

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-176382

(P2014-176382A)

(43) 公開日 平成26年9月25日(2014.9.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00 Z N A	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2014-58621 (P2014-58621)	(71) 出願人	505443953 株式会社癌免疫研究所 大阪府吹田市江の木町13番9号
(22) 出願日	平成26年3月20日(2014.3.20)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(62) 分割の表示	特願2009-502541 (P2009-502541) の分割	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
原出願日	平成20年2月28日(2008.2.28)	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(31) 優先権主張番号	特願2007-54215 (P2007-54215)	(72) 発明者	杉山 治夫 大阪府箕面市船場西2-19-30
(32) 優先日	平成19年3月5日(2007.3.5)	Fターム(参考)	4B024 AA01 CA04 CA11 CA20 EA04 GA11 HA08 HA11 4B065 AA94X AB01 AC20 BA01 CA44 CA46 4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB272
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 癌抗原特異的T細胞のレセプター遺伝子およびそれによりコードされるペプチドならびにそれらの使用

(57) 【要約】

【課題】 WT 1 蛋白に対する WT 1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子のヌクレオチド配列、特にその C D R 3 領域のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を明らかにし、これらを癌の検査 (診断、予後、治療モニタリング等) や癌治療に利用する。

【解決手段】 癌抗原特異的 T 細胞のレセプター遺伝子に含まれるポリヌクレオチドおよびそれによりコードされるペプチド、およびそれらを用いる癌の検査 (診断、予後、治療モニタリング等) や癌の治療、ならびに上記ポリヌクレオチドを含む T 細胞レセプター遺伝子を導入したリンパ球など。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

WT1 特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のV鎖のCDR3をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド配列であって、配列番号：1～1695に示すいずれかのCDR3ヌクレオチド配列を有するDNA、またはその相補的RNA、またはそれらの相補配列を有するポリヌクレオチド配列を含むT細胞レセプター遺伝子を導入したHLA-A*2402陽性癌患者のリンパ球。

【請求項 2】

WT1 特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のV鎖のCDR3をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド配列であって、配列番号：1～1695に示すいずれかのCDR3ヌクレオチド配列からなるDNA、またはその相補的RNA、またはそれらの相補配列からなるポリヌクレオチド配列を含むT細胞レセプター遺伝子を導入したHLA-A*2402陽性癌患者のリンパ球。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌抗原特異的T細胞のレセプター遺伝子に含まれるポリヌクレオチドおよびそれによりコードされるペプチド、およびそれらを用いる癌の検査（診断、予後、治療モニタリング等）や癌の治療、ならびに上記ポリヌクレオチドを含むT細胞レセプター遺伝子を導入したリンパ球等に関する。

20

【背景技術】

【0002】

癌の治療には手術による切除、放射線治療、抗癌剤による治療、そして免疫療法がある。このうち、免疫療法は癌に対する選択性・特異性が高く、副作用もほとんどないので、近年、特に注目されている。なかでも、多くの癌細胞や白血病細胞に豊富に存在するWT1蛋白を標的とした癌や白血病の治療の試みがさかんに行われている。このようなWT1を標的とした抗癌治療のメカニズムを研究し、さらに治療効果を高めるためには、WT1特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) 遺伝子のヌクレオチド配列およびそれによりコードされるレセプターペプチドのアミノ酸配列を同定する必要がある。しかしながら、現在に至るまでいくつかの研究（非特許文献1-5等参照）がなされたにもかかわらず、かかるレセプター遺伝子およびレセプターペプチドの配列はほとんど知られていない。ましてやそれらを有効利用することについては記載されていない。

30

【非特許文献1】Valmori D. et al., J. Immunol. 168:4231-4240, 2002

【非特許文献2】Dietrich PY. et al., Cancer Res. 61:2047-2054, 2001

【非特許文献3】Coulie PG. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:10290-10295, 2001

【非特許文献4】Godelaine D. et al. J. Immunol. 171:4893-4897, 2003

【非特許文献5】Mandrizzato S. et al., J. Immunol. 169:4017-4024, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0003】

本発明の課題は、WT1蛋白に対するWT1特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子のヌクレオチド配列、特にそのCDR3領域のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を明らかにし、これらを癌の検査（診断、予後、治療モニタリング等）や癌治療に利用することであった。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を初めて決定し、本発明を完成

50

するに至った。

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1) WT1 特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のV鎖のCDR3をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであって、配列番号：1～1695に示すいずれかのCDR3ヌクレオチド配列を有するDNA、またはその相補的RNA、またはそれらの相補配列を有するポリヌクレオチド；

(2) 配列番号：1～1695に示すいずれかのCDR3ヌクレオチド配列からなるDNA、またはその相補的RNA、またはそれらの相補配列からなる(1)記載のポリヌクレオチド；

(3) WT1 特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のT細胞レセプター (TCR) のV鎖のCDR3のアミノ酸配列を有するペプチドであって、配列番号：1696～3389に示すいずれかのCDR3アミノ酸配列を有するペプチド；

(4) 配列番号：1696～3389に示すいずれかのCDR3アミノ酸配列からなる(3)記載のペプチド；

(5) (1)または(2)記載のポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のペプチドの、癌マーカーとしての使用；

(6) 治療前にHLA-A*2402陽性患者から得られた試料中の、(1)または(2)記載のいずれかのポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のいずれかのペプチドを有するWT1特異的CTLのクロナリティーを調べることを特徴とする、癌の診断方法であって、該クロナリティーが複数のWT1特異的CTLが存在する場合に、該患者が癌にかかっている可能性がある」と判定する方法；

(7) 治療前の患者におけるいずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有する3以上のクロナリティーを有するWT1特異的CTLのクロナリティーが大きいほど、あるいは3以上のクロナリティーを有するWT1特異的CTLの種類が多いほど、該患者が癌にかかっている可能性が高いと判定する(6)記載の方法；

(8) 治療前においてHLA-A*2402陽性患者から得られた試料中の、(1)または(2)記載のいずれかのポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のいずれかのペプチドを有するWT1特異的CTLの種類およびクロナリティーを調べることを特徴とする、WT1ペプチド免疫療法に対する患者の感受性を調べる方法であって、該患者におけるクロナリティーが複数であるWT1特異的CTLの種類が、WT1ペプチド免疫療法に対する無応答者のそれよりも多い場合に、WT1ペプチド免疫療法に対する該患者の感受性があると判定する方法；

(9) 治療前の患者におけるクロナリティーが複数であるWT1特異的CTLクローンの種類が多いほど、あるいはクロナリティーが大きいほど、WT1ペプチド免疫療法に対する該患者の感受性が高いと判定する(8)記載の方法；

(10) WT1ペプチド免疫療法の前後において、HLA-A*2402陽性患者から得られた試料中の、(1)または(2)記載のいずれかのポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のいずれかのペプチドを有するWT1特異的CTLクローンのクロナリティーを調べることを特徴とする、該患者におけるWT1ペプチド免疫療法のモニタリング方法であって、いずれかのクローンに関してWT1ペプチド免疫療法前よりもWT1ペプチド免疫療法後において該WT1特異的CTLのクロナリティーが増加した場合に、該患者がWT1ペプチド免疫療法に应答したと判定する方法；

(11) WT1ペプチド免疫療法後において、クロナリティーの増加の割合が大きいほど、あるいはクロナリティーが増加したクローンの種類が多いほど、WT1ペプチド免疫療法に対する応答性が高いと判定する(10)記載の方法；

(12) (3)または(4)記載のペプチドに対する抗体；

(13) (1)または(2)記載のポリヌクレオチド、(3)または(4)記載のペプチド、あるいは(12)記載の抗体を含むチップ；

(14) 配列番号：3391～3418に示す配列から選択される配列を有するCDR3ポリペプチド増幅用プライマー；

10

20

30

40

50

(15)(1)または(2)記載のポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のペプチドを有するWT1特異的CTLを検出するための手段を含む、癌の診断キット、WT1ペプチド免疫療法に対する癌患者の感受性を調べるためのキット、またはWT1ペプチド免疫療法のモニタリング用キット；

