドでパルスする段階を含む。

【0105】

抗原提示能を有する細胞としては、例えば、樹状細胞、マクロファージ、及び又はBリンパ球等が挙げられる。

20

【0106】

パルスは、例えば、抗原提示能を有する細胞を、濃度1～10μg/ml程度のDDX3X又はその部分ペプチドを含む培地中、温度20～30℃程度で30分間～1時間程度インキュベートすることにより行える。これにより、細胞表面に、DDX3X特異的CTLにより認識され得るがん抗原ペプチドを提示する細胞が得られる。当該細胞は単離された細胞であることができる。

【0107】

当該「DDX3Xの部分ペプチド」は、好ましくは、本発明のペプチドである。

【0108】

また、DDX3X特異的CTLにより認識され得る、DDX3X由来ペプチドを提示する細胞は、本発明のペプチドを提示する抗原提示細胞(APC)であることができる。

30

【0109】

このようにして得られた、DDX3X又はその部分ペプチドでパルスされたAPCは、DDX3X由来ペプチドを提示するAPCであることができ、DDX3X特異的T細胞の誘導剤として使用することができる。

当該APCは、養子免疫用細胞として、養子免疫療法のためにヒトに投与することができる。

【0110】

当該APCは、ヒトに投与する前に、公知の方法で培養してもよい。

【0111】

また、このようにして得られた、DDX3X又はその部分ペプチドでパルスされたAPCとともに、CTLへの分化能を有する前駆細胞をインキュベートすることにより、DDX3X特異的CTLを生体外で誘導することができる。このようにして得られたDDX3X特異的CTLは単離された細胞であることができる。

40

当該前駆細胞としては、CTLに分化できる細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球(PBMC)、ナイーブ細胞、メモリー細胞等が挙げられる。

【0112】

このようにして得られた、当該DDX3X特異的CTLもまた、養子免疫用細胞として、養子免疫療法のためにヒトに投与することができる。

【0113】

50

当該 D D X 3 X 特異的 C T L は、ヒトに投与する前に、公知の方法で培養してもよい。

【 0 1 1 4 】

すなわち、本発明の別の態様において、本発明の養子免疫用細胞の製造方法は、抗原提示能を有する細胞を D D X 3 X 又はその部分ペプチドに暴露して当該 D D X 3 X 又はその部分ペプチドに由来する抗原を提示する細胞を得る段階、及び当該細胞を用いて D D X 3 X 特異的 T 細胞を誘導する段階を含む。

【 0 1 1 5 】

前記 D D X 3 X 特異的 T 細胞は、好ましくは、D D X 3 X 特異的 C D 4 陽性 T 細胞である。

【 0 1 1 6 】

得られた養子免疫用細胞は、そのまま、又は各種担体とともに養子免疫用細胞組成物に製剤することができる。

養子免疫用細胞組成物の剤形は、経口投与剤又は非経口投与剤のいずれであってもよい。一般的には非経口投与剤が好ましい。非経口投与剤としては、皮下注射剤、筋肉内注射剤、静脈内注射剤、座剤などが挙げられる。

【 0 1 1 7 】

養子免疫用細胞組成物が経口投与剤である場合は、得られた養子免疫用細胞を、薬学的に許容されており、かつ当該養子免疫用細胞の活性を妨げない賦形剤とともに、養子免疫用細胞組成物に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、重合アミノ酸、及びアルブミン等が挙げられる。

【 0 1 1 8 】

本発明の養子免疫用細胞組成物が非経口投与剤である場合は、得られた養子免疫用細胞を、薬学的に許容されており、かつ当該養子免疫用細胞の活性を妨げない担体とともに、養子免疫用細胞に製剤することができる。当該賦形剤としては、例えば、水、食塩、デキストロース、エタノール、グリセロール、及び D M S O 等が挙げられる。

【 0 1 1 9 】

がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤

本発明の、がんの予防、治療、転移抑制、又は再発抑制剤は、D D X 3 X の発現又は活性を阻害する化合物を含有する。

【 0 1 2 0 】

D D X 3 X の発現を阻害する化合物としては、例えば、D D X 3 X 遺伝子のセンス鎖の一部又は全部の領域の配列（以下、単に標的配列と称する場合がある）に対して相補的な塩基配列（以下、単にアンチセンス配列と称する場合がある）を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

当該ポリヌクレオチドとしては、例えば、アンチセンスヌクレオチド、s i R N A (small interfering RNA) 及び s h R N A (small hairpin RNA) が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

前記標的配列の決定は、N C B I の B L A S T サーチによって実施、決定することができる。好ましくは、前記標的配列は、該 D D X 3 X 遺伝子のエキソン部位から選択される。また、前記標的配列は、標的 D D X 3 X 遺伝子の配列に対する特異性が高いことがより好ましい。

【 0 1 2 2 】

前記標的配列の塩基数は、例えば、15 ~ 30 塩基、好ましくは 18 ~ 25 塩基、より好ましくは 18 ~ 25 塩基、更に好ましくは 19 ~ 23 塩基、特に好ましくは 19 ~ 21 塩基である。

【 0 1 2 3 】

前記アンチセンスヌクレオチドは R N A であっても、D N A であってもよい。また、前記アンチセンスヌクレオチドは、D D X 3 X 遺伝子の発現を抑制し得る効果を有する限り

10

20

30

40

50

、1から数塩基（例、1～2塩基、1～3塩基、1～5塩基）が、少なくとも何れかの末端に付加されているか、内部において欠失、置換又は付加されている前記アンチセンス配列を有していてもよい。

【0124】

前記 *siRNA* としては、例えば、前記標的配列を含むポリヌクレオチド（センス鎖）と、アンチセンス配列を含むポリヌクレオチド（アンチセンス鎖）からなる2本鎖ポリヌクレオチドを使用することができる。

【0125】

前記センス鎖、及び前記アンチセンス鎖は、前記標的配列より、1若しくは数塩基（例、1～2塩基、1～3塩基、1～5塩基）長程長くなってもよく、例えば、末端（好ましくは3'末端）に2塩基のウラシル（U）が付加されていてもよい。また、前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖のいずれか又は両方は、DDX3X遺伝子の発現を抑制し得る効果を有する限り、が1から数塩基（例、1～2塩基、1～3塩基、1～5塩基）のU、T、G、C又はAが、少なくとも何れかの末端に付加されているか、内部において欠失、置換又は付加されている前記アンチセンス配列又は標的配列を有していてもよい。

10

【0126】

前記 *shRNA* (small hairpin RNA) としては、例えば、前記 *siRNA* のセンス鎖、及びアンチセンス鎖を含み、これらが、ヌクレオチド配列、非ヌクレオチド配列又はこれらの組み合わせからなる調節部分（ループ部分）で連結されたものが挙げられる。

【0127】

前記調節部分がヌクレオチド配列である場合、前記ヌクレオチド配列として、1塩基以上10キロ塩基未満のヌクレオチド配列、好ましくは1塩基長から数百塩基長のヌクレオチド配列、更に好ましくは1塩基長から数十塩基長のヌクレオチド配列、特に好ましくは1塩基長から20塩基長のヌクレオチド配列、あるいはスプライシングなどの細胞に備わる機構により細胞質において前記の長さのポリヌクレオチドを生じる配列からなるヌクレオチド配列が例示できる。また、前記調節部分を構成するヌクレオチド配列は、前記センス配列、及び前記アンチセンス配列を含んでもよい。さらに、前記調節部分を構成するヌクレオチド配列としては、ポリA、tRNA、UsnRNA、レトロウイルス由来のCTE配列などの細胞質移行性配列；NF結合配列、E2F結合配列、SSRE、NF-A Tなどのデコイ活性を有する配列；アデノウイルスのVA1又はVA2 RNAなどのインターフェロン誘導抑制配列；RNase抑制活性、アンチセンス活性、リボザイム活性等を有する配列；tRNAあるいは発現部位を特定するためのマーカー配列；検出のための大腸菌での選択マーカー配列などのいずれ1つ又はそれらの2以上の組み合わせ配列であってもよい。デコイ活性等の部分的二重鎖を必要とする機能配列は相補的なヌクレオチドを含むことにより作製されてもよい。さらに調節部分の配列の内部にイントロンのドナー配列、アクセプター配列を含むスプライシングに必要な配列を備えさせ、これによりスプライシング機構を有する細胞内において、調節部分の配列の一部が切り出されて再度連結されるように設計していてもよい。これら調節部分の配列の構成により、より所望のRNA機能抑制効果を増す効果や前記センス配列、及び前記アンチセンス配列の安定性が得られる。

20

30

40

【0128】

また、前記調節部分が非ヌクレオチド配列である場合、その具体例としては、ポリアミド骨格を有する核酸類似の化学合成アナログのPNA (peptide nucleic acid) を例示できる。

【0129】

そして更に、本発明では、DDX3X遺伝子発現抑制物として、前記DDX3X遺伝子の転写を抑制するための前記DDX3X遺伝子に対するデコイ型核酸を使用することもできる。

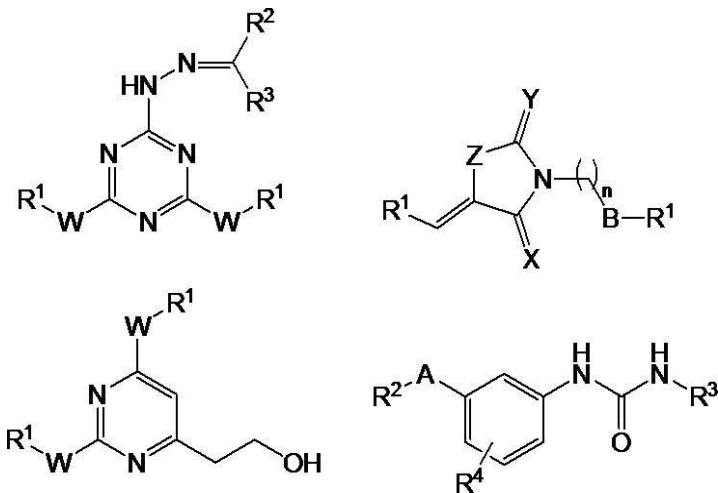
【0130】

DDX3Xの活性を阻害する公知の化合物としては、国際公開第2011/039735号パンフ

50

レットに記載されている化合物、具体的には、式：

【化 1】



10

[式中、

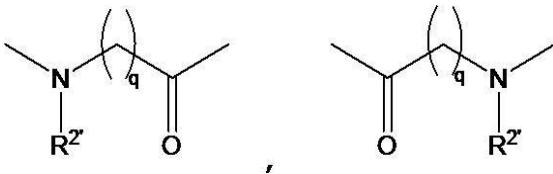
Z は C H₂ 又は S を表す。

X 及び Y は独立して O 又は S を表す。

n は 0 及び 4 の範囲内に含まれる。

B は存在しないか、

【化 2】



20

を表し (q は 0 及び 4 の範囲内に含まれ、

R² は水素、 - (C H₂)_w - O H , - (C H₂)_w - N H₂ (w ' は 1 ~ 3 の整数であり) を表す。)、 B はまた C = でもある。

R¹、 R²、 R³ は、それぞれ独立して

H、炭素数 1 ~ 6 個の直鎖又は分岐のアルキル基、非置換もしくは置換のフェニル基、非置換又は置換のフェニルアルケニル基、非置換もしくは置換のフェニルアルキニル基、非置換もしくは置換のビフェニルアルキル基、非置換もしくは置換の複素環基、非置換もしくは置換の多環式基、非置換もしくは置換の脂環基、又は (R^{1 a} -)_m (L -)_p R^{1 b} -

30

(式中、 R^{1 a} 及び R^{1 b} は、同一又は異なって、非置換もしくは置換の複素環基又は非置換もしくは置換のフェニル基を表し、 R^{1 a} はまた非置換もしくは置換の多環式基も表し、 L は、 - (C H₂)_q - 、 - H C = C H - 、 - C - C - 、 - C (= O) - 、 - O - 、 - S - 、 - S (= O) - 、 - S (= O)₂ - 、 - N H C O N H - 又は - N R^{1 c} - からなる群から選ばれる 2 個の連結基を表し、 R^{1 c} は、水素又はアルキルであり、 m 及び p は

40

それぞれ独立して 0 又は 1 であり、及び

q は 1 ~ 3 の整数である)

