明　細　書

ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチド

技術分野

本発明は、ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、これらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体をイン・ビボもしくはイン・ビトロで利用した腫瘍の治療剤、予防剤、または診断薬などに関する。

背景技術

生体による腫瘍の排除には、免疫系、特にＴ細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ（Arch. Surg., 126:200 , 1990）、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）が比較的容易に分離されている（Immunol. Today , 8:385 , 1987、J. Immunol., 138:989 , 1987、Int. J. Cancer, 52:52 , 1992等）。また、該ＣＴＬの移入によるメラノーマ治療の臨床結果からも、腫瘍排除におけるＴ細胞の重要性が示唆されている（J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159 , 1994）。

自己の腫瘍細胞を攻撃するＣＴＬが標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわちＣＴＬは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスＩ抗原（ＭＨＣクラスＩ抗原、ヒトの場合はＨＬＡ抗原と呼ばれる）との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でＭＨＣクラスＩ抗原

（ＨＬＡ抗原）と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なＣＴＬが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的ＣＴＬを増強させる治療法が可能となった。

腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT. Boonらが初めてＭＡＧＥと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した（Science , 254:1643, 1991）。その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されている。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質であるｇｐ１００（J.Exp.Med., 179:1005, 1994）、ＭＡＲＴ－１（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515 , 1994）、チロシナーゼ（J.Exp.Med., 178:489 , 1993）などのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巣細胞に発現するMAGE関連タンパク質群（J.Exp.Med., 179:921 , 1994）、腫瘍特異的なアミノ酸変異を持つβ－カテニン（J.Exp.Med., 183:1185, 1996）、ＣＤＫ４（Science , 269 :1281, 1995）などが同定されている。また、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としては、ＨＥＲ２／ｎｅｕ（J.Exp.Med., 181:2109, 1995）、ｐ５３（変異型）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14704, 1996）などの癌遺伝子産物、ＣＥＡ（J.Natl.Cancer.Inst. , 87:982, 1995）、ＰＳＡ（J.Natl.Cancer.Inst. , 89:293, 1997）などの腫瘍マーカー、ＨＰＶ（J. Immunol., 154:5934, 1995）、ＥＢＶ（Int.Immunol., 7:653 , 1995）などのウイルスタンパク質などが同定されている。これらについては、総説（Immunol. Today , 18:267, 1997、J.Exp.Med., 183:725 , 1996、Curr.Opin.Immunol., 8: 628, 1996等）の記述に詳しい。

腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌（食道癌、肺癌等）等に幅広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行った結果、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて、新規な腫瘍抗

原タンパク質（ＳＡＲＴ－１）をコードする遺伝子のクローニングに成功し、該ＳＡＲＴ－１より、ＨＬＡ－Ａ２６抗原またはＨＬＡ－Ａ２４抗原に結合して提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチド部分を同定した（J. Exp. Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレット）。

しかしながら、該ＳＡＲＴ－１が、ＨＬＡ－Ａ２抗原に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を有しているか否か、すなわちＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドが存在しているか否かについては、明らかにされていない。

発明の開示

本発明は、ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドを提供することを目的とする。すなわち本発明は、ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、またはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体をイン・ビボまたはイン・ビトロで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することを目的とする。本発明のＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドは、日本人あるいは白人の約４０％が保有しているＨＬＡ抗原であるＨＬＡ－Ａ２に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドであることから、多くの患者に適用可能であり、さらに、ヒトの癌でもっとも多く認められる扁平上皮癌等に応用できるものであるため、新規な抗腫瘍剤としての有用性が期待される。ちなみに扁平上皮癌のうち食道癌や肺癌での扁平上皮癌は、現在の化学療法や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。その点からも、本発明の腫瘍抗原ペプチドの開発が期待される。

本発明者らは、ＳＡＲＴ－１分子中に、ＨＬＡ－Ａ２拘束性の腫瘍抗原ペプチドが存在しているか否かを調べるために、以下の試みを行った。

まず本発明者らは、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌の手術検体の腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）よりHLA-A2拘束性のCTL株を樹立し、これをYK-EC（受託番号：FERM BP-6726）と命名した。続いて、SART-1 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A0201 cDNAの組換えプラスミドをVA-13細胞にダブルトランスフェクトし、

そのトランスフェクタントに先のYK-ECを作用させたところ、YK-ECが活性化されてIFN-γを産生することが見出された。この結果により、SART-１にはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドが存在していることが初めて明らかになった。

本発明者らはさらに、HLA-A２に結合して提示されるSART-1由来の部分ペプチドの同定を試み、配列番号：１～配列番号：６に記載のアミノ酸配列で示されるペプチド等に腫瘍抗原ペプチドとしての活性が存することを明らかにした。

本発明は、以上のような知見基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、

（１）　ＳＡＲＴ－１由来の部分ペプチドであって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合して細胞傷害性Ｔ細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

（２）　配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（１）記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

（３）　配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（２）記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

（４）　配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（２）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

（５）　配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（４）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

（６）　配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはＣ末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（４）記載の腫瘍抗

原ペプチド誘導体；

（７） 配列番号：３５～配列番号：４０のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（６）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

（８） 前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも１種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤；