(16)(1)または(2)記載のポリヌクレオチドあるいは(3)または(4)記載のペプチドを有するWT1特異的CTLを検出するための手段を含む、癌の診断装置、WT1ペプチド免疫療法に対する癌患者の感受性を調べるための装置、またはWT1ペプチド免疫療法のモニタリング用装置；

(17)(13)記載のチップまたは(14)記載のプライマーを含む(15)記載のキット；

(18)(13)記載のチップまたは(14)記載のプライマーが用いられる(16)記載の装置；

(19)(1)または(2)記載のポリヌクレオチド配列を含むT細胞レセプター遺伝子を導入したHLA-A*2402陽性癌患者のリンパ球。

【0005】

さらに本発明は、CDR3ポリヌクレオチドを含むT細胞レセプター遺伝子を導入したHLA-A*2402陽性癌患者のリンパ球を用いた癌治療も提供する。

【0006】

さらに本発明は、CDR3ペプチドに対する抗体およびその使用も提供する。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、WT1特異的CTLのTCRのV鎖遺伝子に含まれるヌクレオチド配列およびそれらによりコードされるペプチドのアミノ酸配列、詳細には、CDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が明らかとなり、これらのポリヌクレオチドまたはペプチドを用いて、広範な癌の検査(診断、予後、治療モニタリング等)、癌の治療等を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1-1】図1-1は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION...(P)N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-2】図1-2は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION...(P)N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-3】図1-3は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...

10

20

30

40

50

D - R E G I O N . . . (P) N 2 . . . J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-4】図1-4は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

10

【図1-5】図1-5は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-6】図1-6は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

20

【図1-7】図1-7は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

30

【図1-8】図1-8は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

40

【図1-9】図1-9は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION...N1...D-REGION... (P) N2...J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

50

【図1-10】図1-10は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-11】図1-11は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-12】図1-12は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-13】図1-13は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-14】図1-14は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-15】図1-15は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-16】図1-16は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)

10

20

30

40

50

のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-17】図1-17は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

10

【図1-18】図1-18は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

20

【図1-19】図1-19は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

30

【図1-20】図1-20は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-21】図1-21は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

40

【図1-22】図1-22は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字

50

は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-23】図1-23は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

10

【図1-24】図1-24は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

20

【図1-25】図1-25は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-26】図1-26は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

30

【図1-27】図1-27は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・D - REGION・・・(P)N2・・・J - REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

40

【図1-28】図1-28は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V name、J nameおよびD nameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV - REGION・・・N1・・・

50

・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図 1 - 2 9】図 1 - 2 9 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

10

【図 1 - 3 0】図 1 - 3 0 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図 1 - 3 1】図 1 - 3 1 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

20

【図 1 - 3 2】図 1 - 3 2 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

30

【図 1 - 3 3】図 1 - 3 3 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

40

【図 1 - 3 4】図 1 - 3 4 は、本発明において同定された健常人および H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者の W T 1 特異的細胞障害性 T 細胞 (C T L) の T 細胞レセプター (T C R) の V 鎖の C D R 3 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、c l o n e # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。V n a m e、J n a m e および D n a m e は V 領域、J 領域および D 領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上の V - R E G I O N ・ ・ ・ N 1 ・ ・ ・ D - R E G I O N ・ ・ ・ (P) N 2 ・ ・ ・ J - R E G I O N はヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

50

【図1-35】図1-35は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図1-36】図1-36は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図中、clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。Vname、JnameおよびDnameはV領域、J領域およびD領域がどのようなものかを示す。ヌクレオチド配列の上のV-REGION・・・N1・・・D-REGION・・・(P)N2・・・J-REGIONはヌクレオチド配列の各部分の由来を示す。

【図2-1】図2-1は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテーターを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-2】図2-2は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテーターを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-3】図2-3は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテーターを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-4】図2-4は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402

10

20

30

40

50

陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテ
 イーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリ
 ー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病
 患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号お
 よび患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形
 成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R
 esは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは
 治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療4
 2週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療
 前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

10

【図2-5】図2-5は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402
 陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテ
 イーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリ
 ー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血
 病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号
 および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形
 成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R
 esは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは
 治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療4
 2週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療
 前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

20

【図2-6】図2-6は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402
 陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテ
 イーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリ
 ー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血
 病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号
 および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形
 成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R
 esは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは
 治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療4
 2週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療
 前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

30

【図2-7】図2-7は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402
 陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテ
 イーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリ
 ー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血
 病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号
 および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形
 成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R
 esは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは
 治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療4
 2週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療
 前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

40

【図2-8】図2-8は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402
 陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリテ
 イーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリ
 ー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血
 病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号
 および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形
 成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R

50

es は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-9】図2-9は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

10

【図2-10】図2-10は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

20

【図2-11】図2-11は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

30

【図2-12】図2-12は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

40

【図2-13】図2-13は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナ

50

リティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-14】図2-14は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-15】図2-15は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-16】図2-16は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療4週目、8 w は治療8週目、12 w は治療12週目、42 w は治療42週目であることを示す。Phase 1 は第1相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-17】図2-17は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に応答しなかった者であることを示す。pr

10

20

30

40

50

e は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図 2 - 18】図 2 - 18 は、本発明において同定された健常人および HLA - A * 2402 陽性患者の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に应答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図 2 - 19】図 2 - 19 は、本発明において同定された健常人および HLA - A * 2402 陽性患者の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に应答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図 2 - 20】図 2 - 20 は、本発明において同定された健常人および HLA - A * 2402 陽性患者の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に应答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図 2 - 21】図 2 - 21 は、本発明において同定された健常人および HLA - A * 2402 陽性患者の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に应答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図 2 - 22】図 2 - 22 は、本発明において同定された健常人および HLA - A * 2402 陽性患者の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone # はクローン番号であり、ドットの左の数字は V 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HV は健常人、AML は急性骨髄性白血病患者、MDS は骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Res は治療応答者、non Res は治療に应答しなかった者であることを示す。pre は治療前、4 w は治療 4 週目、8 w は治療 8 週目、12 w は治療 12 週目、42 w は治療 42 週目であることを示す。Phase 1 は第 1 相臨床試験を示す。PB (pre) は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

10

20

30

40

50

ミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R e sは治療応答者、n o n R e sは治療に応答しなかった者であることを示す。p r eは治療前、4 wは治療4週目、8 wは治療8週目、1 2 wは治療1 2週目、4 2 wは治療4 2週目であることを示す。P h a s e 1は第1相臨床試験を示す。P B (p r e)は治療前の末梢血であることを示す。B M (p r e)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2 - 2 3】図2 - 2 3は、本発明において同定された健常人およびH L A - A * 2 4 0 2陽性患者のW T 1特異的細胞障害性T細胞 (C T L)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。c l o n e #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R e sは治療応答者、n o n R e sは治療に応答しなかった者であることを示す。p r eは治療前、4 wは治療4週目、8 wは治療8週目、1 2 wは治療1 2週目、4 2 wは治療4 2週目であることを示す。P h a s e 1は第1相臨床試験を示す。P B (p r e)は治療前の末梢血であることを示す。B M (p r e)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2 - 2 4】図2 - 2 4は、本発明において同定された健常人およびH L A - A * 2 4 0 2陽性患者のW T 1特異的細胞障害性T細胞 (C T L)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。c l o n e #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R e sは治療応答者、n o n R e sは治療に応答しなかった者であることを示す。p r eは治療前、4 wは治療4週目、8 wは治療8週目、1 2 wは治療1 2週目、4 2 wは治療4 2週目であることを示す。P h a s e 1は第1相臨床試験を示す。P B (p r e)は治療前の末梢血であることを示す。B M (p r e)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2 - 2 5】図2 - 2 5は、本発明において同定された健常人およびH L A - A * 2 4 0 2陽性患者のW T 1特異的細胞障害性T細胞 (C T L)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。c l o n e #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R e sは治療応答者、n o n R e sは治療に応答しなかった者であることを示す。p r eは治療前、4 wは治療4週目、8 wは治療8週目、1 2 wは治療1 2週目、4 2 wは治療4 2週目であることを示す。P h a s e 1は第1相臨床試験を示す。P B (p r e)は治療前の末梢血であることを示す。B M (p r e)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2 - 2 6】図2 - 2 6は、本発明において同定された健常人およびH L A - A * 2 4 0 2陽性患者のW T 1特異的細胞障害性T細胞 (C T L)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。c l o n e #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV 鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。H Vは健常人、A M Lは急性骨髄性白血病患者、M D Sは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。R e sは治療応答者、n o n R e sは治療に応答しなかった者であることを示す。p r eは治療前、4 wは治療4週目、8 wは治療8週目、1 2 wは治療1 2週目、4 2 wは治