からなる群から選ばれ ; あるいは

R² 及び R³ は、一緒になって、シクロアルキル、シクロアルケニル、非芳香族複素環、又は縮合式もしくはポリ環式環、 2 - オキシインドール (当該シクロアルキル、シクロアルケニル、縮合式もしくは多環式非芳香族複素環は前記の群から選ばれる 1 又は 2 以上の置換基で置換されていてもよい) を形成してもよい。

W は存在しないか、又は独立して、 O、 S、 N H、 N H C H₂ 又は N - R⁵ (式中、 R⁵ は直鎖状又は分岐状の炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基である) を表す。

A は存在しないか、 C O N H、 N H C O、 又は N H C O N H を表す。

50

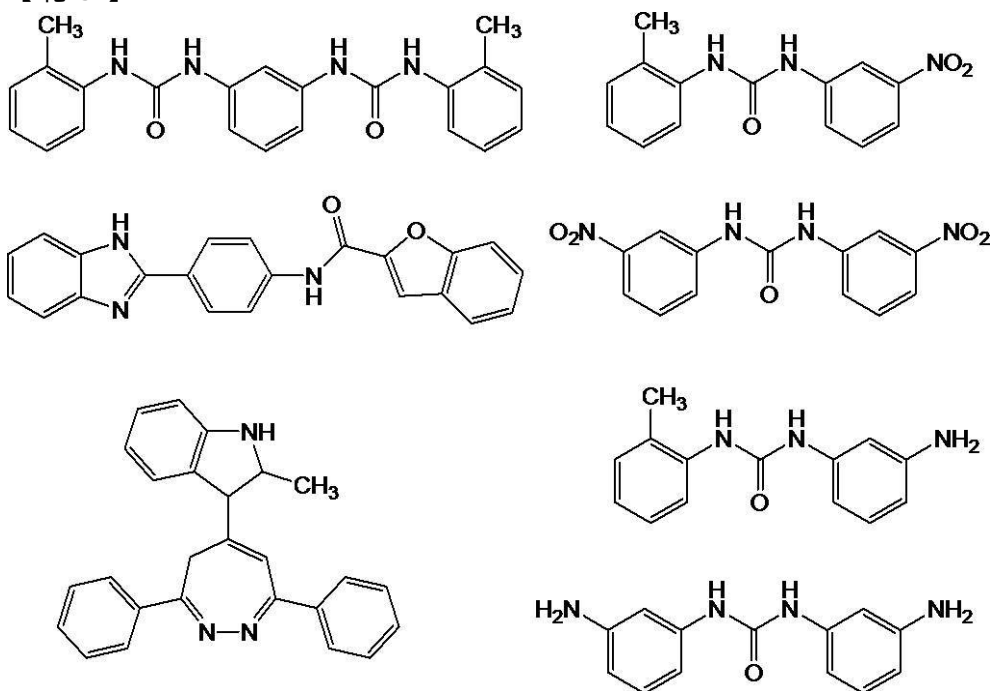
R⁴ は、H、非置換又は置換の炭素数 1 ~ 6 個のアルキル、非置換又は置換のアルケニル、非置換又は置換のアルキニル、ハロゲン、ハロアルキル、COOH、OCH₃、NO₂、NH₂、CN、OZ' 又はSZ' (式中、Z' はH又は非置換又は置換の炭素数 1 ~ 6 個のアルキルである) を表す。]

で表される化合物が挙げられる。

【0131】

さらに、DDX3Xの活性を阻害する公知の化合物としては、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 22, Issue 5, 1 March 2012, Pages 2094-2098に記載の化合物、具体的には次の化合物

【化3】

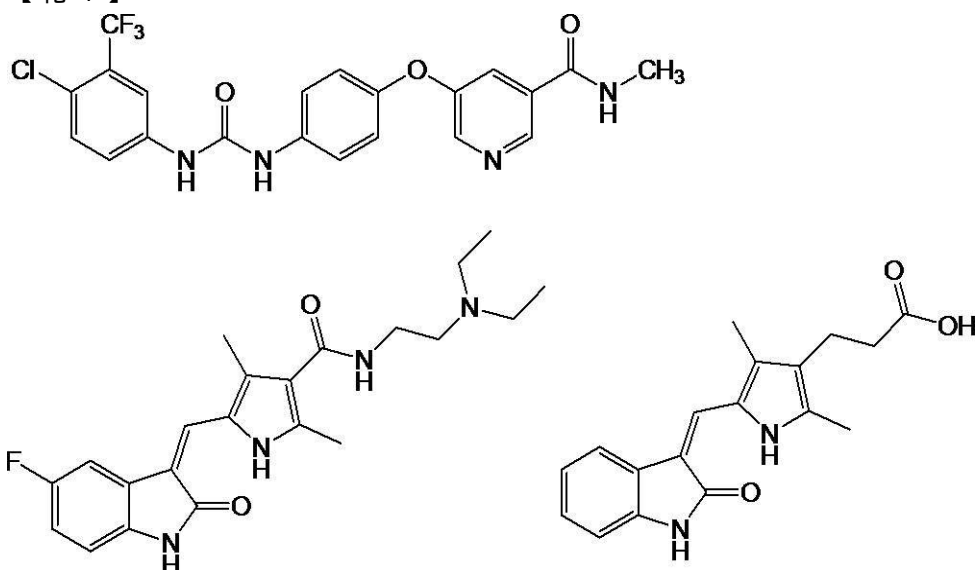


が挙げられる。

【0132】

さらに、DDX3Xの活性を阻害する公知の化合物としては、次の化合物：

【化4】



が挙げられる。

【0133】

これらの化合物は、薬学上許容される塩の形態であってもよい。

【 0 1 3 4 】

ヘリカーゼである D D X 3 X 阻害により、次の 4 つの m i R N A : hsa-mir-301a、hsa-mir-301b、hsa-mir-429、及び hsa-miR-3922 が減少する。従って、これらの m i R N A の 1 以上 (好ましくは全て) の活性を阻害することは、実質的に D D X 3 X の活性を阻害することを意味する。すなわち、m i R N A 活性を阻害する化合物は、本発明における、D D X 3 X の活性を阻害する化合物に含まれる。

これらの m i R N A の塩基配列を以下に示す。

【 0 1 3 5 】

hsa-mir-301a (miRBase アクセション番号 MI0000745) :

ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACUACUGUACUUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGCAUCUGAA
AGCAGG (配列番号 9 3) 10

【 0 1 3 6 】

hsa-mir-301b (miRBase アクセション番号 MI0005568) :

GCCGCAGGUGCUCUGACGAGGUUGCACUACUGUGCUCUGAGAAGCAGUGCAAUGAUUUGUCAAAAGCAUCUGGGACCA
(配列番号 9 4)

【 0 1 3 7 】

hsa-mir-429 (miRBase アクセション番号 MI0001641) :

CGCCGGCCGAUGGGCGUCUUAACCAGACAUGGUUAGACCUGGCCUCUGUCUAAUACUGUCUGGUAAAAACCGUCCAUCGCG
UGC (配列番号 9 5)

【 0 1 3 8 】

hsa-miR-3922 (miRBase アクセション番号 MI0016429) :

GGAAGAGUCAAGUCAAGGCCAGAGGUCCCACAGCAGGGCUGGAAAGCACACCUGUGGGACUUCUGGCCUUGACUUGACUC
UUUC (配列番号 9 6) 20

【 0 1 3 9 】

m i R N A 活性を阻害する化合物としては、当該 m i R N A の一部又は全部の領域 (以下、単に標的配列と称する場合がある) に対して相補的な塩基配列 (アンチセンス m i R N A 配列) を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

【 0 1 4 0 】

当該ポリヌクレオチドとしては、例えば、アンチセンスヌクレオチドが挙げられる。

【 0 1 4 1 】

前記標的配列の塩基数は、例えば、10 ~ 30 塩基、好ましくは 10 ~ 20 塩基、より好ましくは 12 ~ 18 塩基、更に好ましくは 14 ~ 16 塩基である。

【 0 1 4 2 】

前記アンチセンスヌクレオチドは、例えば、RNA、DNA、又は LNA である。また、前記アンチセンスヌクレオチドは、その配列において、m i R N A の活性を抑制し得る効果を有する限り、1 から数塩基 (例、1 ~ 2 塩基、1 ~ 3 塩基、1 ~ 5 塩基) が、少なくとも何れかの末端に付加されているか、内部において欠失、置換又は付加されている前記アンチセンス m i R N A 配列を有していてもよい。

【 実施例 】

【 0 1 4 3 】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【 0 1 4 4 】

以下の実施例では、以下の材料及び方法を用いた。

【 0 1 4 5 】

材料及び方法マウス

8 ~ 10 週齢の C 5 7 B L / 6 J (B 6) 系統の雌のマウスを、日本クレア社より購入し、無菌の環境で飼育し、実験に使用した。

全ての動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会により承認された実験である。

【 0 1 4 6 】

腫瘍細胞

B6由来のメラノーマ細胞であるB16F10を、インビトロで維持した。親腫瘍細胞をフィコエリスリン (P E) 標識抗CD133モノクローナル抗体 (13A4) と抗PEマイクロビーズ (ミルテニーバイオテク社) で標識した。CD133陽性腫瘍細胞とCD133陰性腫瘍細胞をautoMACS (商品名、ミルテニーバイオテク社) を使用して、メーカー提供のプロトコールに従って分離した。細胞の純度は、90%より高かった。

【 0 1 4 7 】

モノクローナル抗体及びフローサイトメトリー

マウスCD4 (G K 1 . 5 、 L 3 T 4) 、 CD 8 (2 . 4 3 、 L y t - 2) 、 CD 3 (2 C 1 1) 及びマウスCD62L (M E L 1 4) に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマはAmerican Type Culture Collectionより入手した。抗CD4モノクローナル抗体、抗CD8モノクローナル抗体、及び抗CD62Lモノクローナル抗体は、亜致死線量 (5 0 0 c G y) の放射線を照射したDBA/2マウスの腹水として得た。PE標識抗CD80 (1 6 - 1 0 A) モノクローナル抗体、抗CD86 (G L 1) モノクローナル抗体、抗CD62L (M E L 1 4) モノクローナル抗体、抗CD8 (2 . 4 3) モノクローナル抗体並びに抗CD25 (P C 6 1) モノクローナル抗体、フルオレッセンイソシアネート (F I T C) 標識抗Thy1.2 (3 0 - H 1 2) モノクローナル抗体及びanti-CD4 (G K 1 . 5) モノクローナル抗体は、BD Pharmingen社から購入した。0.5 ~ 1 x 10⁶個の細胞を、標識抗体を用いて直接免疫染色法で染色し、細胞表面の表現型 (フェノタイプ) を解析した。それぞれの検体 (サンプル) について、FACScan (商品名) フロー式マイクロフルオロメーターを使用して、総数10,000個の細胞について解析を行った (ベクトン デッキンソン社) 。アイソタイプのコントロールとしてBD Pharmingen社から購入したPE標識サブクラス認識抗体を使用した。検体は、解析ソフトCellQuest (商品名、ベクトン デッキンソン社) を使用して解析した。

【 0 1 4 8 】

T細胞の分別 (フラクション)

ナイロンウールカラム (和光純薬社) を使用して、リンパ節 (L N) 細胞からT細胞を濃縮した。高純度 (> 9 0 %) のCD62L低発現 (C D 6 2 L ^{l o w}) 細胞を得るために、リンパ節のT細胞をさらに、ヤギ抗ラットイムノグロブリン抗体 (I g A b) (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s 社) / 抗CD62L (M E L 1 4) モノクローナル抗体でコーティングしたT-25フラスコを用いたパニング法と、ヒツジ抗ラットI g A b / 抗CD62Lモノクローナル抗体結合DynaBeads M-450 (D y n a l 社) による磁気ビーズ法を用いて分離した。いくつかの実験では、さらに、Hiura T, Kagamu H, Miura S, Ishida A, Tanaka H, Tanaka J, et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. J Immunol. 2005;175:5058-66で述べた磁気ビーズを用いたディプリーション法により、CD4陰性細胞とCD8陰性細胞に分離した。高純度のCD4陽性細胞を純化する目的では、抗CD4モノクローナル抗体結合DynaBeadとDetachabeads (I n v i t r o g e n 社) によるポジティブセレクション法を用いた。

【 0 1 4 9 】

骨髄由来樹状細胞

樹状細胞 (D C) を、Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsu moto N, et al. CD40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. J Immunol. 2001;167:5678-88に記載された方法で、骨髄細胞 (B M) から生じさせた。簡潔に述べると、マウスの大腿骨及び脛骨から骨髄細胞を採取し、10ng/mlのリコンビナントマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (r m G M - C S F ; キリンビール社より