（９） 前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするＤＮＡの少なくとも１種を含有する組換えＤＮＡ；

（１０） 前記（９）記載の組換えＤＮＡを発現させて得られうるポリペプチド；

（１１） 前記（９）記載の組換えＤＮＡまたは前記（１０）記載のポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤；

（１２） 前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体または前記（１０）記載のポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬；

（１３） 前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体；

（１４） 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、ＨＬＡ－Ａ２抗原と前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞；

（１５） 前記（９）記載の組換えＤＮＡまたは前記（１０）記載のポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて得られうる、前記（１４）記載の抗原提示細胞；

（１６） 前記（１４）または（１５）記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤；

（１７） ＨＬＡ－Ａ２抗原と前記（１）～（７）のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性Ｔ細胞；

（１８） 前記（１７）記載の細胞傷害性Ｔ細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤；

（１９） 受託番号がＦＥＲＭ ＢＰ－６７２６である、上記（１７）記載の細胞傷害性Ｔ細胞ＹＫ－ＥＣ；ならびに

（２０） 前記（１９）記載のＹＫ－ＥＣを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法

を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書中、本発明に関して「腫瘍抗原ペプチド」とは、腫瘍抗原タンパク質ＳＡＲＴ－１（J.Exp.Med., 187:277 , 1998、国際公開第97/46676号パンフレット）由来の部分ペプチドであって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合して細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを指す。すなわち、国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：１に記載のＳＡＲＴ－１のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとＨＬＡ－Ａ２抗原との結合複合体がＣＴＬにより認識され得るようなペプチドであれば、当該ＳＡＲＴ－１のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗原ペプチドは、ＳＡＲＴ－１の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該ペプチドとＨＬＡ－Ａ２抗原との複合体がＣＴＬにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを本明細書に記載の方法又は当業者が利用可能な方法でアッセイすることにより、同定することができる。

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2 , Academic Press Inc. , New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），1985；医薬品の開発 続 第１４巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

本発明において、「ＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得る」

とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドがＨＬＡ－Ａ２抗原と結合して複合体を形成し、かかる複合体をＣＴＬが認識できることをいう。

前記候補ペプチドがＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るか否か、すなわち該ペプチドがＨＬＡ－Ａ２拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有しているか否かは、例えば、 J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の測定方法により調べることができる。具体的には、ＨＬＡ－Ａ２抗原陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、イン・ビトロでペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたＨＬＡ－Ａ２陽性細胞を特異的に認識するＣＴＬが誘導されるか否かにより測定することができる。ここでＣＴＬの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してＣＴＬが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN-γ）の量を酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）等により測定することによって調べることができる。その際の抗原ペプチド提示細胞（標的細胞）としては、例えば、HLA-A2陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT2細胞（Immunogenetics, 21:235, 1985）、あるいはHLA-A2 cDNA（Genbank Accession No. M84379）発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞などに対して前記ペプチドをパルスした細胞が挙げられる。また、^{51}Crで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するＣＴＬの傷害性を測定する方法（^{51}Crリリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317, 1994 ）によっても調べることができる。

あるいは、HLA-A2陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT2細胞（Immunogenetics, 21:235, 1985）、あるいはHLA-A2 cDNA（Genbank Accession No. M84379）発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞に対して前記候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、本発明において樹立されたHLA-A2拘束性のCTL株であるYK-EC（受託番号：FERM BP-6726）や前記で調製したＣＴＬなどを反応させ、これらのＣＴＬが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN-γ）の量を測定することによっても、調べることができる（J. Exp. Med., 187:277, 1998）。

以上のような測定法を、以下「腫瘍抗原ペプチドの測定法」と称することもある。

HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列にはある規則性（モチーフ）が存在するが、HLA-A2に関しては以下の表１に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J.Immunol.,155:4749-4756, 1995）。

表 1　HLA-A2拘束性抗原ペプチドのモチーフ

HLA-A2のタイプ	N末端から２番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L，M	V，L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V，L，I，M	L
HLA-A0206	V，Q	V，L
HLA-A0207	L	L

（ペプチドの長さは8～11アミノ酸）

従って、SART-1のアミノ酸配列上、このようなモチーフ構造を有するペプチド部分を前記ペプチド合成法に基き合成し、該ペプチドを前記腫瘍抗原ペプチドの測定法に供することにより、本発明のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドを選択することができる。

すなわち本発明の腫瘍抗原ペプチドとして、SART-１のアミノ酸配列上、前記のようなモチーフ構造に関わるペプチドであって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。具体的には、配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ペプチドの長さとしては、ＨＬＡ－Ａ２抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度が考えられる。

ここで、配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列において、その配列の「全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、以下のものを指す。

１）配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチドまたは配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の

連続した一部分よりなるペプチド；または

2）上記1）に記載したペプチドを含むペプチド

であって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るようなペプチドを指す。

ここで、前記1）および2）のペプチドの長さとしては、８～１１アミノ酸程度のものが挙げられる。また、前記2）のペプチドの例として、配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりＮ末端方向及び／又はＣ末端方向に長いペプチド、配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列のＣ末端またはＮ末端側のアミノ酸が欠失して得られるアミノ酸配列のＮ末端及び／又はＣ末端に他のアミノ酸が付加してなるペプチドであって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るようなペプチドが挙げられる。