10

20

30

40

50

療42週目であることを示す。Phase 1は第1相臨床試験を示す。PB (pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre)は治療前の骨髓であることを示す。

【図2-27】図2-27は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、non Resは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase 1は第1相臨床試験を示す。PB (pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre)は治療前の骨髓であることを示す。

【図2-28】図2-28は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、non Resは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase 1は第1相臨床試験を示す。PB (pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre)は治療前の骨髓であることを示す。

【図2-29】図2-29は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、non Resは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase 1は第1相臨床試験を示す。PB (pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre)は治療前の骨髓であることを示す。

【図2-30】図2-30は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、non Resは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase 1は第1相臨床試験を示す。PB (pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM (pre)は治療前の骨髓であることを示す。

【図2-31】図2-31は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone #はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白

10

20

30

40

50

血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-32】図2-32は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-33】図2-33は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-34】図2-34は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-35】図2-35は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は

10

20

30

40

50

治療前の末梢血であることを示す。BM (pre) は治療前の骨髄であることを示す。

【図2-36】図2-36は、本発明において同定された健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のそれぞれのクローンのクロナリティーを示す。clone#はクローン番号であり、ドットの左の数字はV鎖のファミリー番号、ドットの右の数字は整理番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。HVは健常人、AMLは急性骨髄性白血病患者、MDSは骨髄異形成症候群患者を示す。これらの略号に付した数字は健常人番号および患者番号である。Resは治療応答者、nonResは治療に応答しなかった者であることを示す。preは治療前、4wは治療4週目、8wは治療8週目、12wは治療12週目、42wは治療42週目であることを示す。Phase1は第1相臨床試験を示す。PB(pre)は治療前の末梢血であることを示す。BM(pre)は治療前の骨髄であることを示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明者は、WT1ペプチド/HLA-A*2402の複合体からなるWT1テトラマーで癌患者の末梢血リンパ球を染色し、FACSを用いてWT1テトラマー陽性細胞を1個ずつ分離し、各細胞からcDNAを作成し、PCR法を適用することによってWT1特異的細胞障害性T細胞(以下において「WT1特異的CTL」ということがある)のT細胞レセプター(以下において「TCR」ということがある)のV鎖に含まれるCDR3をコードするヌクレオチド配列を決定した(図1-1~図1-36)。これらの結果から該CDR3のアミノ酸配列も決定した(図1-1~図1-36、配列番号:1696~3389)。これらの配列は本発明により初めて同定されたものである。

20

【0010】

したがって、本発明は、1の態様において、健常人およびHLA-A*2402陽性患者のWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであって、配列番号:1~1695に示すいずれかのCDR3ヌクレオチド配列を有するDNA、またはその相補的RNA、またはそれらの相補配列を有するポリヌクレオチドを提供するものである。本明細書において、これらのDNA、RNA、それらの相補的ポリヌクレオチドをまとめて「CDR3ポリヌクレオチド」という。例えば、CDR3ポリヌクレオチドは、配列番号:1~1695に示すヌクレオチド配列からなるDNAのみならず、これらの配列を含むDNAも包含する。また例えば、CDR3ポリヌクレオチドは、配列番号:1~1695に示すヌクレオチド配列からなるDNAに相補的なRNAのみならず、これらの配列を含むRNAも包含する。さらに例えば、CDR3ポリヌクレオチドは、上記DNAまたはRNAおよびRNAに相補的な配列を有するポリヌクレオチドも包含する。また、「CDR3ポリヌクレオチド」には、「CDR3ペプチド」をコードする縮重配列を有するものも包含される。

30

【0011】

また本発明は、別の態様において、WT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞レセプター(TCR)のV鎖のCDR3のアミノ酸配列を有するペプチドであって、配列番号:1696~3389に示すいずれかのCDR3アミノ酸配列を有するペプチドを提供するものである。本明細書において、これらのペプチドをまとめて「CDR3ペプチド」という。例えば、CDR3ペプチドは、配列番号:1696~3389に示すいずれかのCDR3アミノ酸配列からなるペプチドのみならず、これらのCDR3アミノ酸配列を含むペプチドも包含する(例えば、V鎖ペプチドまたはその一部分など)。さらに、配列番号:1696~3389に示すアミノ酸配列において、1個ないし数個、好ましくは1個ないし3個、1個ないし2個、あるいは1個のアミノ酸が置換、付加、欠失しているアミノ酸配列からなる、あるいは含むペプチドも「CDR3ペプチド」に包含される。ただし、これらのペプチドが本来のペプチドと同等の機能を有することが条件となる。これらのCDR3ペプチドは上記のCDR3ポリヌクレオチドによってコードされるもので

40

50

ある。

【0012】

C D R 3 は最も多様性に富む領域であり、抗原認識の特異性に最も強く関与する部分である。それゆえ、本発明の C D R 3 ポリヌクレオチドの配列および本発明の C D R 3 ペプチドの配列は、H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者における W T 1 特異的 C T L に特有の配列であると考えられる。したがって、ある T 細胞の T C R の V 鎖遺伝子の C D R 3 領域をコードするポリヌクレオチドまたはその C D R 3 領域のペプチドが本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のペプチドの配列を有していれば、その T 細胞は W T 1 特異的であると考えられる。したがって、本発明の C D R 3 ポリヌクレオチドおよび C D R 3 ペプチドは、広範な癌のマーカーとして、癌の診断、W T 1 ペプチド免疫療法に対する該患者の感受性の診断、W T 1 ペプチド免疫療法に対する該患者の応答性の検査などに使用することができる。

10

【0013】

本発明の C D R 3 ポリヌクレオチドおよび C D R 3 ペプチドは、W T 1 を有する細胞に起因する癌であればいずれの種類の癌患者のリンパ球においても出現し得る。W T 1 は多くの種類の癌や血液悪性腫瘍において癌抗原となっていることが知られている。従って、本発明の C D R 3 ポリヌクレオチドおよび C D R 3 ペプチド、ならびに以下に説明する本発明の方法は、殆どあらゆる種類の癌に適用することができ、例えば、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、同種造血幹細胞移植後再発などの血液悪性疾患；舌癌、歯肉癌、口腔底癌、咽頭癌、喉頭癌、唾液腺癌、甲状腺癌などの固形癌；乳癌、肺癌、胸腺癌などの胸部の癌；大腸癌、小腸癌、胃癌、膵臓癌、肝癌、胆管癌、消化器内分泌腫瘍、消化管カルチノイドなどの消化器の癌；腎癌、尿路上皮癌、胚細胞腫、ウィルムス腫瘍、前立腺癌、子宮体癌、子宮頸癌、子宮肉腫、卵巣悪性腫瘍などの尿路生殖器系の癌；骨原発性悪性腫瘍（骨肉種、Ewing肉腫など）、軟部肉腫などの筋・骨格系の悪性腫瘍；その他皮膚癌、神経芽細胞腫、悪性神経膠腫（グリオブラストーマ）、中枢神経原発悪性リンパ腫、髄芽腫・P N E T などに適用できるが、これらの癌や腫瘍に限定されない。