譲渡)を添加した完全培地(CM培地)を使用して、T-25フラスコの中で、37℃で2時間インキュベートした。非接着細胞を分離し、別の新たなフラスコで培養を続けた。6日目に、非接着細胞を穏やかなピペティングにより回収した。完全培地は10%のリポポリサッカライド(LPS)クオリファイド(エンドトキシフリー)非働化ウシ胎児血清、非必須アミノ酸 0.1 mM、ピルビン酸ナトリウム 1 μM、ペニシリン 100 U/ml、硫酸ストレプトマイシン 100 μg/ml(全てライフテクノロジーズ社)及び2-メルカプトエタノール 5×10^{-5} M(シグマケミカル社)を添加したRPMI 1640培地からなった。

【0150】

DC/腫瘍ワクチン所属リンパ節細胞

骨髄細胞と樹状細胞を完全培地の中で、同数の放射線照射腫瘍細胞(5,000 cGy)とともに一晩共培養した。樹状細胞と腫瘍細胞の混合接種細胞数 1×10^6 個となるように、B6マウスの両側腹部皮下に接種した。接種したBM-DC/腫瘍ワクチン所属リンパ節として単径部リンパ節を摘出した。Watanabe S, Kagamu H, Yoshizawa H, Fujita N, Tanaka H, Tanaka J, et al. The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity. J Immunol. 2003;171:5828-36.で述べた方法により、単細胞浮遊液を調製した。

10

【0151】

養子免疫療法

皮下腫瘍モデルを作成するため、100 μlのハンス液(Hanks' balanced salt solution: HBSS)に懸濁したB16-F10腫瘍細胞を、B6マウスの正中線上皮下に接種した。接種後2日目又は3日目に、マウスに、亜致死量(500 cGy)の放射線を照射し、その後BM-DC/腫瘍ワクチン所属リンパ節から分離したT細胞を静注した。これらのリンパ節細胞は、Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, et al. CD40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4(+) T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. J Immunol. 2001;167:5678-88で述べたように、十分な細胞数を得るために、抗CD3モノクローナル抗体(2C11)で刺激し、40 U/mlのIL2とともに3日間完全培地で培養したものである。皮下腫瘍の長径とそれに垂直な短径を、キャリパーを使用して測定した。

20

【0152】

サイトカインELISA

T細胞を、完全培地中で、固相化抗CD3モノクローナル抗体、又は抗原パルスしたBM-DCで刺激した。上清を回収し、IFN-γ、IL-4及びIL-17の濃度を、マウスIFN-γ、IL-4又はIL-17 ELISAキット(Genzyme社)を使用して、定量的サンドイッチ酵素抗体法によって測定した。方法は、メーカーのプロトコールに従った。

30

【0153】

in vitro増殖能測定

CD3刺激の前に、メラノーマ細胞を5 μMの二酢酸5-(6)-カルボキシフルオレセイン, N-スクシンイミジルエステル(5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE); Molecular Probes社)を含むハンス液の中で37℃、15分間ラベルし、2回洗浄した。CFSEラベルされた細胞と、ラベルされなかった細胞の比は、1:10であった。 1×10^5 /mlの前記腫瘍細胞を完全培地の中で培養し、計数し、及びマイクロフルオロメーターを使用して解析して、CFSEラベルされた細胞の数を決定した。

40

【0154】

イムノプロット解析

細胞を回収し、プロテアーゼインヒビター混合液(Sigma社)を含むノニデットP-40バッファーに溶解した。同じμg量のタンパク質を、7.5%のゲルを用いたSDS-PAGEに付し、polyvinylidene difluoride膜(ミリポ

50

ア社)に転写した。腫瘍細胞に対するイムノプロットティングは、DDX3X (Sigma社)とアクチン (Sigma社)に対する抗体を用いて行った。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した抗マウスIg及び抗ウサギIg (BioRad社及びDako社)を使用した。抗体が結合したタンパク質は、ECLキット (Pierce社)を使って、可視化した。全ての解析について、少なくとも3回の独立した実験を行った。

【0155】

shRNAによるDDX3Xのノックダウン

DDX3Xの発現抑制細胞は、shRNAレンチウイルスプラスミド (pLKO.1-puro; シグマ) を使用して作成した。DDX3X 標的配列を含むオリゴヌクレオチドは、CCGGACGTTCTAAGAGCAGTCGATTCCTCGAGAATCGACTGCTCTTAGAACGTTTTTTG (配列番号: 97) である。B16 CD133 陽性細胞を新鮮な培地に加え、それぞれのウェルに、8 µg/ml の hexadimethrine bromide を加えた。メーカーのプロトコールにしたがって、これらの細胞に、pLKO.1-puro プラスミドパッケージングベクターを導入した。遺伝子導入後約16時間で培地を交換し、その後さらに48~72時間培養した。被験細胞は、ピューロマイシン 2.0 µg/ml を含む新鮮培地で培養され、3~4日ごとに新しいピューロマイシン 2.0 µg/ml を含む培地で、薬剤耐性が同定されるまで、培地交換を行った。最低5つのピューロマイシン耐性コロニーをピックアップし、各クローン毎に解析のために細胞を増やした。DDX3Xのノックダウンの効果は、イムノプロットティングで確認した。

10

20

【0156】

統計学的解析

グループ毎の比較は、スチューデントのt検定により行った。動的な腫瘍増殖データは、多変量一般線型モデルにより解析した。差は、 $P < 0.05$ の場合、有意差があるとした。統計学的な解析は、SPSS統計解析ソフト (SPSS社) 又は、GraphPad Prism 5.0 ソフトウェアを使用した (GraphPad Software社)。

【0157】

DDX3X及びその部分ペプチド

DDX3X及びその部分ペプチドとしては、化学合成法により調製したものを使用した。

30

DDX3Xのアミノ酸配列は、前記配列番号1で表されるアミノ酸配列である。

ペプチドJのアミノ酸配列は、前記配列番号89で表されるアミノ酸配列である。

である。

ペプチドKのアミノ酸配列は、前記配列番号88で表されるアミノ酸配列である。

DDX3X-10merのアミノ酸配列は、前記配列番号17で表されるアミノ酸配列である。

DDX3X-15merのアミノ酸配列は、前記配列番号90で表されるアミノ酸配列である。

40

DDX3X-20merのアミノ酸配列は、前記配列番号91で表されるアミノ酸配列である。

である。

【0158】

実施例1

DDX3X特異的CD4陽性T細胞の、CD133陽性腫瘍抗原特異的サイトカイン放出

発明者らは、合成DDX3X抗原でプライミングされたT細胞がCD133陽性メラノーマ細胞を認識することができるかどうか検討した。この実験のために、CD62L低発現T細胞 (CD62L^{low}) を、合成DDX3Xでパルスされた樹状細胞を接種して得

50

た所属リンパ節から分離した。

96ウェルプレート中で、リンパ節から分離した 1×10^5 個のCD62L^{low}CD4陽性又はCD8陽性T細胞を、200 μ lの完全培地(CM)中の 1×10^4 個の樹状細胞で48時間刺激した。刺激用の樹状細胞は、同数の、5,000cGy放射線を照射したCD133陽性腫瘍細胞又はCD133陰性腫瘍細胞、又は合成DDX3X(5 μ g/ml)で一晩刺激した。樹状細胞は共培養に先立って、CD11cマイクロビーズで精製した。

発明者らは、こうして得られたDDX3X特異的CD4陽性T細胞が、メラノーマCSC特異的にIFN- γ とIL-17を分泌することを発見した。しかしながら、DDX3X特異的CD8陽性T細胞は、CD133陰性メラノーマ及びCD133陽性メラノーマ細胞の両方に応答した(図2、図3)。

次に発明者らは、メラノーマCSC特異的T細胞が、DDX3Xを認識し、サイトカインを産生するかどうかを検討した。その結果、CD133陽性メラノーマ細胞をワクチン接種して得た、メラノーマCSC特異的CD4陽性T細胞が、DDX3X特異的に、サイトカインを産生することが明らかとなった(図4、図5)。驚くべきことに、メラノーマCSC特異的CD4陽性T細胞は、メラノーマCSCそのものによる刺激よりも、DDX3X刺激において、より多くのサイトカインを産生した。

従って、DDX3X特異的CD4陽性T細胞は、DDX3Xを発現する腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有し、養子免疫療法に使用できる。

【0159】

実施例2

DDX3Xのワクチン接種によるメラノーマ細胞に対する防御免疫の誘導

合成DDX3Xをワクチン接種することにより、B16メラノーマ細胞に対する防御免疫が誘導されるかどうか実験するために、5 μ g/mlのDDX3Xをパルスした樹状細胞、5 μ g/mlのオプアルブミン(OVA)をパルスした樹状細胞、又は5,000cGy放射線照射したCD133陽性腫瘍細胞と8時間共培養した樹状細胞を、マウスの右側腹部の皮下にワクチン接種した。14日後に、前記マウスの腹部の正中線に沿って 2×10^6 個のメラノーマ細胞を皮下接種した。それぞれのグループのマウスの数は、5匹である。図6に示すように、無処理の樹状細胞又はOVAをパルスした樹状細胞による処理を受けたマウスと比較して、DDX3Xをパルスした樹状細胞のワクチン接種を受けたマウスでは腫瘍の成長が有意に抑制された。さらに、DDX3Xをパルスした樹状細胞をワクチン接種したマウスは、放射線照射されたCD133陽性腫瘍細胞と共培養した樹状細胞を接種したマウスよりも著しく強力な防御免疫を示した。

【0160】

実施例3

DDX3Xワクチン接種の、形成した皮膚腫瘍に対する治療効果

更に、DDX3Xのワクチン接種が確立した腫瘍に対する治療効果を有するかどうかを検討した。正中に 1×10^6 のB16メラノーマ細胞を腹部正中線に沿って皮下接種した後、2、9及び16日目に 1×10^6 の樹状細胞を右側腹部に接種した。5 μ g/mlのDDX3X又はOVAをパルスした 1×10^6 個の樹状細胞をマウスの右側腹部に皮下接種した。それぞれのグループのマウスの数は、12匹で行った。それぞれのマウスの腫瘍成長曲線を図7に示す。DDX3Xで刺激された樹状細胞をワクチン接種した12匹のマウスのうち6匹は、最終的には、治癒した。他のDDX3Xをパルスした樹状細胞を摂取したマウスでは、皮膚腫瘍の増殖が著しく抑えられた。無処理又はOVAをパルスした樹状細胞をワクチン接種したマウスは、全て腫瘍により死亡した。

【0161】

実施例4

CD133陽性メラノーマの免疫原性におけるDDX3Xの意義の確認

以前より、B16メラノーマ細胞が、多くの免疫原性タンパク質を有していることが示されている。

10

20

30

40

50

ここで、CD133陽性メラノーマの免疫原性におけるDDX3Xの意義を明らかにするために、発明者らは、shRNAによるDDX3Xのノックダウンにより、DDX3Xを欠いたCD133陽性メラノーマ細胞（DDX3X欠失CD133陽性B16細胞）を構築した。総線量5,000cGy放射線を照射した、モック-shRNA導入CD133陽性B16細胞、及びDDX3X欠失CD133陽性B16細胞を、樹状細胞（DC）と8時間共培養した。CD11cマイクロビーズとautoMACS（商品名）で精製した 1×10^6 個のCD11c陽性細胞を、B6マウスの皮下に接種した。免疫2週間後に、そのマウスの腹部正中線に沿って、 2×10^6 個のB16メラノーマ細胞を皮下に接種した。それぞれのグループのマウスの数は5匹であった。図8に示すように、CD133陽性親細胞、又は遺伝子導入のコントロールCD133陽性モック遺伝子導入腫瘍細胞は、効果的な防御免疫を有した。これに対して、DDX3Xを欠いたCD133陽性腫瘍細胞では、抗腫瘍防御免疫を誘導しなかった。すなわち、DDX3Xを欠いたCD133陽性メラノーマは、ワクチン効果を失っていた。