前記腫瘍抗原ペプチドのうち好適なものとしては、配列番号：１～配列番号：２０のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで当該アミノ酸配列の「全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、前記1）および2）のペプチドと同様のペプチドを指す。

一例として、配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで当該アミノ酸配列の「全部または一部を含み、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、前記1）及び2）のペプチドと同様のペプチドを指す。

本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」（以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある）とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸残基を改変した改変体であって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものをいう。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドのア

ミノ酸配列に対して１または数個のアミノ酸残基を改変した改変体であって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

ここでアミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加（ペプチドのＮ末端、Ｃ末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り任意である。本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さとしては、前記腫瘍抗原ペプチドと同様に８～１１アミノ酸程度が好ましい。

先に記載したように、ＨＬＡ抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、ＨＬＡ－Ａ２抗原の場合、前記表１に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 155:4749-4756, 1995）。また、該モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ酸残基も許容される可能性がある。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、配列番号：１～配列番号：３４（好ましくは配列番号：１～配列番号：２０）のいずれかに記載のアミノ酸配列のうち、前記モチーフに照らしてアミノ酸の置換が可能な位置、すなわち第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。好ましくは、第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上置換が可能なアミノ酸残基に置換したもの、すなわち配列番号：１～配列番号：３４（好ましくは配列番号：１～配列番号：２０）のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはＣ末端のアミノ酸残基をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。ペプチドの長さは、ＨＬＡ－Ａ２抗原に結合して提示されるという観点から、８～１１アミノ酸程度が好ましい。

一例として、配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミ

ノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはC末端をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。これらの改変ペプチドの例を、それぞれ、配列番号：３５～配列番号：４０で示す。

なお、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチドと同様に、候補となるペプチドを前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドの測定法に供することにより、腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有するか否かを同定することができる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体は、少なくとも１種または２種以上組み合わせることにより、腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。すなわち本発明は、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分として含有する腫瘍の治療剤または予防剤を提供するものである。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤をＨＬＡ－Ａ２陽性かつＳＡＲＴ－１陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のＨＬＡ－Ａ２抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が、そのまま細胞表面のHLA-A2分子と結合するか、または抗原提示細胞内に取り込まれた後、ＨＬＡ抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、提示されたＨＬＡ－Ａ２抗原複合体特異的ＣＴＬが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、腫瘍の治療または予防が可能となる。

ＳＡＲＴ－１は、食道癌、肺癌等の扁平上皮癌等に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、適用範囲の広いことが有利である。さらに、前記扁平上皮癌は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが多いが、本発明の腫瘍の治療剤を併用することにより、治療効果を上げることが可能となる。

本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数μm のビーズに結

合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～100mg、より好ましくは0.01mg ～10mgであり、これを数日ないし数月に１回投与するのが好ましい。

さらに、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤として、前記のように本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする場合の他、以下に述べるように、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするＤＮＡや当該ＤＮＡの発現産物であるポリペプチドも、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

すなわち近年、複数のＣＴＬエピトープを連結させた、いわゆる「ポリトープ」をコードするＤＮＡを、ＤＮＡワクチンに利用する手法が用いられている（例えば Journal of Immunology, 160, p1717, 1998などを参照のこと）。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするＤＮＡを少なくとも１種または２種以上連結させることにより、さらには所望により他の腫瘍抗原ペプチドをコードするＤＮＡをも連結させることにより作製された組換えＤＮＡを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。また、前記の組換えＤＮＡを治療剤または予防剤として用いるのみならず、当該組換えＤＮＡを宿主細胞内で発現させて得られたポリペプチドも、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

ここで「組換えＤＮＡ」は、ＤＮＡ合成および通常の遺伝子工学的手法に基づき、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い容易に作製することができる。また、この組換えＤＮＡの発現ベクターへの組み込みも、前記基本書等に従い行うことができる。

作製された本発明の組換えＤＮＡが、ＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えば以下の方法により測定することができる。

すなわちまず、COS-7細胞（ATCC CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞開

発銀行）といった細胞に対し、候補となる組換えＤＮＡを有する発現プラスミドと、HLA-A2抗原をコードするcＤＮＡ（Genbank Accession No.M84379）を有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトする。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社製）を用いたリポフェクチン法などにより行うことができる。その後、HLA-A2に拘束性のCTL（例えばYK-EC、FERM BP-6726）を加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN-γ）の量を、例えばＥＬＩＳＡ法などで測定することによって、候補ＤＮＡが活性を有するか否かを調べることができる。

本発明の組換えＤＮＡを腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明の組換えＤＮＡを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のＤＮＡウイルス又はＲＮＡウイルスに本発明のＤＮＡを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（ＤＮＡワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にＤＮＡワクチン法、リポソーム法が好ましい。

本発明の組換えＤＮＡを実際に医薬として作用させるには、当該ＤＮＡを直接体内に導入する in vivo法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でＤＮＡを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す ex vivo法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）。in vivo法がより好ましい。

in vivo法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。 in vivo法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明の組換えＤＮＡを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明の組換えＤＮＡを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（ＨＶＪ）－リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の組換えＤＮＡの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明の組換えＤＮＡを、数日ないし数月に１回投与するのが好ましい。