20

【0014】

C D R 3 ポリヌクレオチドあるいは C D R 3 ペプチドを製造する場合には、通常の遺伝子工学的的手法および/または化学合成法を用いることができる。例えば、C D R 3 ポリヌクレオチドを細胞から単離してもよく、あるいは化学合成してもよい。C D R 3 ポリヌクレオチドを P C R 法などの公知方法にて増幅することもできる。また例えば、C D R 3 ポリヌクレオチド（公知方法にて適当量まで増幅しておいてもよい）を適当なベクターに組み込んで適当な細胞に導入し、あるいは遺伝子銃やエレクトロポレーションなどによって適当な細胞に導入し、次いで、C D R 3 ポリヌクレオチドを導入された細胞を培養して、発現させることにより、C D R 3 ポリヌクレオチドおよび C D R 3 ペプチドを得ることができる。使用可能なベクターや細胞、遺伝子導入条件、培養条件、遺伝子やペプチドの単離方法などは当業者に公知であり、適宜選択して用いることができる。C D R 3 ポリヌクレオチドあるいは C D R 3 ペプチドを製造するために化学合成法を用いてもよい。これらの化学合成法は公知であり、遺伝子の化学合成法としてはアミダイト法による DNA の固相合成や 1 - 4 ホスホネート法などがあり、ペプチドの化学合成法としては F m o c 法などがある。

30

40

【0015】

したがって、本発明は、さらなる態様において、治療前の H L A - A * 2 4 0 2 陽性患者から得られた試料中の、いずれかの C D R 3 ポリヌクレオチドまたはいずれかの C D R 3 ペプチドを有する W T 1 特異的 C T L のクロナリティーを調べることの特徴とする該患者における癌の診断方法であって、該クロナリティーが複数のものが存在する場合に、該患者が癌にかかっている可能性があるかと判定する方法を提供する。本明細書において「クロナリティー」とは、同一のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有する細胞が検出される頻度をいう。クロナリティーを調べるためには、細胞 1 個 1 個を識別することのでき

50

るセルソーターを用いるのが一般的である。「患者」とは、癌の疑いのあるヒト、癌にかかっているヒトの両方を包含する。

【0016】

本発明者は、患者におけるいずれかのCDR3ポリヌクレオチドあるいはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLのクロナリティーを調べることにより、該患者が癌にかかっているかどうかを判定できることを見出した。図2-1~図2-36からわかるように、健常人(HV1~HV4)では、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLのクロナリティーはほとんどのクローンに関して1、希に2または3であるものが見られるのに対し、治療前におけるすべての癌患者(AML(急性骨髄性白血病)1~4、MDS(骨髄異形成症候群)1~5)では、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLのクロナリティーが複数のものが必ず存在しており、そのクロナリティー数およびそのような細胞の種類も健常人よりも多い。治療前における患者におけるクロナリティーの増加またはクロナリティーが複数である細胞の種類の増加は、患者において癌細胞に対する防御・攻撃が既に開始されている可能性を示すものである。

10

【0017】

これらのことより、被験者試料を調べた場合に、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLのなかにクロナリティーが複数のものが存在すれば、該被験者は癌にかかっている可能性があるとして判定することができる。さらに、治療前の被験者におけるいずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLのクロナリティーが大きいほど、あるいは複数のクロナリティーを有するWT1特異的CTLの種類が多いほど、被験者が癌にかかっている可能性が高いと判定することができる。また、上記判定方法において、治療前の患者におけるいずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有する3以上のクロナリティーを有するWT1特異的CTLのクロナリティーが大きいほど、あるいは3以上のクロナリティーを有するWT1特異的CTLの種類が多いほど、患者が癌にかかっている可能性が高いと判定してもよい。

20

【0018】

本発明は、さらなる態様において、治療前においてHLA-A*2402陽性患者から得られた試料中の、請求項1記載のいずれかのポリヌクレオチドまたは請求項2記載のいずれかのペプチドを有するWT1特異的CTLクローンの種類の数およびクロナリティーを調べることの特徴とする、WT1ペプチド免疫療法に対する患者の感受性を調べる方法であって、該患者におけるクロナリティーが複数であるWT1特異的CTLクローンの種類が、WT1ペプチド免疫療法に対する無応答者のそれよりも多い場合に、WT1ペプチド免疫療法に対する該患者の感受性があると判定する方法を提供する。

30

【0019】

患者における癌細胞に対抗して、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLが作用する。その際、治療前において既にクロナリティーが複数であるクローンは、WT1ペプチド免疫療法によってクロナリティーをさらに増加させるか、あるいはそのクロナリティーを維持する傾向がある。また、できるだけ多種類のクローンが存在したほうが、全体として有効なWT1特異的CTLクローンの数および種類が増加することとなり、WT1免疫療法の成功の可能性が高いと考えられる。より厳密には、患者におけるクロナリティーが複数であるWT1特異的CTLクローンの種類が無応答者におけるそれよりも多い場合に、WT1ペプチド免疫療法に対する患者の感受性が高いと判定することができる。

40

【0020】

図2-1~図2-36からわかるように、WT1ペプチド免疫療法に応答したAML患者において、治療前のクロナリティーが複数であるクローンの種類の数健常人および無応答者よりも多かった。AML1(応答者):10種(これらのクロナリティー合計58)、AML2(応答者):12種(これらのクロナリティー合計93)、AML3(無応

50

答者) : 9種(これらのクロナリティー合計27)、AML4(無応答者) : 3種(これらのクロナリティー合計10)。なお、健康人HV1~5においてはクロナリティーが複数であるクローンの種類は0~2種の範囲であった。

【0021】

本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチド免疫療法の前後において、HLA-A*2402陽性患者から得られた試料中の、請求項1記載のいずれかのポリヌクレオチドまたは請求項2記載のいずれかのペプチドを有するWT1特異的CTLクローンのクロナリティーを調べることの特徴とする、該患者におけるWT1ペプチド免疫療法のモニタリング方法であって、いずれかのクローンに関してWT1ペプチド免疫療法前よりもWT1ペプチド免疫療法後において該WT1特異的CTLのクロナリティーが増加した場合に、該患者がWT1ペプチド免疫療法に应答したと判定する方法を提供する。

10

【0022】

図2-1~図2-36からわかるように、AML患者においてWT1ペプチド免疫療法期間中にクロナリティーが増加した(クロナリティー0から1以上になったものも含む)WT1特異的CTLが見られる。かかる挙動を示した典型例としては、AML(Pt1)におけるClone#02.28、#05.034、#05.135、#05.219、#09.65、#12.04、#13.13、#27.016、#28.83など、ならびにAML(Pt2)におけるClone#02.27、#05.035、#05.141、#05.219、#06.009、#12.04、#12.20、#15.44、#20.068、#27.032などが挙げられる。WT1ペプチド免疫療法によりクロナリティーが増えるクローンが存在することは、WT1ペプチド免疫療法に対する应答を示すものである。すなわち、クロナリティーが増加したことは、WT1ペプチド免疫療法が一定期間奏功したことを示すと考えられる。これらのクロナリティーの増加は一時的なものであってもよく、持続的なものであってもよい。あるクローンのクロナリティーが一時的に増加し、その後減少しても、他のWT1特異的CTLのクロナリティーが増加して、効果を補填するものと考えられる。癌細胞に対する効果からすると、クロナリティーの増加の割合が大きいほど望ましいと考えられる。したがって、WT1ペプチド免疫療法後において、クロナリティーの増加の割合が大きいほど、あるいはクロナリティーが増加したクローンの種類が多いほど、WT1ペプチド免疫療法に対する应答性が高いと判定することができる。癌の種類、部位などに応じて適切な方法を用いて癌細胞の数や性質を調べることができる。

20

30

【0023】

上記治療モニタリング方法において、WT1ペプチド免疫療法の前後でクロナリティーを比較するのであるが、該前後の時間間隔は任意であってよい。例えば、数日間、1週間、2週間、3週間、4週間、2ヶ月、3ヶ月またはそれ以上であってもよい。