10

【0162】

実施例5

小細胞肺癌患者末梢血液15mlを採取した。リンホブレップ（商品名）（コスモ・バイオ株式会社）を用いた密度勾配遠心法により単核球細胞分画を採取し、CD14⁺細胞をCD14マイクロビーズとautoMACSを用いて分離した。CD14⁺細胞をrhGM-CSF（1ng/ml, キリンビールより譲渡）とIL-4（10ng/ml, R&D systems社）を加えて培養することにより、5日目までに樹状細胞に分化、成熟させ用いた。樹状細胞は合成DDX3X蛋白質（3.3μg/ml）又は同じ濃度のペプチド（ペプチドJ、ペプチドK）を含んだ培養液で一晩培養した後、CD11cマイクロビーズとautoMACSによりCD11c陽性細胞を純化し、抗原提示細胞として使用した。CD14⁻分画として得られた細胞からナイーブT細胞と制御性T細胞を除去するためCD62L^{high}細胞を抗ヒトCD62L抗体（1H3）結合ダイナビーズにより除いた。このCD62L^{low}CD14⁻細胞をBD BioCoat（商品名）T細胞活性化プレート（ベクトンディッキンソン社）上で48時間培養し、その後20U/ml rhIL-2（シオノギ製薬より譲渡）を含んだ培養液で4日間培養した。この結果10倍程に増加した細胞の95%以上がCD3⁺T細胞であることをFACSにより確認し、このCD3⁺T細胞を反応細胞として使用した。反応細胞 1×10^5 と抗原提示細胞 1×10^4 を200μlの培養液で丸底96ウェル・プレートにおいて24時間培養し、回収した上清のIFN濃度をELISA法により測定した。ポジティブコントロールとして抗CD3抗体が固相化された96ウェル・プレートでレスポナー細胞 1×10^5 を培養した上清を用いた。結果を図9に示す。

20

30

【0163】

実施例6

DDX3X由来ペプチドによるCTLの誘導及びIFN産生

DDX3X特異的CTLの誘導、及びDDX3X由来ペプチド刺激によるIFN産生評価を実施した。

使用した試薬類を表1に、誘導に用いたペプチドを表2に示す。

40

【表 1】

試薬名	供給元	カタログ番号
Lymphoprep	AXIS SHIELD	1114547
Hank's Balanced Salt Solution	SIGMA	H9269-500ML
ヘパリンナトリウム注	味の素	70111
AIM-V	life technologies	12055-091
Human AB Serum	大日本住友	2931949
Recombinant Human IL-7	PeptoTech, Inc.	200-07
Recombinant Human IL-2	PeptoTech, Inc.	200-02
セルバンカー	和光純薬工業	630-01601
OptEIA Kit (Human IFN- γ)	BD bioscience	555142
BD OptEIA Reagent Set B	BD bioscience	550534

10

【 0 1 6 4 】

【表 2】

ペプチド名	配列	供給元
DDX3X-10mer	LEDFLYHEGY	American Peptide Co. Inc.
DDX3X-15mer	KGADSLEDFLYHEGY	
DDX3X-20mer	FVETKKGADSLEDFLYHEGY	

20

【 0 1 6 5 】

< 培地類の調製 >

Human AB serumは56℃, 30minで非働化を行い, 0.22 μ m フィルター (Serum Acrodisc, Pall社) を用いて濾過して用いた。培地 (90% AIM-V + 10% human serum) は, 500mLのAIM-Vに50mLの非働化済みHuman AB serumをクリーンベンチ内で添加、及び混合したものをを用いた。ヘパリン含有HBSSは, 500mLのHank's Balanced Salt Solutionに10mLのヘパリンナトリウム注 (10000 U/mL) を添加・混合したもの (20 U/mLヘパリン) をを用いた。何れも使用時までには4℃にて保存した。

30

【 0 1 6 6 】

< 採血対象者の選抜 >

採血対象者は、HCT116が有するHLA-A*0201、又はソフトウェア (デカマーを選択した。) を用いた計算によってDDX3Xペプチドが高親和性を示すと予測されたHLA-A*2601を有する健常人ボランティアを選抜した。なおHLA-A*0201を有するボランティアは6名、HLA-A*2601を有するボランティアは5名であった。

40

【 0 1 6 7 】

< 末梢血由来単核球 (PBMC) の調製 >

健常人ボランティアより得られた末梢血 (40mL) を20mLあたり13mLのヘパリン含有HBSSで希釈し, Lymphoprep 15mLを入れたリンパ球分離チューブ (Leucosep (商品名)、Greiner社) へ重層した。遠心分離 (2000 rpm, 20分, 20min) 後, 中間層をPBMCとして50mL遠沈管に回収し, 倍量のヘパリン含有HBSSで希釈して再び遠沈した (1800 rpm, 20分, 5min)。得られたペレットを10mLのヘパリン含有HBSSで懸濁し, 遠沈した (1200 rpm, 4分, 5min)。この操作を再度繰り返した。得られたPBMCのペレットを

50

培地 1 mL で懸濁し， 1.5×10^7 細胞を DDX3X 特異的 CTL 誘導用に用い，残りを再刺激時の抗原提示細胞用に用いた。再刺激時の抗原提示細胞用 PBM C についてはセルパンカーに懸濁して -80 凍結保存し，使用時に融解して用いた。

【0168】

< DDX3X 特異的 CTL の誘導 >

PBM C 1.5×10^7 細胞 を 1.5×10^6 細胞 / well で 24 ウェルプレートへ播種した (Day 0)。次に各 well に DDX3X 由来ペプチド 3 種類 (最終濃度は各 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$) 及び IL-7 (最終濃度 $10 \text{ng} / \text{mL}$) を添加し 37 , 5% CO₂ で培養した。

1 週間後 (Day 7)，再刺激を行った。再刺激にはまず，抗原提示細胞として Day 0 で凍結保存した PBM C を融解し，細胞数を 3×10^6 細胞 / mL 以下に調製し DDX3X 由来ペプチド 3 種を最終濃度各 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ に添加して 37 , 2 時間標識した。続いてマイトマイシン C [協和発酵キリン] 溶液を最終濃度 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ となるように添加し，37 , 45 分間処理した。この細胞を AIM-V で 2 回洗浄し，培地に再懸濁し抗原提示細胞懸濁液とした。次に，1 週間培養していた細胞を回収し， 1.2×10^6 細胞 / ウェルで 24 ウェルプレートへ播種し，抗原提示細胞懸濁液を等しい細胞数で播種した。最後に IL-7 を $10 \text{ng} / \text{mL}$ となるように添加し，37 , 5% CO₂ で培養した。2 日後 (Day 9) に各ウェルの培養液を半量静かに抜き取り，代わりに $40 \text{U} / \text{mL}$ の IL-2 含有培地を添加して培養を続けた。その後一日おき (Day 11, Day 13) に $20 \text{U} / \text{mL}$ の IL-2 含有培地で同様に培養液の半量交換操作を行った。Day 14 及び Day 21 にも同様の操作で再刺激を行い， $20 \text{U} / \text{mL}$ IL-2 存在下で共培養し，一日おき (Day 16, Day 18, Day 20 及び Day 23, Day 25, Day 27) に $20 \text{U} / \text{mL}$ の IL-2 含有培地で同様に培養液の半量交換操作を行い，Day 28 まで培養を継続した。

【0169】

< DDX3X 由来ペプチド刺激による IFN 産生評価 >

Day 21, Day 28 で回収した細胞を培地で適宜希釈し 96 穴丸底プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ播種した。続いて DDX3X 由来ペプチドが $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ 含まれる培地を調製し，同じく 96 穴丸底プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し (ペプチド終濃度 = $20 \mu\text{g} / \text{mL}$)，5% CO₂ / 37 にて培養した。なお ELISA は各刺激に対してトリプレットで実施した。なお陰性対照刺激として溶媒である DMSO による刺激を採用した。

ペプチド刺激後 24 時間培養した後，静かに各ウェルから培養上清を回収した。各培養上清中の IFN- γ 濃度は，ELISA 試薬セット (BD OptEIA ELISA set (human IFN- γ)) (商品名) を用い，添付プロトコルを改変して ELISA を行なった。すなわちコーティング用抗体，検出用抗体，HRP 標識抗体は 500 倍希釈で使用した。測定は可波長吸光マイクロプレートリーダー (VERSAmax (商品名)、Molecular Device 社) で行なった。

【0170】

< 結果 >

結果を、図 10 に示す。図中各ドナー (A ~ J) についての棒グラフのカラムは、左から、DMSO、10mer、15mer、20mer を表す。

Day 21 評価時には A*0201 を有する 3 検体は何れの刺激でも IFN 産生は認められなかった。一方 A*2601 を有する 5 検体中 2 検体で DDX3X-10mer 刺激時にのみ IFN 産生が認められた。

続いて Day 28 評価時には A*0201 を有する 6 検体中 1 検体において DDX3X-10mer 刺激時に IFN 産生が認められた。一方 A*2601 を有する 5 検体のうち Day 21 に DDX3X-10mer 刺激時 IFN 産生の認められた 2 検体以外にも，新たに 1 検体が DDX3X-20mer 刺激時に IFN 産生が認められた。

以上より健常人 PBM C を DDX3X 由来ペプチド刺激することにより，刺激特異的な IFN 産生細胞の誘導が可能なが示された。

10

20

30

40

50

【0171】

実施例7

DDX3X / DC免疫刺激CD4陽性T細胞の抗腫瘍効果

樹状細胞を、5 μg / mLの合成DDX3Xで8時間パルスし、CD11c マイクロビーズとautoMACS (商品名)で、CD11c陽性細胞(DDX3X / DC)として分離した。CD62L^{low} T細胞は、DDX3X / DCワクチン所属リンパ節から分離した。リンパ節T細胞であるCD62L^{low} T細胞は、'材料及び方法'で述べた方法に従って、5日間培養した。培養されたCD62L^{low} T細胞を、亜致死量(500 cGy)の全身放射線照射を行った後2日間経った皮膚メラノーマを有するマウスに、静注した。DDX3X特異的T細胞は、抗腫瘍活性を有し、皮膚腫瘍の成長を著しく抑制することが明らかとなった(図11A)。

10

このことから、DDX3X / DC ワクチン所属リンパ節T細胞が抗腫瘍治療効果をもつことが明らかとなった。

さらに、CD4陽性T細胞又はCD8陽性T細胞のいずれが抗腫瘍活性を担っているかを調べた。培養5日後のリンパ節T細胞を磁気ビーズを用いて精製して、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞を得た。10 × 10⁶個のCD4陽性リンパ節T細胞又はCD8陽性T細胞を静注した。10 × 10⁶個のCD8陽性T細胞を、亜致死量(500 cGy)の全身放射線照射を行った後2日間経った皮膚メラノーマを有するマウスに注入したが、有意な抗腫瘍活性は認められなかった。これに対して、DDX3X特異的CD4陽性T細胞は、高い抗腫瘍活性を示し、その結果、腫瘍が治癒した(図11B)。

20

【0172】

実施例8

DDX3Xの特異的発現

DDX3Xがヒトの腫瘍細胞に発現しているかどうか検討するために、推定CSCマーカーであるCD133、CD44、及びCD24について、87.5及びS2(ヒト小細胞肺癌)、HCT116(ヒト大腸癌)、A549(ヒト非小細胞癌性肺癌)、WM115(ヒトメラノーマ)、及びMCF7(ヒト乳癌)細胞を解析した。

図12に示すように、87.5及びHCT116は、CD133を発現しており、その他の細胞は発現していなかった。87.5細胞は、浮遊凝集体状に増殖し、容易に腫瘍塊を形成した。MCF7は、CD44⁺及びCD24^{- / low}の表現型を示し、一般的な乳癌幹細胞の表現型であると考えられた(後記参考文献1~3)。

30

参考文献1: Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100:3983-8.

参考文献2: Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer research. 2005;65:5506-11.

参考文献3: Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. Breast Cancer. 2010;17:80-5.