以上のような本発明の組換えＤＮＡの腫瘍患者への投与により、抗原提示細胞内で当該組換えＤＮＡに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた個々の腫瘍抗原ペプチドがＨＬＡ抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体特異的なＣＴＬが体内で効率的に増殖し、さらには腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

また、前記組換えＤＮＡを発現させて得られうる「組換えポリペプチド（または単にポリペプチドと称す）」は、前記組換えＤＮＡを適当な発現ベクター（例えばｐＳＶ－ＳＰＯＲＴ１など）に組み込んで作製された発現プラスミドを宿主細胞に導入して形質転換体を得、この形質転換体を適当な培地で培養することにより、発現・生産することができる。ここで宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、電気パルス法などがある。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。また、当該ポリペプチドがＨＬＡ－Ａ２抗原と結合してＣＴＬにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えばマクロファージなどの食細

胞に本発明のポリペプチドを取り込ませて細胞内でペプチド断片を生じさせ、その後、該ペプチド断片とＨＬＡ－Ａ２抗原との複合体に対してYK-EC（FERM BP-6726）などのＣＴＬを加えて作用させ、該ＣＴＬが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN-γ）の量を測定することなどによって調べることができる。

本発明のポリペプチドを腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、前記本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体と同様の投与形態、投与方法および投与量により、投与することができる。本発明のポリペプチドを腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の腫瘍抗原ペプチドがＨＬＡ抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なＣＴＬが体内で効率的に増殖し、さらには腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

本発明は、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体を提供する。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harber Laboratory Press 出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノブロット法、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体、または本発明の組換えＤＮＡもしくは該組換えＤＮＡを発現させて得られるポリペプチドは、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することが可能である。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体等を腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なＣＴＬを誘導することの可能な投与法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、ＨＬＡ－Ａ２抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドま

たはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なＨＬＡ－Ａ２抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のみならず、本発明の組換えＤＮＡまたはポリペプチドであっても良い。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは本発明のポリペプチドを体外でパルスしてＨＬＡ－Ａ２抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することにより得られる（Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999）。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはポリペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の組換えＤＮＡを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、 Cancer Res., 56:p5672, 1996や J. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、ＤＮＡのみならずＲＮＡの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができるが、この場合は、 J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、ＨＬＡ－Ａ２陽性かつＳＡＲＴ－１陽性の患者の体内で効率良く特異的なＣＴＬが誘導され、腫瘍を治療することができる。

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤Ｔ細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている（J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159 、1994）。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドＴＲＰ－２で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なＣＴＬを増殖させ、該ＣＴＬをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている（J. Exp. Med., 185:453, 1997 ）。これは、抗原提示細胞のＨＬＡ抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するＣＴＬをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは本発明の組換えＤＮＡやポリペプチドを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的ＣＴＬを増やした後、このＣＴＬを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

すなわち本発明は、前記ＨＬＡ－Ａ２抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識するＣＴＬ、および、該ＣＴＬを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、ＣＴＬを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなＣＴＬを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、ＨＬＡ－Ａ２陽性かつＳＡＲＴ－１陽性の患者の体内でＣＴＬによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

また、本発明の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体、または本発明のポリペプチドは、腫瘍を診断するための診断薬の成分とすることができる。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体そのものなどを診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料（例えば血液、腫瘍組織など）中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することが可能である。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択にも利用できる。具体的には、イムノブロット法、ＲＩＡ、ＥＬＩＳＡ、蛍

光または発光測定法などを用いることにより、当該診断を行うことができる。

さらに近年、抗原ペプチドとＨＬＡ抗原との複合体を用いて抗原特異的ＣＴＬを検出する新しい検出方法が確立された（Science, 274:p94, 1996）。本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体とＨＬＡ－Ａ２抗原との複合体を前記検出方法に供し、腫瘍抗原特異的ＣＴＬを検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することができる。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。すなわち本発明においては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を含有する、腫瘍の診断薬をも提供するものである。

具体的には、文献（Science, 274:p94, 1996）に記載の方法に従って蛍光標識したＨＬＡ－Ａ２抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体の４量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的ＣＴＬをフローサイトメーターにより定量することにより、前記診断を行うことができる。

本発明はまた、食道癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球から樹立されたＣＴＬである、ＹＫ－ＥＣ（受託番号　FERM BP-6726）をも提供するものである。当該ＹＫ－ＥＣは、HLA-A2拘束性のＣＴＬ株であることが明らかとなっており、本発明のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドも、当該ＹＫ－ＥＣへの反応性を指標として見出された腫瘍抗原ペプチドである。従って、ＹＫ－ＥＣを利用することにより、新たな腫瘍抗原タンパク質およびＨＬＡ－Ａ２拘束性の腫瘍抗原ペプチドを見出すことができ、そのような方法も本発明の対象である。該方法は、例えば上記「腫瘍抗原ペプチドの測定法」の記載に基づいて実施することができ、具体例は後述の実施例２および４に詳細に記載されている。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例１　食道癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）からの細胞傷害性Ｔ細胞（CTL）株の樹立