【0024】

上で説明した本発明の方法において、クロナリティーを調べるための手段・方法、クローンの種類を調べる(すなわち、CDR3ペプチドのアミノ酸配列あるいはそれをコードするヌクレオチド配列を決定する)ための手段・方法は、当業者に公知であり、当業者は適宜これらの作業を行うことができる。例えば、本明細書の実施例に示すように、FACS Aria装置などの公知のソーティング装置、および例えばPCR法などの公知の遺伝子増幅方法(例えばプライマーセットとして表1に記載のものを使用する)などを用いることができる。本発明のCDR3ポリヌクレオチドあるいはCDRペプチドの解析を、より厳密に、あるいはより確定的に行うためには、V鎖遺伝子中のCDR3ヌクレオチド配列、IMGT、J領域およびD領域が図1-1~図1-36に示すものであるかどうかを確認すればよい。かかる確認は当業者の通常行い得るところである。

40

【0025】

WT1ペプチド免疫療法も公知である。例えば、HLA-A*2402陽性患者に対しては、HLA-A*2402拘束性WT1ペプチド天然型(アミノ酸配列:CMTWNQMNL)あるいは改変型(アミノ酸配列:CYTWNQMNL)を、例えば経皮的に投与

50

することにより行うことができる。通常、1回の投与量は $\mu\text{g}/\text{body} \sim \text{mg}/\text{body}$ のオーダーであり、1週間～数週間間隔で投与することができる。

【0026】

本発明は、さらなる態様において、CDR3ポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドを含むチップ、あるいはCDR3ペプチドを含むチップ、CDR3ペプチドに対する抗体を含むチップを提供する。これらのチップはマイクロチップ、マイクロアレイなどの形態であってもよい。これらのチップの作製は常法に従って行うことができ、例えば、ガラス基盤上にCDR3ポリヌクレオチドあるいはCDR3ペプチドに対する抗体を固定することができる。チップ上に固定されるCDR3ポリヌクレオチド、その相補的ポリヌクレオチド、CDR3ペプチド、CDR3ペプチドに対する抗体の種類は1種～全種類であり、好ましくは全種類を固定して網羅的に解析する。例えば、配列番号：1～1695に示すヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる全種類のポリヌクレオチドをチップ上に固定してもよく、また例えば、配列番号：1696～3389に示すアミノ酸配列からなる全種類のペプチドを特異的に認識して結合する抗体をチップ上に固定してもよい。チップ上のCDR3ポリヌクレオチド、その相補的ポリヌクレオチド、CDR3ペプチド、CDR3ペプチドに対する抗体の配置は任意である。

10

【0027】

これらのチップは、上記の癌の診断方法などにおいて使用することができる。試料としては、患部組織、血液、リンパ液などの体液、粘膜などであってもよいが、好ましくは末梢血である。例えば、分析対象がCDR3ポリヌクレオチドである場合、常法に従って細胞から核酸を抽出し、配列番号：1～1695に示すヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなる全種類のポリヌクレオチドを固定したチップを用いて、ハイブリダイゼーションした試料中のDNAの種類および量を調べることができる。また例えば、分析対象がCDR3ペプチドである場合には、配列番号：1696～3389に示すアミノ酸配列からなる全種類のペプチドを特異的に認識して結合する抗体を固定したチップを用いて、特異的結合した試料中のペプチドの種類および量を調べることができる。

20

【0028】

この点において、本発明は、CDR3ペプチドを特異的に認識してこれに結合する抗体を提供する。好ましくは、かかる抗体は、配列番号：1696～3389に示すいずれかのアミノ酸配列を特異的に認識するものである。かかる抗体の作成方法は当業者に公知である。

30

【0029】

通常は、試料中のDNAあるいはチップ上のDNA配列に、ハイブリダイゼーションの有無およびハイブリダイゼーション量を示すことのできる標識を付しておく。また例えば、配列番号：1696～3389のCDR3ペプチドに対する各抗体をチップ上に配列させ、試料中のCDR3ペプチドとの特異的結合を調べることにより、試料中のCDR3ペプチドの存在、および種類を同定することができる。通常は、試料中のペプチドあるいはチップ上の抗体に、特異的結合の有無を判別できる標識を付しておく。ハイブリダイゼーションや特異的結合の有無および量を示すことのできる標識は公知であり、例えば、蛍光標識、放射性標識、酵素標識、発色基を含むものなどがあり、適宜選択して用いることができる。上記のチップを用いることにより、同時に多検体を分析することが可能となる。

40

【0030】

本発明のCDR3ポリヌクレオチドおよびCDRペプチドはこれらのチップを用いるほか、例えば、サザンブロット、ノーザンブロット、コロニーハイブリダイゼーション、ELISAなどの公知の方法を用いて分析し同定することができる。

【0031】

上述のごとく、本発明のCDR3 DNAは実施例に示すプライマー、特に、表1に示すプライマーセットを用いて同定されたものである。したがって、本発明は、CDRポリヌクレオチドを増幅するための配列番号：3391～3418に示す配列から選択される配列を有するプライマーを提供するものである。例えば、CDR3ポリヌクレオチドの増

50

幅に配列番号：3393～3417に示されるプライマーを含むプライマーセットを用いてもよい。

【0032】

また本発明は、CDR3ポリヌクレオチドあるいはCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLを検出するための手段を含む、癌の診断キット、WT1ペプチド免疫療法に対する癌患者の感受性を調べるためのキット、またはWT1ペプチド免疫療法のモニタリング用キットを提供する。さらに本発明は、CDR3ポリヌクレオチドあるいはCDR3ペプチドを有するWT1特異的CTLを検出するための手段を含む、癌の診断装置、WT1ペプチド免疫療法に対する癌患者の感受性を調べるための装置、またはWT1ペプチド免疫療法のモニタリング用装置も提供する。上述のプライマーセットなどの遺伝子増幅手段、上述のチップ、あるいはチップから得られる情報の解析手段などにかかるキットの構成成分とすることができ、あるいはかかる装置に用いることができる。

10

【0033】

本発明は、さらにもう一つの態様において、CDR3ポリヌクレオチド配列を含むT細胞レセプター遺伝子を導入したHLA-A*2402陽性癌患者のリンパ球に関するものである。好ましくは、かかるリンパ球は、本発明のポリヌクレオチドであってCDR3ポリヌクレオチドを含むWT1特異的CTLのTCRのV鎖遺伝子と、WT1特異的CTLのTCRのV鎖遺伝子とを導入された癌患者の末梢血リンパ球である。このような末梢血リンパ球の調製にあたり、これらのWT1特異的CTLのTCRのV鎖遺伝子1種類を用いて複数種類の末梢リンパ球を得て、それらを患者に導入してもよいが、WT1特異的CTLのTCRのV鎖遺伝子を複数種類用いて複数種類の末梢リンパ球を得て、それらを患者に導入することが、治療効果の向上の点から好ましい。あるいはまた、患者や癌の種類等によっては、治療に有効な遺伝子中のヌクレオチド配列が異なることもあり、個々の状況に応じて導入する遺伝子のヌクレオチド配列を選択することも好ましい。

20

【0034】

導入すべき遺伝子の調製方法、ならびに末梢血リンパ球への遺伝子導入方法は当業者に公知である。例えば、導入すべき遺伝子を適当なベクターに組み込んで適当な細胞に導入してもよく、あるいは遺伝子銃やエレクトロポレーションなどによって適当な細胞に導入してもよい。その他の遺伝子導入条件や細胞の培養条件などは当業者が適宜選択しうるものである。

30

【0035】

上記のように遺伝子を導入されたリンパ球を患者体外で培養して大量のWT1特異的CTLを得ることができる。そして、得られたCTLを癌患者に導入することにより、WT1を発現している癌を傷害させることができ、癌治療を行うことができる。得られたCTLを導入する好ましい患者は、末梢血リンパ球を得た患者と同一人である。