また、正常ヒト細胞(ヒト上皮角化細胞(NHEK)、ヒト微小血管内皮細胞(HMEC)、正常ヒト気管支上皮細胞(NHBE))及び癌細胞(87.5、S2、HCT116、A549、WM115、MCF7)から全細胞溶解液を抽出した。DDX3X及びアクチンに対する抗体を用いて、腫瘍細胞に対するイムノプロット分析を行った。

40

実験に使用された全ての細胞においてDDX3Xが発現されていたのに対して、正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)、ヒト微小血管内皮細胞(HMEC)及び正常ヒト気管支上皮細胞(NHBE)では、DDX3Xはわずかしか発現していなかった。さらに、87.5、HCT116及びMCF7のような、推定CSCマーカー陽性細胞では、DDX3Xが強く発現していた(図13)。従って、DDX3Xは、マウスメラノーマ幹細胞で発現するのみでなく、ヒトの様々な腫瘍で発現することが示された。

50

【0173】

実施例 9

ヒト株化大腸癌細胞 HCT 116 は CD 133 陽性細胞がその大部分を占め、DDX3X を高発現している。レンチウイルスベクターにより導入した shRNA により DDX3X をノックダウンした 1 - 4 細胞とモック (mock) 遺伝子導入細胞である 1 - 6 細胞を用いて、細胞キズ修復実験を行った。なお、1 - 4 細胞と 1 - 6 細胞の増殖速度に差がないことを予め確かめている。24 - ウェル・プレートに同数蒔いた 1 - 4 細胞と 1 - 6 細胞がサブコンフルエントに至った状態でピペットチップにより直線状に細胞剥離を行い、その後経時的に傷修復の経過を観察した。その結果、DDX3X をノックダウンした 1 - 4 細胞では、組織修復が遅延した (図 14)。

【0174】

10

実施例 10

株化した小細胞肺癌細胞は DDX3X を大量に発現していたことから、小細胞肺癌患者末梢血中に DDX3X を認識してサイトカイン産生する T リンパ球が存在するか検討した。本研究は新潟大学医学部倫理委員会において承認されている。

インフォームドコンセントを得た後、末梢血液 15 ml を採取した。リンホブレップ (商品名) (コスモ・バイオ株式会社) を用いた密度勾配遠心法により単核球細胞分画を採取し、CD 14⁺ 細胞を CD 14 マイクロビーズと autoMACS を用いて分離した。CD 14⁺ 細胞は rhGM-CSF (1 ng/ml, キリンビールより譲渡) と rhIL-4 (10 ng/ml, R&D Systems 社) を加えて培養することにより、5 日目までに樹状細胞に分化した。樹状細胞は合成 DDX3X 蛋白質 (3.3 µg/ml) 又は同じ濃度の OVA を含んだ培養液で一晩培養し、CD 11c 陽性細胞を CD 11c マイクロビーズと autoMACS により純化し、抗原提示細胞として使用した。CD 14⁻ 分画として得られた細胞からナイーブ T 細胞と制御性 T 細胞を除去するため CD 62L^{high} 細胞を抗 CD 62L 抗体 (1H3) 結合ダイナビーズにより除いた。この CD 62L^{low} CD 14⁻ 細胞を BD BioCoat (商品名) T 細胞活性化プレート (ベクトンディッキンソン社) 上で 48 時間培養し、その後 20 U/ml rhIL-2 (シオノギ製薬より譲渡) を含んだ培養液で 4 日間培養した。この結果得られた細胞の 95% 以上が CD 3 陽性 T 細胞であることを FACS により確認し、反応細胞として使用した。反応細胞 1×10^5 と抗原提示細胞 1×10^4 を 200 µl の培養液で丸底 96 ウェル・プレートにおいて 24 時間共培養した。共培養後回収した上清を用いて ELISA 法により IFN 濃度を測定した。抗原提示細胞として、蛋白質のパルスを行っていない樹状細胞、DDX3X をパルスした樹状細胞、OVA をパルスした樹状細胞を用いた。表 3 中、Yes は、DDX3X をパルスした樹状細胞と共培養したときのみ T 細胞から有意差を持った IFN 産生が認められたことを示している。なお、表中 % Treg と % Teff は、末梢血から分離した直後に単核球分画を FACS 解析し、総 CD 4⁺ T 細胞数に対する制御性 T 細胞比率、エフェクター T 細胞比率を示したものである。FACS 解析は、Koyama K, Kagamu H, et al. Reciprocal CD4⁺ T-cell balance of effector CD62L^{low} CD4⁺ and CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. Clin Cancer Res. 2008;14:6770-9. に報告した通り、CD 62L^{high} CD 25⁺ CD 4⁺ T 細胞を制御性 T 細胞 (Treg)、CD 62L^{low} CD 4⁺ T 細胞をエフェクター T 細胞 (Teff) として行った。

20

30

40

この結果、健常者 (HV)、遠隔転移を有している小細胞肺癌患者 (SCLC-ED)、治癒した小細胞肺癌患者では、一例も DDX3X に反応する T 細胞を検出できなかったが、遠隔転移のない小細胞肺癌 (SCLC-LD) では 12 名中 5 名で DDX3X に反応し特異的 IFN 産生を示す T 細胞が存在していることが明らかとなった。これは、DDX3X 特異的 T 細胞を有する小細胞肺癌患者の予後が良好であることを示している。

表中、「Yes」は、血中に DDX3X - 特異的 T 細胞が検出されたことを表し、「No」は、血中に DDX3X - 特異的 T 細胞が検出されなかったことを表す。

【表 3】

	被試験者	DDX3X- 特異的 T細胞	%Treg	%Teff
SCLC- LD	#1	Yes	2.83	30
	#2	Yes	1.06	26
	#3	No	3.88	8.8
	#4	No	3.48	9.7
	#5	Yes	4.88	30
	#6	No	4.95	
	#7	No	7.53	
	#8	No	8.59	
	#9	No		
	#10	No		
	#11	Yes		
	#12	Yes	4.23	
SCLC- ED	#13	No	4.15	60
	#14	No	3.47	5.3
	#15	No	1.62	30
	#16	No	6.49	
	#17	No	4.03	
	#18	No	1.82	12
治癒した SCLC	#19	No	2.36	
	#20	No	4.84	16.6
	#21	No	3.98	21
	#22	No	1.92	13.4
	#23	No		27
HV	#24	No	0.95	8.1
	#25	No	1.56	8.7
	#26	No	2.37	
	#27	No	1.12	16.2
	#28	No	1.87	21.2
	#29	No	1.57	

10

20

30

【0175】

実施例 1 1

40

ヒト株化大腸癌細胞 HCT 116 から DDX3X ノックダウンした 1 - 4 細胞の浮遊細胞集塊 (スフェロイド) 形成能を検討した。非接着状態での培養において、親株 HCT 116 (CDD133+) はスフェロイド形成する能力を有しているが、DDX3X 発現を失った 1 - 4 細胞にスフェロイド形成能はみられなかった (図 15)。

【0176】

実施例 1 2

DDX3X は RNA ヘリカーゼ活性を有し、C.elegans や Drosophila では miRNA の核 - 細胞質輸送、プロセッシング、成熟に関わることが知られているが、ヒト細胞において miRNA に関与していることは報告されていない。そこで、DDX3X を高発現しているヒト腫瘍細胞、HCT 116 において DDX3X をノックダウンすることで変動する

50

miRNAが存在するかを検討した。

HCT116細胞からDDX3Xをノックダウンした1-4細胞とモック導入細胞である1-6細胞を用いて、miRCURY LNAgeneration (商品名) microRNA Array 6th generation (フィルジェン社)を行った。アノテーション情報としてmiRBase Release17を使用し、アレイの読み取りにはGenePix 4000B (Molecular Devices社)、画像の数値化及び補正はArray-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics社)、ノーマライズにはLocal regression法を用いた。検討した2684のmiRNAのうち、1-6細胞に対して1-4細胞で発現が増加しているものは認められなかった。一方、Normalized intensity 10, Normalized intensity (sum) Negative controlの平均値(=85)を満たし、1-6細胞に対して1-4細胞でNormalized intensity ratio 0.5と減少していたmiRNAとしてhsa-miR-301a、hsa-miR-429、hsa-miR-301b、hsa-miR-3922-3pの4つを見出した。

10

【図1】

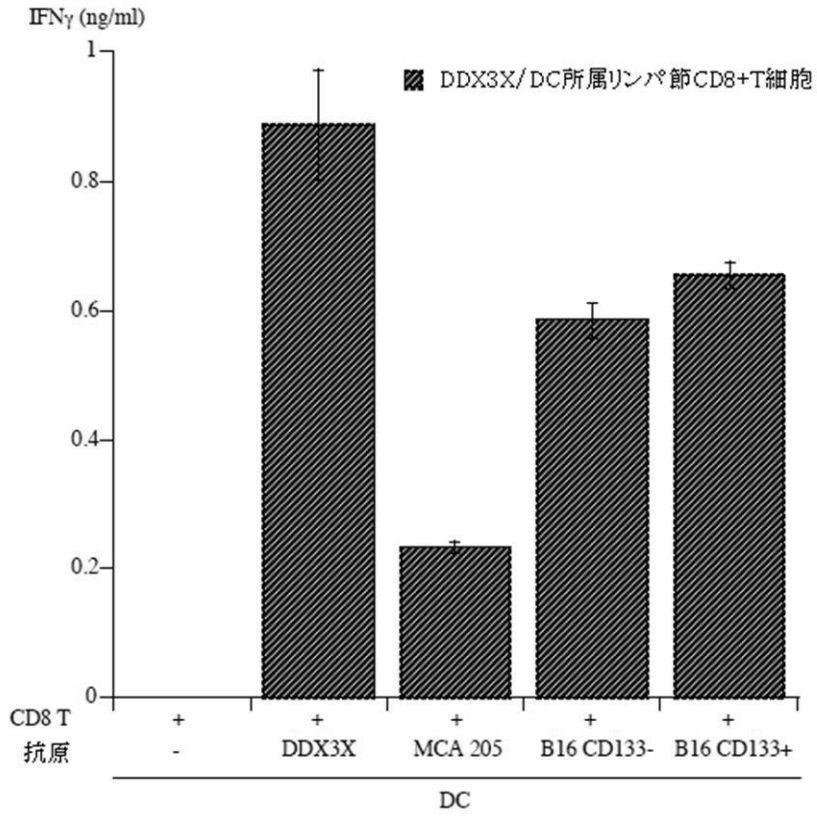
配列番号1:

```

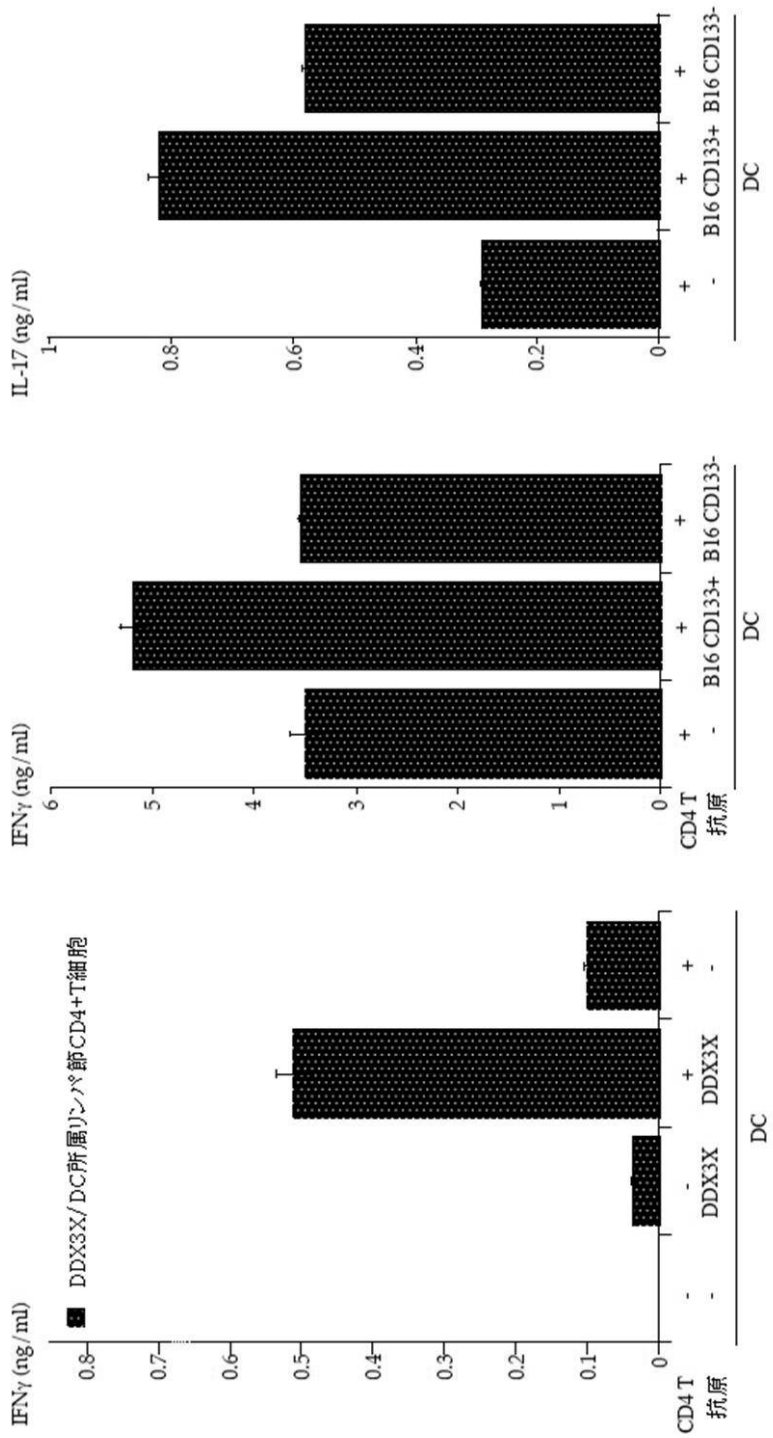
1 mshvavenal gldqqfagld lnssdnqsgg staskgryip phlrnreatk gfydkdssgw
61 ssskdkdays sfgsrdsrg kssffsdrsg gsrgrfddrg rsdydgigsr gdrsgfgkfe
121 rggnsrwodk sdeddwsopl ppsrleqel fsggntginf ekyddipvea tgnncpphie
181 sfsdvemgei imgnieltry trptpvqkha ipiikekrdl macaqtgsgk taafllpils
241 qiysdgpgea lramkengry grrkqypisl vlaptrelav qiyeearkfs yrsrvrvcvv
301 ysgadigqqi rdlergchll vatpgrlvdm mergkigldf ckylvldead rldmgfepq
361 irriveqdtm ppkgvrhtmm fsatfpkeiq mlardfldey iflavgrvgs tsenitqkvv
421 wveesdkrsf lldllnatgk dsltlvfvet kkgadsledf lyhegyacts ihgdrsqdr
481 eealhqrsg kspilvatav aargldisnv khvinfdlps dieeyvhrig rtgrvgnlgl
541 atsffnemi nitkdllldll veakqevpsw lenmayehhy kgssrgrsks srfsggfear
601 dyrqssgass sfsrass srsggghgs srgfsggyg gfynsdgygg nynsqgvdww
661 gn