関ら著，Cell. Immunol. 175：101-110，1997の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌の手術検体のTILよりHLA-A2拘束性のCTL株を樹立し、これをＹＫ－ＥＣと命名して以下の実験に使用した。ＹＫ－ＥＣは、茨城県つくば

市東一丁目1番３号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示：ＹＫ－ＥＣ；受領日：平成10年6月19日；受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１６８５５）（国際寄託への変更日：平成11年5月20日；受託番号：ＦＥＲＭ－ＢＰ－６７２６）。

実施例２　腫瘍抗原タンパク質ＳＡＲＴ－１に対するＹＫ－ＥＣの反応性

SW620細胞（ATCC株番号CCL-227）から中尾ら著，Cancer. Res.，55:4248-4252, 1995の記載に従い、HLA-A0201のcDNA（Genbank Accession No. M84379）を発現ベクターpCR3（INVITROGEN社製）に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

次に、J. Exp. Med.，187:277，1998の記載に従い、リポフェクチン法により、以下のようにVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行、Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.，44:242，1966）に対してHLA-A0201 cDNAの組換えプラスミドと腫瘍抗原タンパク質SART-1（国際公開第97/46676号パンフレット）の部分配列をコードするcDNAの組換えプラスミド6DIとをダブルトランスフェクトした。なお、SART-１のcDNA全長（国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：２に記載）を保持するE. coli JM109(K3)は茨城県つくば市東一丁目1番３号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており（微生物の表示：E. coli JM109(K3)；受領日：平成9年5月22日；受託番号FERM BP－5951）、前記6DIの代わりに該FERM BP-5951から得られるプラスミドK3を使用することも可能である。

具体的には、VA-13細胞を96穴プレートのウエル当たり10^4個加えて10% FCSを含むRPMI1640培地で培養後、リポフェクチン試薬（GIBCO BRL社製）を用い、HLA-A0201cDNAの組換えプラスミド100ngと6DI 100ngとを、計30μlの液量でダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200μlの培養液を加えてさらに72時間培養した後、培養液を除去し、2×10^4個のYK-ECを加えて18～24時間培養した。培養液を回収し、IFN-γ量をELISAで測定した。すなわち、９６穴プレートに固相化抗体として抗ヒトIFN-γマウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN-γを抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN-γウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体（アマシャム社製）を結合した後、ペルオキシダーゼ発色キットＴ（住友ベークライト社製）を用いて発色させた後、吸光度（４０５ｎｍ）を測定した。これをスタンダードのIFN-

γで得られた値と比較することにより定量した。なお対照として、トランスフェクトしない無処理群、組換えプラスミド6DIのみをトランスフェクトした群、HLA-A0201cDNAの組換えプラスミドのみをトランスフェクトした群を設定した。その結果を表２に示す。

表　2　YK-ECが産生したIFN-γ量

標的細胞	YK-ECが産生したIFN-γ量(pg/ml)
VA-13	0
VA-13 ＋ HLA-A0201	１２．２
VA-13 ＋ 6DI	２２．１
VA-13 ＋ HLA-A0201 ＋ 6DI	９４．１

腫瘍抗原タンパク質SART-1の部分配列をコードするcDNAの組換えプラスミド6DIとHLA-A0201cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした場合、YK-ECは他の群に比べ強く反応して、IFN-γを産生した。このことから、HLA-A0201に腫瘍抗原タンパク質SART-1の抗原ペプチドが提示され、これをYK-ECが認識すること、すなわちSART-１にはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドの存在していることが明らかになった。

実施例３　腫瘍抗原ペプチドの選択と合成

HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）のあることが知られており、HLA-A2の場合は、表３に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 155:4749-4756, 1995）。

表　3　HLA-A2拘束性抗原ペプチドのモチーフ

HLA-A2のタイプ	N末端から２番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L，M	V，L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V，L，I，M	L
HLA-A0206	V，Q	V，L

HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8～11アミノ酸)

腫瘍抗原タンパク質SART-1のアミノ酸配列（国際公開第97/46676号パンフレットにおいて配列番号：１として記載されたアミノ酸配列）のうち上記モチーフを有する9～10アミノ酸よりなるペプチドを、配列番号：１～配列番号：３４に示す。このうち、ＳＡＲＴ－１のアミノ酸配列上第642位～第650位を有するペプチドを「642-650」（配列番号：１）、第642位～第651位を有するペプチドを「642-651」（配列番号：２）、第650位～第658位を有するペプチドを「650-658」（配列番号：３）、第660位～第668位を有するペプチドを「660-668」（配列番号：４）、第712位～第720位を有するペプチドを「712-720」（配列番号：５）、第778位～第786位を有するペプチドを「778-786」（配列番号：６）と命名し、以下のように固相法により合成した。

〔１〕ＳＡＲＴ-１「642－650」Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ（配列番号：１）の合成