【0036】

上記の癌治療は、抗ガン剤や放射線療法などの他の癌治療と併用することもできる。上記癌治療は広範な癌に適用することができ、それらは上で例示してあるが、これらに限らない。

【0037】

本発明は、さらにもう一つの態様において、CDR3ペプチドに対する抗体ならびにその使用方法を提供する。かかる抗体の作成方法は当業者に公知である。かかる抗体を用いて、例えば、対象試料中の本発明のCDR3ペプチドのアミノ酸配列あるいはそれを有するアミノ酸配列をV鎖中に有するリンパ球を検出あるいは同定することができる。例えば、配列番号：1696～3389のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体を用いて、癌特異的なリンパ球を検出または同定することができる。またこれらの抗体を用いて、上記の本発明の方法、例えば癌の診断などを行うことができる。

40

【0038】

また、かかる抗体を、それに対する本発明のCDR3アミノ酸配列を有するリンパ球と接触させて、活性化することもできる。このようにして活性化されたリンパ球を癌の治療

50

に使用することができる。好ましくは、癌患者から得たリンパ球を活性化して、必要ならば増殖させて、当該患者に戻すことにより癌治療を行うことができる。また、かかる抗体を用いて、目的とするWT1特異的T細胞を豊富化させることもできる。例えば、かかる抗体を用いて癌患者においてWT1特異的T細胞を豊富化させ、癌治療に資することが出来る。

【0039】

さらなる態様において、本発明は、上で説明した本発明の末梢血リンパ球に検出可能な標識を付して患者に投与し、次いで、標識の存在位置および量を調べることを特徴とする、固形癌の位置および大きさの特定方法を提供する。標識はテクネシウム99のごとき放射性標識、蛍光標識など公知のものを用いることができる。細胞の標識化方法も公知である。標識の検出およびシグナルの定量もまた当業者に公知であり、放射線カウンター、蛍光測定、あるいは生検による組織の採取などにより行うことができる。

10

【0040】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0041】

A. 実験方法および使用材料

(1) 細胞

5人の健康ボランティア(HV1~HV5)ならびに4人のHLA-A*2402陽性AML患者(AML1~AML4)から末梢血試料を得た。5人のHLA-A*2402陽性MDS患者(MDS1~MDS5)から骨髓試料または末梢血試料を得た。すなわち、AML1からは、治療前、治療開始から4、8、12、42週目に末梢血を得た。AML2からは、治療前、治療開始から4週目、8週目、12週目および42週目に末梢血を得た。AML3からは、治療前、治療開始から4週目、8週目に末梢血を得た。AML4からは、治療前、治療開始から4週目に末梢血を得た。MDS1からは、治療前の骨髓、治療前の末梢血、治療開始から4週目、8週目および12週目に末梢血を得た。MDS2~5からは、治療前の末梢血および治療前の骨髓を得た。得られた末梢血試料をFicoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いる密度勾配遠心分離に供して末梢血単核細胞(PBMCs)を分離し、使用するまで-170にて冷凍した。上記患者に対する治療は、WT1ペプチド免疫療法にて行った。治療に使用したWT1ペプチドのアミノ酸配列はCys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu(配列番号:3390)であり、2週間間隔で皮内注射により投与した。

20

30

【0042】

(2) フローサイトメリー分析およびソーティング

先ず、1試料あたり 2×10^6 個のPBMCsを、FACSバッファー(2%ウシ胎児血清含有PBS)中にて37で30分、PE抱合HLA-A*2402-WT1²³⁵⁻²⁴³テトラマー(MBL, Tokyo, Japan)にて染色した。次いで、下記の5色の蛍光標識モノクローナル抗体にて、暗所かつ氷上で25分染色した: FITC-標識抗-CD4、CD14、CD16、CD19およびCD56、抗-CD3-PerCP、抗-CD8-APC-Cy7(BD Bioscience, San Jose, CA)、抗-CD45RA-APCおよび抗-CCR7-PE-Cy7(BD Pharmingen, San Diego, CA)。染色された細胞をFACSバッファーにて2回洗浄した。FACS Aria装置(BD Biosciences)を用いてソーティングを行い、FACS Divaソフトウェア(BD Biosciences)にてデータ解析を行って、CD4⁻CD14⁻CD16⁻CD19⁻CD56⁻細胞フラクション中の単一のHLA-A*2402-WT1²³⁵⁻²⁴³テトラマー⁺CD3⁺CD8⁺細胞を得て、WT1-Tet⁺細胞と定義した。

40

【0043】

(3) ソーティングされた単一細胞からのTCR-鎖のcDNAの合成

DNAのコンタミネーションをなくし、十分な単一細胞のRT-PCRを行うために、

50

cDNA合成を行い、すべてのPCR工程を別個のクリーンベンチ内で行った。単一WT 1-Tet⁺細胞を、15μlのcDNA反応ミックスを入れたPCRチューブ中に直接ソーティングした。このcDNA反応ミックスは、下記のを溶解バッファー(0.5% Triton X-100を含有する1X cDNAバッファー)中に含むものであった：逆転写酵素(SuperScript III, Invitrogen, Carlsbad, CA)、0.5mM dNTPs(Invitrogen)、20ユニット(U)のRNaseインヒビター(Invitrogen)、100μg/mlのゼラチン(Roche, Indianapolis, IN)、100μg/mlのtRNA(Roche)および200nMのTCR-鎖不変領域特異的プライマー(5'-CACCAGTGTGGCCTTTTG-3'(配列番号：3391))。ソーティング後、cDNA合成のために試料を50℃で90分インキュベーションし、次いで、反応を停止させるために95℃で5分インキュベーションした。

10

【0044】

(4)セミ-ネステッドマルチプルPCR反応

上記手順により得た10μlの合成cDNA生成物を、40μlの反応ミックス中に添加した。この反応ミックスは、1X PCRバッファー、2mM MgCl₂、0.25mM dNTPs、1.25U DNAポリメラーゼ(Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen)、5nMの24種のV_Hファミリー特異的フォワードプライマーの混合物(表1に示す)および5nMの3'C_Hリバースプライマー(5'-GCTTCTGATGGCTCAAACACAGC-3'(配列番号：3392))を含んでいた。PCR手順は以下のとおりであった：プレ-PCR加熱工程を95℃で2分、次いで、95℃で45秒の変性工程、57℃で45秒のアニーリング工程および72℃で50秒の伸長工程からなるサイクルを40サイクル。

20

【表1】

S2	TRBV2	GGTCACACAGATGGGACAGGAAGT (配列番号：3393)
S2	TRBV3	CCCAGACTCCAAAATACCTGGTCA (配列番号：3394)
S5	TRBV4	TACGCAGACACCAA<GA>ACACCTGGTCA (配列番号：3395)
S1	TRBV5	ACAGCAAGTGAC<TAG>CTGAGATGCTC (配列番号：3396)
S7	TRBV6	GTGTCACTCAGACCCCAAAATTC (配列番号：3397)
S4	TRBV7-1	GTGTGATCCAATTTTCAGGTCATAC (配列番号：3398)
S3	TRBV7-3	ATGTAAC<CT>TCAGGTGTGATCCAA (配列番号：3399)
S1	TRBV9	ACAGCAAGTGAC<TAG>CTGAGATGCTC (配列番号：3400)
S1	TRBV10	CCAAGACACAAGGTCACAGAGACA (配列番号：3401)
S4	TRBV11	CAGTCTCCAGATATAAGATTATAGAG (配列番号：3402)
S4	TRBV12	GGTGACAGAGATGGGACAAGAAGT (配列番号：3403)
S8	TRBV13	CTGATCAAAGAAAAGAGGGAAACAGCC (配列番号：3404)
S6	TRBV14	ATAGAAGCTGGAGTTACTCAGTTC (配列番号：3405)
S8	TRBV15	CAAGATACCAGGTTACCCAGTTTG (配列番号：3406)
S5	TRBV18	TGCAGAACCAAGACACCTGGTCA (配列番号：3407)
S5	TRBV19	CACTCAGTCCCAAGTACCTGTT (配列番号：3408)
S2	TRBV20	GAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAG (配列番号：3409)
S6	TRBV21	AAGTCAACCAGAGACCTAGACTT (配列番号：3410)
S6	TRBV23	ACAAAGATGGATTGTACCCCGAA (配列番号：3411)
S7	TRBV24	GTTACCCAGACCCCAAGGAATAGG (配列番号：3412)
S1	TRBV25	GATCACTCTGGAATGTTCTCAAACC (配列番号：3413)
S3	TRBV27	GTGACCCAGAACCAAGATACCTC (配列番号：3414)
S2	TRBV28	GTAACCCAGAGCTCGAGATATCTA (配列番号：3415)
S3	TRBV29	TCCAGTGTCAAGTCCATAGCCAAGTC (配列番号：3416)
S5	TRBV30	GTCAGATCTCAGACTATTCATCAATGG (配列番号：3417)