```

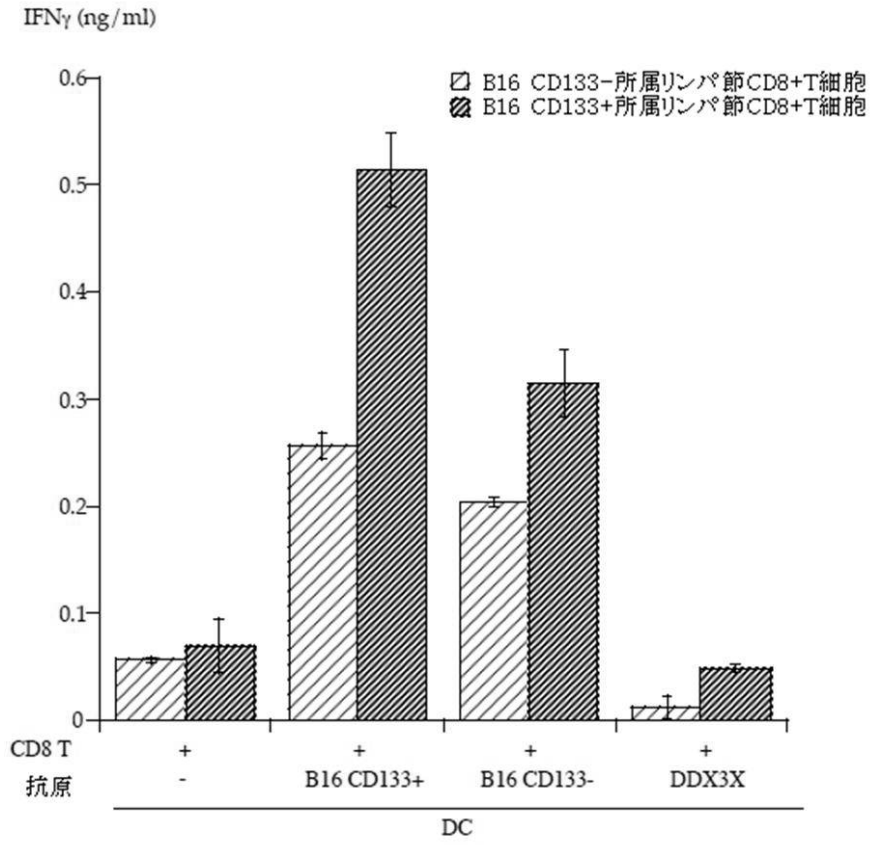
【 図 2 】



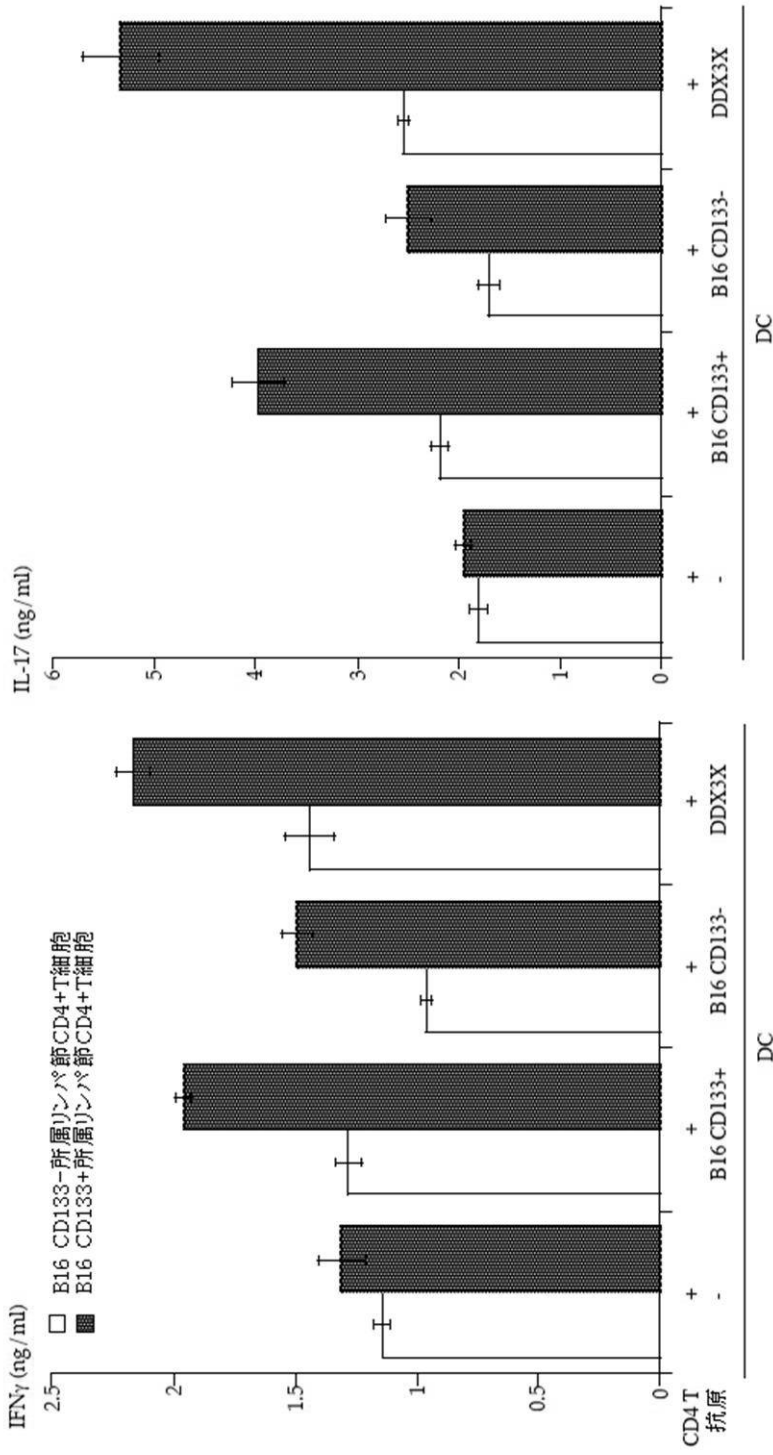
【 図 3 】



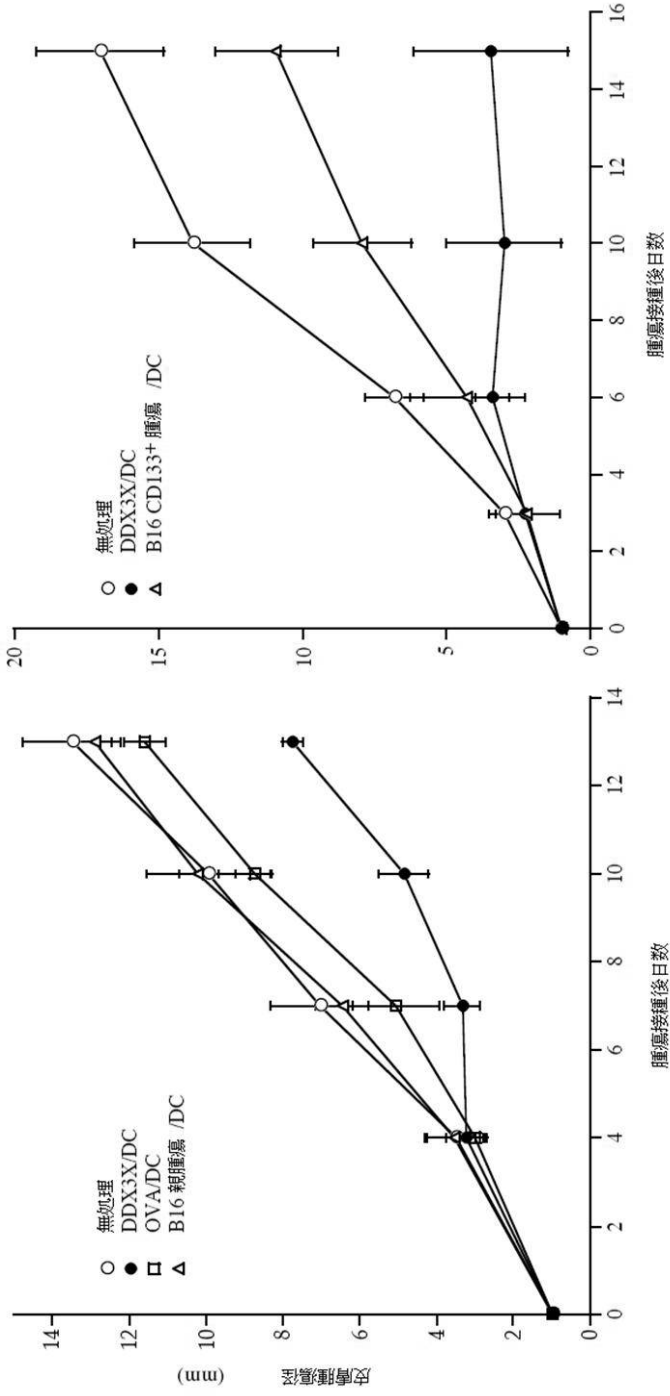
【 図 4 】



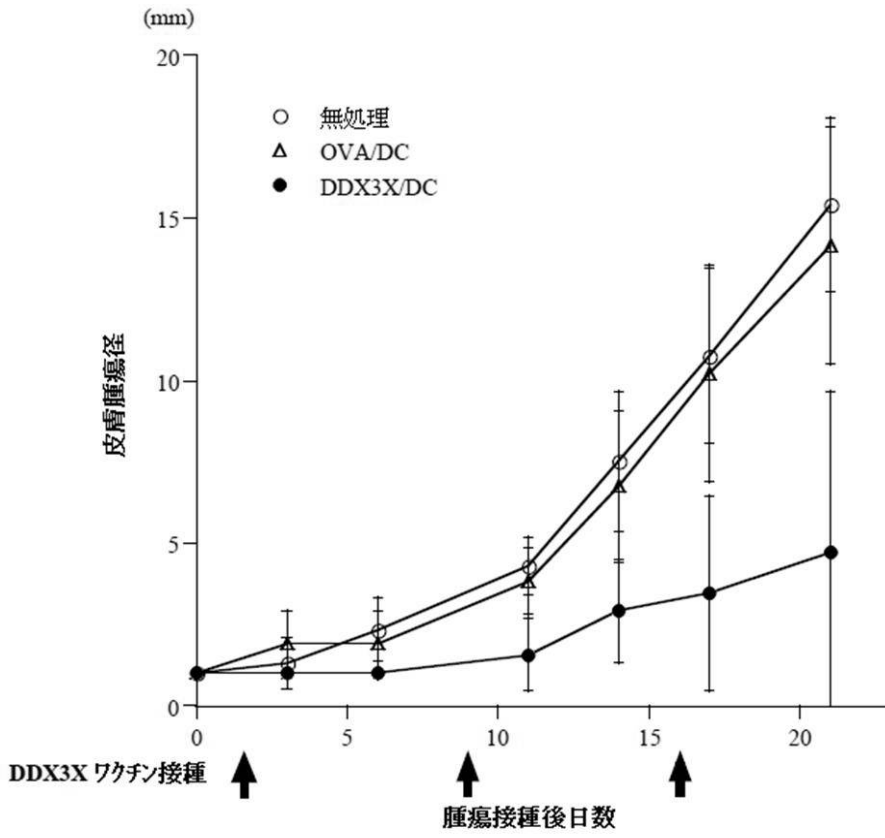