樹脂はFmoc－Leu－Alko Resin(０．５７mmol／ｇ、100－２００mesh、（渡辺化学））を用いた。この樹脂１００ｍｇを用いて、後記スケジュール１に従って合成を開始し、Fmoc－Gly－OH、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Asn－OH、Fmoc－Gln－OH、Fmoc－Cys（tBu）－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Leu－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、下記スケジュール１の工程３まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にＲｅａｇｅｎｔ Ｋ（５％フェノール、５％チオアニソール、５％H_2O、２．５％エタンジチオール／ＴＦＡ溶液）２ｍｌを加え、室温で２．５時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル１０ｍｌを加え１０分攪拌し、濾過しジエチルエーテル１０ｍｌで洗浄した。濾上物に酢酸水１０ｍｌを加えて３０分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水４ｍｌで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め０．１％ＴＦＡ水で平衡化させた逆相系充填剤ＹＭＣ－ＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａカラム（３０φ×２５０mm）に注入し、カラムを０．１％ＴＦＡ水で洗浄後、アセトニトリル濃度を１８０分

で３０％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ ４６．３ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラム（４．６φ×２５０ｍｍ）を用いた、１６％から４６％までの０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間２１．０分を示し、そのアミノ酸分析値（ただし、Ｃｙｓは検出せず）および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：１％フェノール／６Ｎ塩酸水溶液、１１０℃、２４時間

分析法：ニンヒドリン法

Ａｓｘ	０．９	（１）
Ｇｌｘ	１．０	（１）
Ｇｌｙ	０．９	（１）
＊Ｌｅｕ	４．０	（４）
Ｌｙｓ	１．０	（１）

＊基準アミノ酸

（ ）内理論値

質量分析（ＦＡＢ） $[M+H]^+$：１００１．６

スケジュール１

工程	時間（分）×処理回数
１．（洗浄）ＤＭＦ１．２ｍｌ	１×２
２．（脱保護）５０％ピペリジン／ＤＭＦ	１２×１
３．（洗浄）ＤＭＦ１．２ｍｌ	１×７
４．（カップリング）各アミノ基保護アミノ酸（５当量）／ＮＭＰ溶液０．９ｍｌ、ＤＩＣ（５当量）／ＮＭＰ溶液０．３ｍｌ	３０×１
５．（洗浄）ＤＭＦ１．２ｍｌ	１×２
６．（カップリング）各アミノ基保護アミノ酸（５当量）／ＮＭＰ溶液０．９ｍｌ、ＤＩＣ（５当量）／ＮＭＰ	

溶液０．３ｍｌ	３０×１
７．（洗浄）ＤＭＦ１．２ｍｌ	１×４

〔2〕ＳＡＲＴ-１「642-651」Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ（配列番号：２）の合成

樹脂はFmoc－Leu－Alko Resin（０．５７ｍｍｏｌ／ｇ、１００－２００ｍｅｓｈ）を用いた。この樹脂１００ｍｇを用いて、前記〔1〕と同様にして、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Gly－OH、Fmoc－Lys（Boc）－OH，Fmoc－Asn－OH、Fmoc－Gln－OH、Fmoc－Cys（tBu）－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Leu－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール１の工程３まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にＲｅａｇｅｎｔＫ（５％フェノール、５％チオアニソール、５％H_2O、２．５％エタンジチオール／ＴＦＡ溶液）２ｍｌを加え、室温で２．５時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル１０ｍｌを加え１０分攪拌し、濾過しジエチルエーテル１０ｍｌで洗浄した。濾上物に酢酸水１０ｍｌを加えて３０分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水４ｍｌで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め０．１％ＴＦＡ水で平衡化させた逆相系充填剤ＹＭＣ－ＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａカラム（３０φ×２５０ｍｍ）に注入し、カラムを０．１％ＴＦＡ水で洗浄後、アセトニトリル濃度を１２０分で３２％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ ２７．１ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラム（４．６φ×２５０ｍｍ）を用いた、１８％から４８％までの０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間２２．８分を示し、そのアミノ酸分析値（ただし、Ｃｙｓは検出せず）および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：１％フェノール／６Ｎ塩酸水溶液、１１０℃、２４時間

分析法：ニンヒドリン法

Ａｓｘ：１．０	（１）	
Ｇｌｘ：１．０	（１）	
Ｇｌｙ：０．９	（１）	
＊Ｌｅｕ：５．０	（５）	＊基準アミノ酸
Ｌｙｓ：０．９	（１）	

（ ）内理論値

質量分析（ＦＡＢ）　[M+H]$^+$：１１１４．６

〔３〕ＳＡＲＴ-１「650-658」Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｖａｌ（配列番号：３）の合成

樹脂はFmoc－Val－Alko Resin（０．６２ｍｍｏｌ／ｇ、１００－２００ｍｅｓｈ）を用いた。この樹脂１００ｍｇを用いて、前記〔１〕と同様にして、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Gln－OH、Fmoc－Val－OH, Fmoc－Thr（tBu）－OH、Fmoc－Thr（tBu）－OH、Fmoc－Glu（OtBu）－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Leu－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール１の工程３まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にＲｅａｇｅｎｔＫ（５％フェノール、５％チオアニソール、５％H_2O、２．５％エタンジチオール／ＴＦＡ溶液）２ｍｌを加え、室温で２．５時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル１０ｍｌを加え１０分攪拌し、濾過しジエチルエーテル１０ｍｌで洗浄した。濾上物に酢酸水１０ｍｌを加えて３０分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水４ｍｌで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め０．１％ＴＦＡ水で平衡化させた逆相系充填剤ＹＭＣ－ＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａカラム（３０φ×２５０ｍｍ）に注入し、カラムを０．１％ＴＦＡ水で洗浄後、アセトニトリル濃度を１８０分で３０％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｖａｌ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｖａｌ ３２．２ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラ

ム（4．6φ×250mm）を用いた、11%から41%までの0．1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20．2分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

Thr：1．6 （2）

Glx：1．9 （2）

Val：1．8 （2）

＊Leu：2．0 （2） ＊基準アミノ酸

Lys：0．9 （1）

（ ）内理論値

質量分析（FAB） $[M+H]^+$：1030．6

〔4〕SART-1「660-668」Arg－Val－Lys－Ala－Pro－Asn－Lys－Ser－Leu（配列番号：4）の合成

樹脂はFmoc－Leu－Alko Resin（0．57mmol／g、100－200mesh）を用いた。この樹脂100mgを用いて、前記〔1〕と同様にして、Fmoc－Ser（tBu）－OH、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Asn－OH、Fmoc－Pro－OH、Fmoc－Ala－OH、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Val－OH、Fmoc－Arg（Pmc）－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagentK（5%フェノール、5%チオアニソール、5%H_2O、2．5%エタンジチオール／TFA溶液）2mlを加え、室温で2．5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0．1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC－PACK ODS－Aカラム（30φ×250mm）に注入し、カラムを0．1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分

で２０％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ａｒｇ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ ４４．７ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラム（４．６φ×２５０ｍｍ）を用いた、６％から３６％までの０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間２０．２分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：１％フェノール／６Ｎ塩酸水溶液、１１０℃、２４時間

分析法：ニンヒドリン法

Ａｓｘ：０．９	（１）		
Ｓｅｒ：０．７	（１）		
Ａｌａ：０．９	（１）		
Ｖａｌ：０．９	（１）		
＊Ｌｅｕ：１．０	（１）	＊基準アミノ酸	
Ｌｙｓ：１．７	（２）		
Ａｒｇ：０．８	（１）		
Ｐｒｏ：０．９	（１）		
	（ ）内理論値		

質量分析（ＦＡＢ） $[M+H]^+$：１０１２．６

〔５〕ＳＡＲＴ-１「712-720」Ｔｙｒ－Ｖａｌ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ（配列番号：５）の合成

樹脂はFmoc－Leu－Alko Resin（０．５７ｍｍｏｌ／ｇ、１００－２００ｍｅｓｈ）を用いた。この樹脂１００ｍｇを用いて、前記〔１〕と同様にして、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Arg（Pmc）－OH、Fmoc－Gly－OH、Fmoc－Thr（tBu）－OH、Fmoc－Glu（OtBu）－OH、Fmoc－Asp（OtBu）－OH、Fmoc－Val－OH、Fmoc－Tyr（tBu）－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール１の工程３まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にＲｅａｇｅｎｔＫ（５％フェノール、５％チオアニソール、

5％H_2O、２．５％エタンジチオール／ＴＦＡ溶液）２ｍｌを加え、室温で２．５時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル１０ｍｌを加え１０分撹拌し、濾過しジエチルエーテル１０ｍｌで洗浄した。濾上物に酢酸水１０ｍｌを加えて３０分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水４ｍｌで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め０．１％ＴＦＡ水で平衡化させた逆相系充填剤ＹＭＣ－ＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａカラム（３０φ×２５０ｍｍ）に注入し、カラムを０．１％ＴＦＡ水で洗浄後、アセトニトリル濃度を１２０分で２０％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ｔｙｒ－Ｖａｌ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ ４２．３ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラム（４．６φ×２５０ｍｍ）を用いた、７％から３７％までの０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間２０．９分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：１％フェノール／６Ｎ塩酸水溶液、１１０℃、２４時間

分析法：ニンヒドリン法

Ａｓｘ	０．９	（１）	
Ｔｈｒ	０．９	（１）	
Ｇｌｘ	１．０	（１）	
Ｇｌｙ	０．９	（１）	
Ｖａｌ	０．９	（１）	
＊Ｌｅｕ	１．０	（１）	＊基準アミノ酸
Ｔｙｒ	１．０	（１）	
Ｌｙｓ	０．９	（１）	
Ａｒｇ	０．９	（１）	