30

40

50

【0045】

次いで、上記PCRの生成物をスクリーニングPCRに供した。上記PCR生成物1 μ lを各々8本の別個のチューブに入れ、各チューブに24 μ lの反応ミックスを入れた。この反応ミックスは、1X PCRバッファー、2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、1.0 U Platinum Taq DNAポリメラーゼ、表1に示すS1~S8の8つのスクリーニングセットのうち1セットのフォワードプライマーおよび5' C リバースプライマー(5' - GGAACACGTTTTTCAGGTCCT - 3' (配列番号: 3418)) (各150 nM)を含んでいた。PCR手順は以下のとおりであった: プレ-PCR加熱工程を95 $^{\circ}$ Cで2分、次いで、94 $^{\circ}$ Cで45秒の変性工程、57 $^{\circ}$ Cで45秒のアニーリング工程および72 $^{\circ}$ Cで40秒の伸長工程からなるサイクルを35サイクル。

10

【0046】

当該8つのスクリーニングPCRにおける陽性反応を確認するために、5 μ lの各スクリーニングPCR生成物を2%アガロースゲル電気泳動に供した。次いで、さらなるPCRを行った。このPCRは、陽性と確認されたスクリーニングセットのV 特異的フォワードプライマー各150 nMを用いて35サイクル行った。2%アガロースゲル電気泳動にて陽性反応を確認した。陰性対照として、細胞を含まない系を用いて上と同様に3つのウェルを調製し、同じ手順で実験を行った。

【0047】

(5) TCR - 相補性決定領域3 (CDR3) の配列決定分析

増幅されたTCR - 遺伝子フラグメントを、PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) により精製した。対応するTCR V 特異的フォワードプライマーを用いて配列決定を行った。配列決定にはABI PRISM BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて分析を行った。IMGT ヒトTCR 遺伝子データベースのサイト (<http://imgt.cines.fr>) と比較することによりCDR3の配列データを分析した。

20

【0048】

B. 結果

健常人および癌患者 (AML 1~4、MDS 1~5) 由来のWT1 特異的CTLのV鎖遺伝子の配列、J領域の配列、D領域の配列、N領域の配列、CDR3ヌクレオチド配列およびCDR3アミノ酸配列を図1-1~図1-36に示す。個々のWT1 特異的CTLのクロナリティーを図2-1~図2-36に示す。また、CDR3ヌクレオチド配列を配列番号: 1~1695に示し(クローン#24.29と#28.92のCDR3ヌクレオチド配列は同じものとなるのでクローン#24.29のほうを配列表に記載)、CDR3アミノ酸配列を配列番号: 1696~3389に示した(クローン#2.53と#28.58のCDR3アミノ酸配列は同じものであり、クローン#24.29と#28.92のCDR3アミノ酸配列も同じものである)、クローン#2.53、クローン#24.19を配列表に記載)。なお、AML患者のうち、AML1およびAML2は治療に対して応答し、AML3およびAML4は応答しなかった。MDS患者については治療に対する応答を判定していない。

30

40

【0049】

図2-1~図2-36からわかるように、健常人(HV1~HV4)では、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1 特異的CTLのクロナリティーはほとんどのクローンに関して1、希に2または3であるものが見られるのに対し、治療前におけるすべての癌患者(AMLおよびMDS)においては、いずれかのCDR3ポリヌクレオチドまたはいずれかのCDR3ペプチドを有するWT1 特異的CTLのクロナリティーが複数のもので必ず存在しており、そのクロナリティー数およびそのような細胞の種類も健常人よりも多かった。

【0050】

治療前における患者におけるクロナリティーの増加またはクロナリ

50

ティーが複数である細胞の種類増加は、患者において癌細胞に対する防御・攻撃が既に開始されている可能性を示すものであり、既に癌細胞が患者に存在する可能性があると考えられる。

【0051】

また、図2-1～図2-36からわかるように、WT1ペプチド免疫療法に应答したAML患者において、治療前のクロナリティーが複数であるクローンの種類数が健常人および無应答者よりも多かった。AML1(应答者):10種(これらのクロナリティー合計58)、AML2(应答者):12種(これらのクロナリティー合計93)、AML3(無应答者):9種(これらのクロナリティー合計27)、AML4(無应答者):3種(これらのクロナリティー合計10)。なお、健常人HV1～5においてはクロナリティーが複数であるクローンの種類は0～2種の範囲であった。

10

【0052】

治療前において既にクロナリティーが複数であるクローンは、WT1ペプチド免疫療法によってクロナリティーをさらに増加させるか、あるいはそのクロナリティーを維持する傾向がある。また、できるだけ多種類のクローンが存在したほうが、全体として有効なWT1特異的CTLクローンの数および種類が増加することとなり、WT1免疫療法の成功の可能性が高いと考えられる。

【0053】

図2-1～図2-36からわかるように、AML患者においてWT1ペプチド免疫療法期間中に一時的あるいは継続的にクロナリティーが増加したWT1特異的CTL(クロナリティー0から1以上になったものも含む)が見られた。かかる挙動を示した典型例としては、AML(患者1-应答者)におけるClone#02.28、#05.034、#05.135、#05.219、#09.65、#12.04、#13.13、#27.016、#28.83など、ならびにAML(患者2-应答者)におけるClone#02.27、#05.035、#05.141、#05.219、#06.009、#12.04、#12.20、#15.44、#20.068、#27.032などが挙げられる。例えば、AML患者1のクローン#02.28のクロナリティーの変動を見れば、治療開始時および4週目の治療の効果が大きかったことがわかる。

20

【0054】

あるクローンのクロナリティーが増加したことは、WT1ペプチド免疫療法が一定期間奏功したことを示すと考えられる。あるクローンのクロナリティーが一時的に増加し、その後減少しても、他のクローンのクロナリティーが増加して、効果を補填するものと考えられる。癌細胞に対する効果からすると、クロナリティーの増加の割合が大きいほど望ましいと考えられる。したがって、WT1ペプチド免疫療法後において、クロナリティーの増加の割合が大きいほど、あるいはクロナリティーが増加したクローンの種類が多いほど、WT1ペプチド免疫療法に対する应答性が高かったと考えられる。

30

【産業上の利用可能性】

【0055】

本発明は、有用な抗癌治療用医薬、癌検査用キットまたは試薬、癌の研究試薬等が提供される。したがって、本発明は、癌の治療のための医薬品の分野、癌の検査用キットおよび試薬の分野、ならびに癌研究の分野などにおいて利用されうる。

40

【 1 - 3 3 】

Table with 6 columns: clone # V name, J name, D name, V-REGION, D-REGION, CDR3 amino acid. Rows 28.09 to 28.56.

【 1 - 3 4 】

Table with 6 columns: clone # V name, J name, D name, V-REGION, D-REGION, CDR3 amino acid. Rows 28.57 to 29.04.

【 1 - 3 5 】

Table with 6 columns: clone # V name, J name, D name, V-REGION, D-REGION, CDR3 amino acid. Rows 29.05 to 29.43.