【 図 5 】



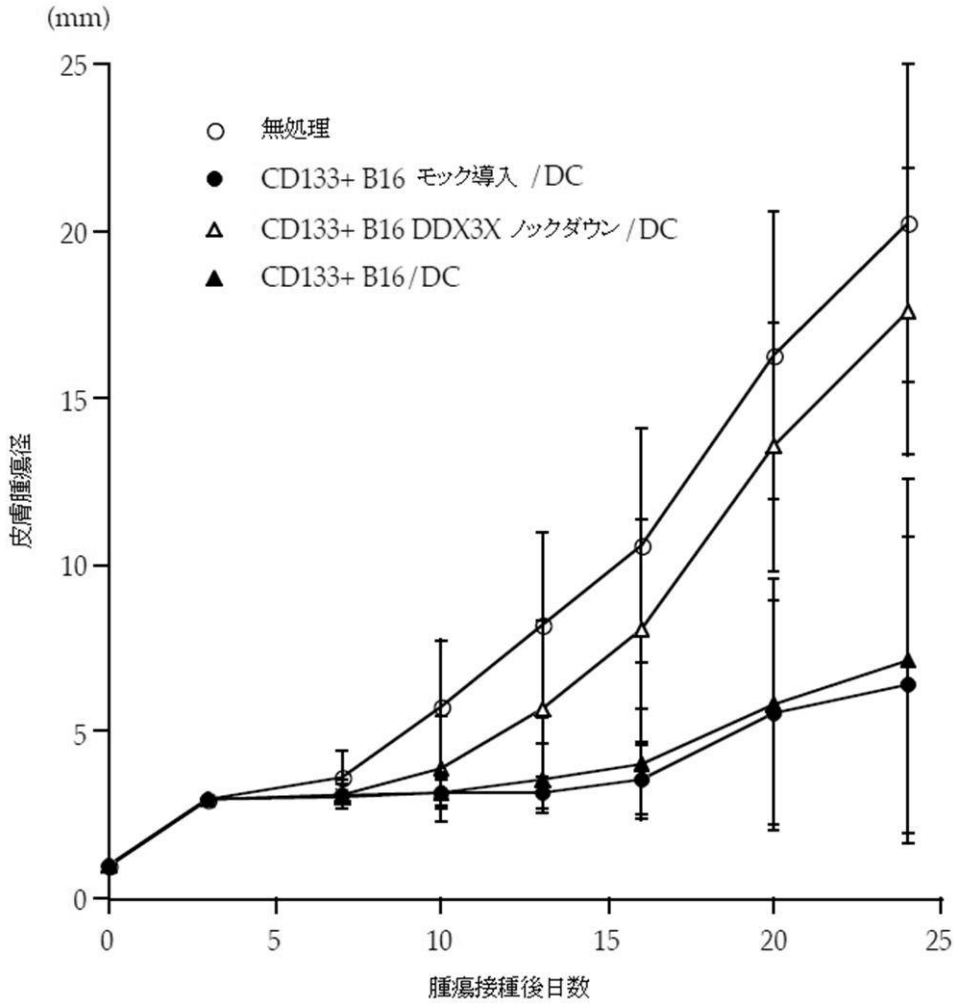
【 図 6 】



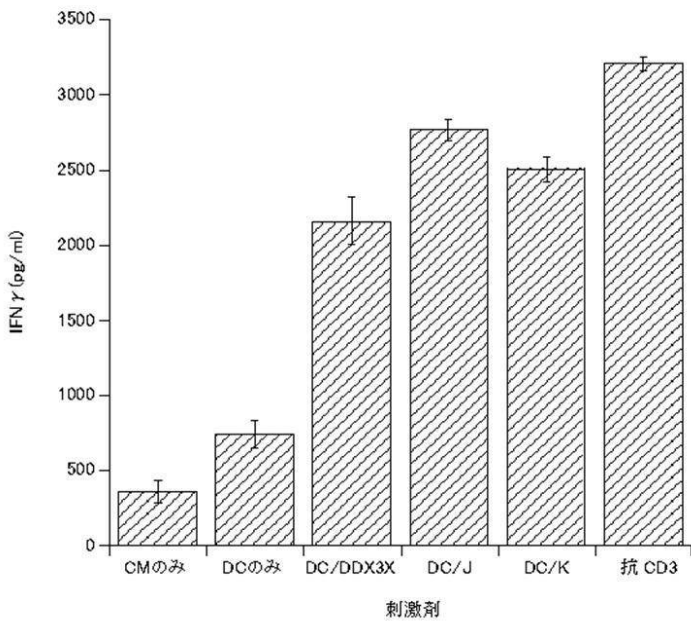
【 図 7 】



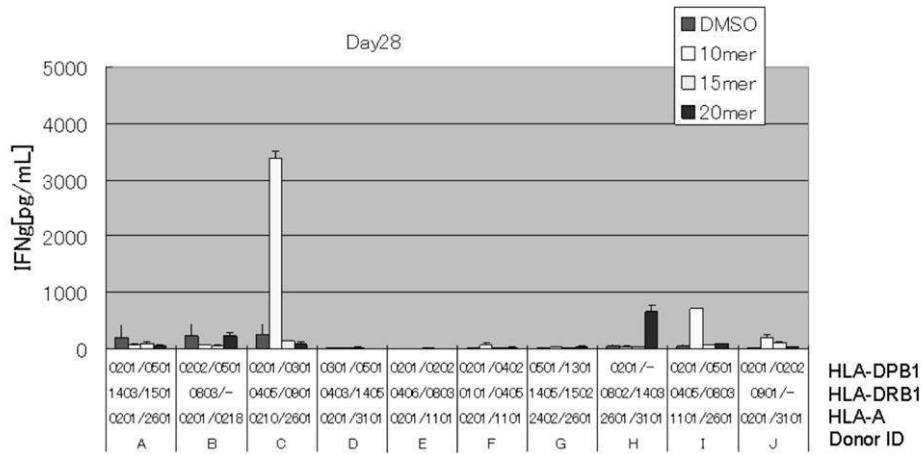
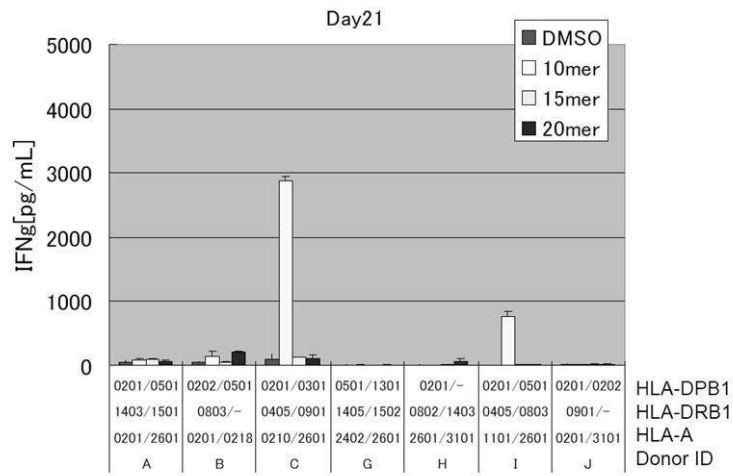
【 図 8 】