（ ）内理論値

質量分析（ＦＡＢ） $[M+H]^+$：１０８０．５

〔6〕ＳＡＲＴ-１「778-786」Ａｌａ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｔｙ

r－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ（配列番号：６）の合成

樹脂はFmoc－Leu－Alko Resin（０．５７ｍｍｏｌ／ｇ、１００－２００ｍｅｓｈ）を用いた。この樹脂１００ｍｇを用いて前記〔1〕と同様にして、Fmoc－Val－OH、Fmoc－Ile－OH、Fmoc－Tyr（tBu）－OH、Fmoc－Pro－OH、Fmoc－Thr（tBu）－OH、Fmoc－Lys（Boc）－OH、Fmoc－Gln－OH、Fmoc－Ala－OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール１の工程３まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にＲｅａｇｅｎｔＫ（５％フェノール、５％チオアニソール、５％H_2O、２．５％エタンジチオール／ＴＦＡ溶液）２ｍｌを加え、室温で２．５時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル１０ｍｌを加え１０分攪拌し、濾過しジエチルエーテル１０ｍｌで洗浄した。濾上物に酢酸水１０ｍｌを加えて３０分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水４ｍｌで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め０．１％ＴＦＡ水で平衡化させた逆相系充填剤YMC－ＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａカラム（３０φ×２５０ｍｍ）に注入し、カラムを０．１％ＴＦＡ水で洗浄後、アセトニトリル濃度を１２０分で３０％まで増加させ、流速７ｍｌ／ｍｉｎ．で溶出した。溶出液をＡ２２０ｎｍでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ａｌａ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｔｙｒ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｌｅｕ ２９．３ｍｇを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤ＳＵＭＩＰＡＣＫ ＯＤＳ－Ａ２１１カラム（４．６φ×２５０ｍｍ）を用いた、１５％から４５％までの０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間２２．６分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：１％フェノール／６Ｎ塩酸水溶液、１１０℃、２４時間

分析法：ニンヒドリン法

Ｔｈｒ：０．８ （1）

Ｇｌｘ：１．０ （1）

Ａｌａ：１．１ （1）

Ｖａｌ：０．８ （1）

Ｉｌｅ：０．８　（１）

＊Ｌｅｕ：１．０　（１）　　＊基準アミノ酸

Ｔｙｒ：０．９　（１）

Ｌｙｓ：０．９　（１）

Ｐｒｏ：０．９　（１）

（　）内理論値

質量分析（ＦＡＢ）　［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$：１０３２．５

実施例４　腫瘍抗原ペプチドの同定

HLA-A0201陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているＴ－Ｂハイブリドーマ細胞株のT2細胞（Immunogenetics, 21:235,1985）2×10^{4}個に対して実施例３で作製した6種類のペプチドをそれぞれ10μMで2時間添加した後、1×10^{5}個のYK-ECとともに18時間培養し、YK-ECが産生した培養上清中のIFN-γ量を、実施例２と同様のELISA法にて測定した。その結果を表４に示す。

表　４　YK-ECが産生したIFN-γ量

パルスしたペプチド	YK-ECが産生したIFN-γ量(pg/ml)
「642-650」	１０９．１
「642-651」	１１２．４
「650-658」	１１８．１
「660-668」	７１．１
「712-720」	８６．１
「778-786」	１０５．４
ペプチドなし	６．５

表４より、これらのペプチドが腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

なお本実験で用いたT2細胞の代わりに、HLA-A2 cDNA発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である。

(J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

さらに、Fmoc法にて合成した配列番号：７～配列番号：２０に記載のペプチドを前記と同様の腫瘍抗原ペプチドの同定法に供した結果、これら配列番号：７～配列番号：２０に記載のペプチドについても腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有していることが明らかとなった。

産業条の利用可能性

本発明により、ＳＡＲＴ－１由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、またはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体をイン・ビボまたはイン・ビトロで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などが提供される。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、多くの患者に適用可能であり、さらに、発生頻度の高い扁平上皮癌等に幅広く応用できるものであるため、抗腫瘍剤としての有用性が期待される。

配列表フリーテキスト

配列番号：３５に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第９番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：３６に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第１０番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：３７に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第９番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：３８に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第９番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：３９に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第９番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：４０に記載のアミノ酸配列の第２番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第９番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

請 求 の 範 囲

1．ＳＡＲＴ－１由来の部分ペプチドであって、かつＨＬＡ－Ａ２抗原と結合して細胞傷害性Ｔ細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

2．配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項１記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

3．配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項２記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

4．配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項２記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

5．配列番号：１～配列番号：６のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位および／またはＣ末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項４記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

6．配列番号：１～配列番号：３４のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはＣ末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項４記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

7．配列番号：３５～配列番号：４０のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項６記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

8．請求項１～７のいずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも１種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防

剤。

９．請求項１～７のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするＤＮＡの少なくとも１種を含有する組換えＤＮＡ。

１０．請求項９記載の組換えＤＮＡを発現させて得られうるポリペプチド。

１１．請求項９記載の組換えＤＮＡまたは請求項１０記載のポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

１２．請求項１～７のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体または請求項１０記載のポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬。

１３．請求項１～７のいずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体。

１４．腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、ＨＬＡ－Ａ２抗原と請求項１～７のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

１５．請求項９記載の組換えＤＮＡまたは請求項１０記載のポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて得られうる、請求項１４記載の抗原提示細胞。

１６．請求項１４または１５記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

１７．ＨＬＡ－Ａ２抗原と請求項１～７のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性Ｔ細胞。

１８．請求項１７記載の細胞傷害性Ｔ細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

１９．受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－６７２６である、請求項１７記載の細胞傷害性Ｔ細胞ＹＫ－ＥＣ。

２０．請求項１９記載のＹＫ－ＥＣを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法。