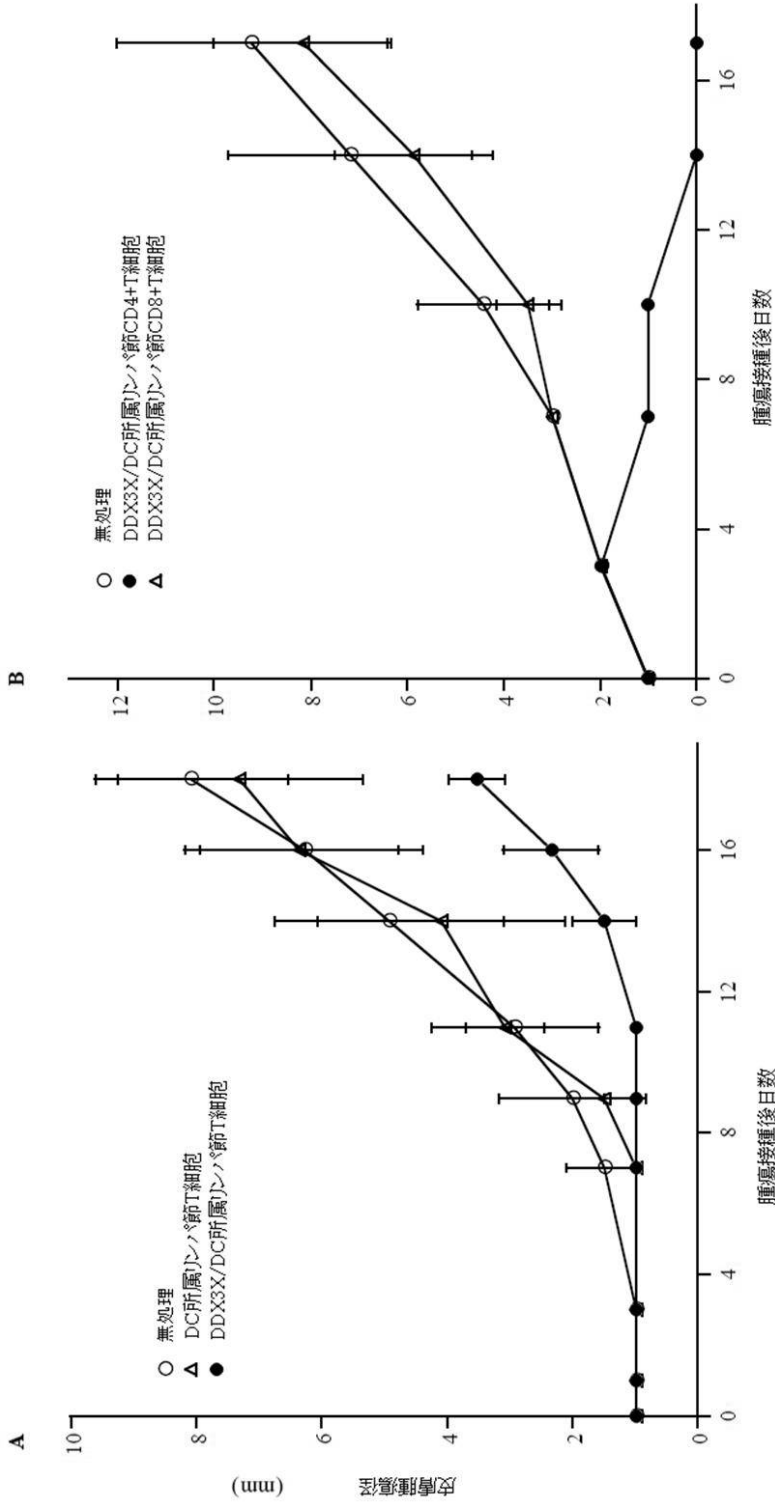
【 図 9 】



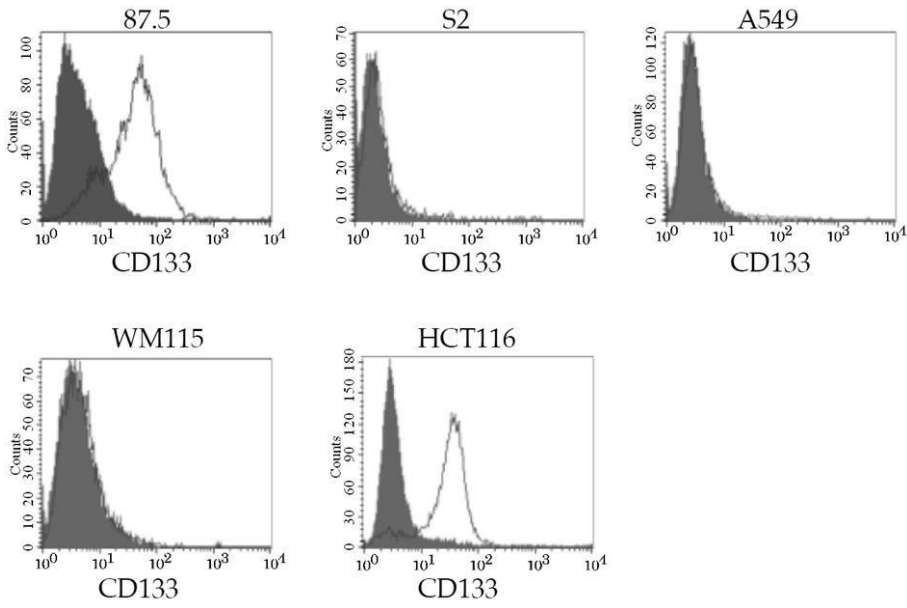
【 図 10 】



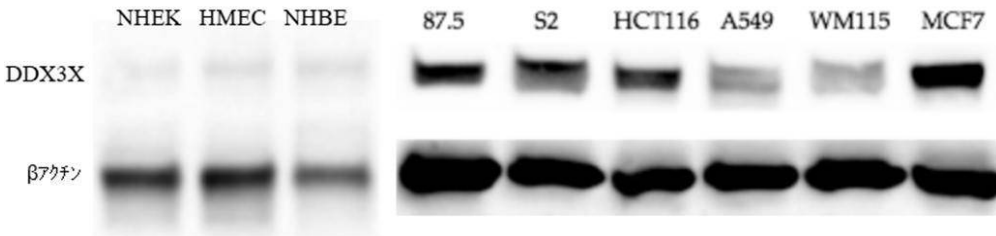
【 図 1 1 】



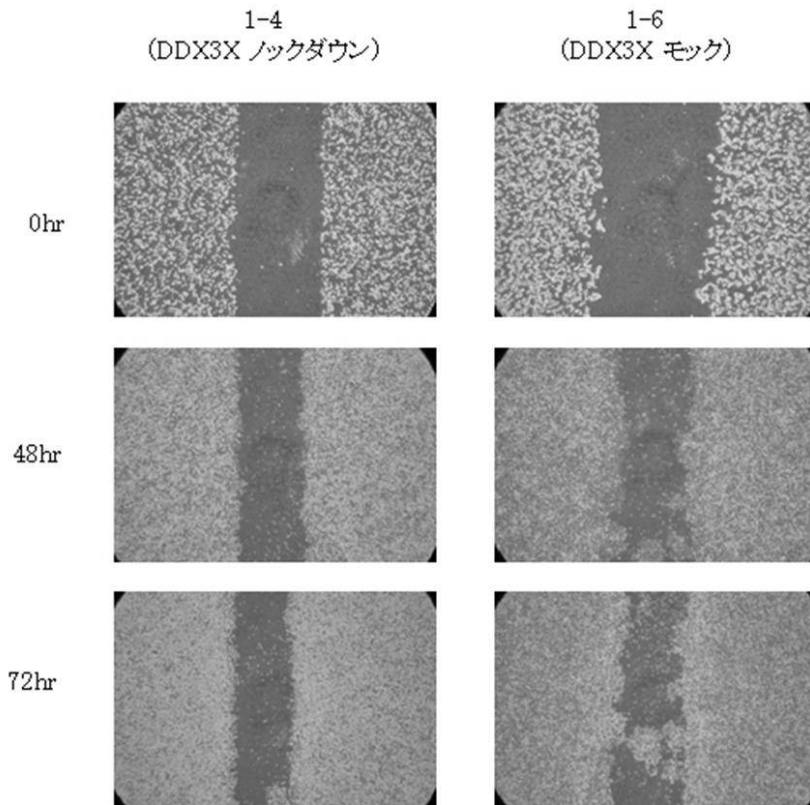
【 図 1 2 】



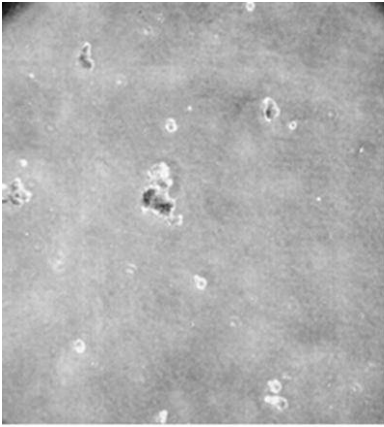
【 図 1 3 】



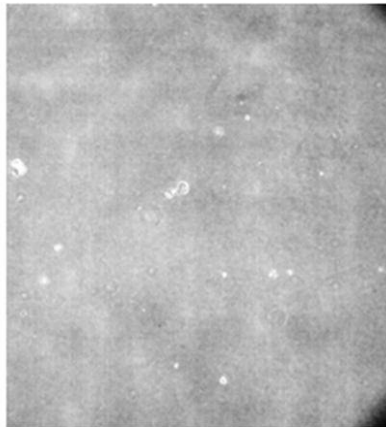
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



CDD133+



1-4細胞(DDX3Xノックダウン)

【 配 列 表 】

2015529825000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/JP2013/074172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/039735 A2 (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE [IT]; UNIV SIENA [IT]; RADII MARCO [IT]; B) 7 April 2011 (2011-04-07) cited in the application whole document, especially p. 6, l. 27 - p. 7, l. 23; claims 1-8 -----	1,2
X	WO 2010/039187 A2 (UNIV MARYLAND [US]; UNIV JOHNS HOPKINS [US]; HOSMANE RAMACHANDRA S [US]) 8 April 2010 (2010-04-08) whole document, especially par. 69-71, 616-624; claims 1-19; fig. 40-42 ----- -/--	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 December 2013		02/04/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chrétien, Eva Maria

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/JP2013/074172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M BOTLAGUNTA ET AL: "Oncogenic role of DDX3 in breast cancer biogenesis", ONCOGENE, vol. 27, no. 28, 11 February 2008 (2008-02-11), pages 3912-3922, XP055094220, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2008.33 whole document, especially p. 3913, col. 1, par. 1; p. 3920, col. 1-2, bridging par. -----	1,2
X	WO 2005/005601 A2 (UNIV MICHIGAN [US]; CLARKE MICHAEL F [US]; LIU RUI [US] CLARKE MICHAEL) 20 January 2005 (2005-01-20) whole document, especially p. 56, l. 12-22; claims 1-8, 10, 15; table 5 -----	1,2
X	CHANG P-C ET AL: "DDX3, A DEAD BOX RNA HELICASE, IS DEREGLATED IN HEPATITIS VIRUS-ASSOCIATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND IS INVOLVED IN CELL GROWTH CONTROL", ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 25, no. 14, 30 March 2006 (2006-03-30), pages 1991-2003, XP009081377, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/SJ.ONC.1209239 abstract page 2000, column 2, paragraph 1 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2013/074172**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1, 2

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ JP2013/ 074172

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2

A cancer malignancy evaluation method and kit

2. claims: 3, 4

A cancer prognosis evaluation method and kit

3. claims: 5-8

A peptide consisting of a sequence of 9 to 20 contiguous amino acids that comprises the amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS: 2 to 87 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, and vaccine comprising it

4. claims: 9-13

A method of producing an adoptive immunity cell composition using DDX3X and compounds therefore

5. claim: 14

A compound that inhibits DDX3X expression or activity for use in preventing or treating cancer, or for suppressing cancer metastasis or cancer recurrence

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/JP2013/074172

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011039735 A2	07-04-2011	US 2012202814 A1	09-08-2012
		WO 2011039735 A2	07-04-2011
WO 2010039187 A2	08-04-2010	AU 2009300357 A1	08-04-2010
		CA 2738650 A1	08-04-2010
		EP 2350086 A2	03-08-2011
		JP 2012503653 A	09-02-2012
		US 2011275588 A1	10-11-2011
		WO 2010039187 A2	08-04-2010
		WO 2005005601 A2	20-01-2005
AU 2008202471 A1	26-06-2008		
CA 2528669 A1	20-01-2005		
EP 1639090 A2	29-03-2006		
EP 2003196 A2	17-12-2008		
EP 2481814 A2	01-08-2012		
JP 2007516693 A	28-06-2007		
KR 20060031809 A	13-04-2006		
US 2006019256 A1	26-01-2006		
US 2008292546 A1	27-11-2008		
US 2012315216 A1	13-12-2012		
US 2013244256 A1	19-09-2013		
WO 2005005601 A2	20-01-2005		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 7		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1			
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 N	1/15				
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02				
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A			
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A			
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H			
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	45/00				
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/12				
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00				
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04				
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	37/02				
			A 6 1 P	37/02				

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72) 発明者 後藤 義博

大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 2 7 大塚製薬株式会社

(72) 発明者 林 隆史

大阪府大阪市中央区大手通3 - 2 - 2 7 大塚製薬株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA20 GA11 HA11
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53 QR62 QS25
 4B065 AA93X AB01 BA01 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA17 BA23 CA18 NA14 ZB262
 4C085 AA03 BB01 EE01
 4C087 AA02 AA03 BB64 CA04 NA14 ZB07 ZB26
 4H045 AA11 AA30 BA15 BA17 DA86 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	用于诊断和治疗癌症干细胞中表达的癌症靶向分子的方法		
公开(公告)号	JP2015529825A	公开(公告)日	2015-10-08
申请号	JP2015529319	申请日	2013-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人, 新泻		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人, 新泻 大冢制药有限公司		
[标]发明人	各務博 成田一衛 後藤義博 林隆史		
发明人	各務博 成田一衛 後藤義博 林隆史		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C07K7/04 C12N15/113 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/15 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/09 A61K39/00 A61K45/00 A61K35/12 A61P35/00 A61P35/04 A61K38/00 A61P37 /02		
CPC分类号	G01N33/57484 A61K31/17 A61K31/404 A61K31/4184 A61K31/4412 A61K31/551 A61P35/00 A61P35 /04 A61P37/02 A61K39/0011 A61K39/395 C12N5/0018 C12N5/0636 C12N2501/73 C12Y306/04013 G01N2800/52 A61K39/001154 C12N9/14 G01N2333/54 G01N2333/5406 G01N2333/57 G01N2333 /914		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.M G01N33/53.Y C07K7/04.ZNA C12N15/00.G C12N1/19 C12N1/21 C12N5 /00.101 C12N1/15 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N15/00.A A61K39/00.H A61K45/00 A61K35/12 A61P35 /00 A61P35/04 A61K37/02 A61P37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR62 4B063/QS25 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084 /BA17 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/EE01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4H045 /AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2012193757 2012-09-04 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于确定癌症恶性肿瘤的新方法，一种新的癌症诊断方法，一种用于确定预后的新方法，一种用于癌症治疗的新型疫苗，以及一种用于抑制癌症转移的新型疫苗。具体地，本发明提供了癌症恶性肿瘤评估方法，其包括测量癌组织中DDX3X表达水平的步骤，以及通过使用DDX3X表达水平评估癌组织的恶性程度的步骤。

(21) 出願番号	特願2015-529319 (P2015-529319)	(71) 出願人	304027279 国立大学法人 新潟大学 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
(86) (22) 出願日	平成25年9月3日 (2013.9.3)	(71) 出願人	000206956 大塚製菓株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月30日 (2015.4.30)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/074172	(72) 発明者	各務 博 新潟県新潟市中央区旭町通1-757 国立大学法人新潟大学内
(87) 国際公開番号	W02014/038682	(72) 発明者	成田 一衛 新潟県新潟市中央区旭町通1-757 国立大学法人新潟大学内
(87) 国際公開日	平成26年3月13日 (2014.3.13)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-193757 (P2012-193757)		
(32) 優先日	平成24年9月4日 (2012.9.4)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く