【 1 - 3 6 】

Table with 6 columns: clone # V name, J name, D name, V-REGION, D-REGION, CDR3 amino acid. Rows 29.44 to 29.52.

【 2 - 5 】

Code #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
05.084	1							4			4
05.085	1										1
05.086	1										1
05.087	1										1
05.088	1										1
05.089	1										1
05.090	1										1
05.091	1										1
05.092	1										1
05.093	1										1
05.094	1										1
05.095	1										1
05.096	1										1
05.097	1										1
05.098	1										1
05.099	1										1
05.100	1										1
05.101	1										1
05.102	1										1
05.103	1										1
05.104	1										1
05.105	1										1
05.106	1										1
05.107	1										1
05.108	1										1
05.109	1										1
05.110	1										1
05.111	1										1
05.112	1										1
05.113	1										1
05.114	1										1
05.115	1										1
05.116	1										1
05.117	1										1
05.118	1										1
05.119	1										1
05.120	1										1
05.121	1										1
05.122	1										1
05.123	1										1
05.124	1										1
05.125	1										1
05.126	1										1
05.127	1										1
05.128	1										1
05.129	1										1
05.130	1										1
05.131	1										1
05.132	1										1
05.133	1										1
05.134	1										1
05.135	1										1
05.136	1										1
05.137	1										1
05.138	1										1
05.139	1										1
05.140	1										1
05.141	1										1
05.142	1										1
05.143	1										1
05.144	1										1
05.145	1										1
05.146	1										1
05.147	1										1
05.148	1										1
05.149	1										1
05.150	1										1
05.151	1										1
05.152	1										1
05.153	1										1
05.154	1										1
05.155	1										1
05.156	1										1
05.157	1										1
05.158	1										1
05.159	1										1
05.160	1										1
05.161	1										1
05.162	1										1
05.163	1										1
05.164	1										1
05.165	1										1
05.166	1										1
05.167	1										1
05.168	1										1
05.169	1										1
05.170	1										1
05.171	1										1
05.172	1										1
05.173	1										1
05.174	1										1
05.175	1										1
05.176	1										1
05.177	1										1
05.178	1										1

【 2 - 7 】

Code #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
05.184	1										1
05.185	1										1
05.186	1										1
05.187	1										1
05.188	1										1
05.189	1										1
05.190	1										1
05.191	1										1
05.192	1										1
05.193	1										1
05.194	1										1
05.195	1										1
05.196	1										1
05.197	1										1
05.198	1										1
05.199	1										1
05.200	1										1
05.201	1										1
05.202	1										1
05.203	1										1
05.204	1										1
05.205	1										1
05.206	1										1
05.207	1										1
05.208	1										1
05.209	1										1
05.210	1										1
05.211	1										1
05.212	1										1
05.213	1										1
05.214	1										1
05.215	1										1
05.216	1										1
05.217	1										1
05.218	1										1
05.219	1										1
05.220	1										1
05.221	1										1
05.222	1										1
05.223	1										1
05.224	1										1
05.225	1										1
05.226	1										1
05.227	1										1
05.228	1										1
05.229	1										1
05.230	1										1
05.231	1										1
05.232	1										1
05.233	1										1
05.234	1										1
05.235	1										1
05.236	1										1
05.237	1										1
05.238	1										1
05.239	1										1
05.240	1										1
05.241	1										1
05.242	1										1
05.243	1										1
05.244	1										1
05.245	1										1
05.246	1										1
05.247	1										1
05.248	1										1
05.249	1										1
05.250	1										1
05.251	1										1
05.252	1										1
05.253	1										1
05.254	1										1
05.255	1										1
05.256	1										1
05.257	1										1
05.258	1										1
05.259	1										1
05.260	1										1
05.261	1										1
05.262	1										1
05.263	1										1
05.264	1										1
05.265	1										1
05.266	1										1
05.267	1										1
05.268	1										1
05.269	1										1
05.270	1										1
05.271	1										1
05.272	1										1
05.273	1										1
05.274	1										

【 2 - 9 】

Code #HV1HV2HV3HV4HV5	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS2	MDS3	MDS4	MDS5	Total
05.075										1
05.076										1
05.077										1
05.078										1
05.079										1
05.080										1
05.081										1
05.082										1
05.083										1
05.084										1
05.085										1
05.086										1
05.087										1
05.088										1
05.089										1
05.090										1
05.091										1
05.092										1
05.093										1
05.094										1
05.095										1
05.096										1
05.097										1
05.098										1
05.099										1
05.100										1
05.101										1
05.102										1
05.103										1
05.104										1
05.105										1
05.106										1
05.107										1
05.108										1
05.109										1
05.110										1
05.111										1
05.112										1
05.113										1
05.114										1
05.115										1
05.116										1
05.117										1
05.118										1
05.119										1
05.120										1
05.121										1
05.122										1
05.123										1
05.124										1
05.125										1
05.126										1
05.127										1
05.128										1
05.129										1
05.130										1
05.131										1
05.132										1
05.133										1
05.134										1
05.135										1
05.136										1
05.137										1
05.138										1
05.139										1
05.140										1
05.141										1
05.142										1
05.143										1
05.144										1
05.145										1
05.146										1
05.147										1
05.148										1
05.149										1
05.150										1
05.151										1
05.152										1
05.153										1
05.154										1
05.155										1
05.156										1
05.157										1
05.158										1
05.159										1
05.160										1
05.161										1
05.162										1
05.163										1
05.164										1
05.165										1
05.166										1
05.167										1
05.168										1
05.169										1
05.170										1
05.171										1
05.172										1
05.173										1
05.174										1
05.175										1
05.176										1
05.177										1
05.178										1
05.179										1
05.180										1
05.181										1
05.182										1
05.183										1
05.184										1
05.185										1
05.186										1
05.187										1
05.188										1
05.189										1
05.190										1
05.191										1
05.192										1
05.193										1
05.194										1
05.195										1
05.196										1
05.197										1
05.198										1
05.199										1
05.200										1
05.201										1
05.202										1
05.203										1
05.204										1
05.205										1
05.206										1
05.207										1
05.208										1
05.209										1
05.210										1
05.211										1
05.212										1
05.213										1
05.214										1
05.215										1
05.216										1
05.217										1
05.218										1
05.219										1
05.220										1
05.221										1
05.222										1
05.223										1
05.224										1
05.225										1
05.226										1
05.227										1
05.228										1
05.229										1
05.230										1
05.231										1
05.232										1
05.233										1
05.234										1
05.235										1
05.236										1
05.237										1
05.238										1
05.239										1
05.240										1
05.241										1
05.242										1
05.243										1
05.244										1
05.245										1
05.246										1
05.247										1
05.248										1
05.249										1
05.250										1
05.251										1
05.252										1
05.253										1
05.254										1
05.255										1
05.256										1
05.257										1
05.258										1
05.259										1
05.260										1
05.261										1
05.262										1
05.263										1
05.264										1
05.265										1
05.266										1
05.267										1
05.268										1
05.269										1
05.270										1
05.271										1
05.272										1
05.273										1
05.274										1
05.275										1
05.276										1
05.277										1
05.278										1
05.279										1
05.280										1
05.281										1
05.282										1
05.283			</							

【 2 - 1 3 】

clone #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
06.187	1										1
06.188	1										1
06.189	1										1
06.190	1										1
06.191	1										1
06.192	1										1
06.193	1										1
06.194	1										1
06.195	1										1
06.196	1										1
06.197	1										1
06.198	1										1
06.199	1										1
06.200	1										1
06.201	1										1
06.202	1										1
06.203	1										1
06.204	1										1
06.205	1										1
06.206	1										1
06.207	1										1
06.208	1										1
06.209	1										1
06.210	1										1
06.211	1										1
06.212	1										1
06.213	1										1
06.214	1										1
06.215	1										1
06.216	1										1
06.217	1										1
06.218	1										1
06.219	1										1
06.220	1										1
06.221	1										1
06.222	1										1
06.223	1										1
06.224	1										1
06.225	1										1
06.226	1										1
06.227	1										1
06.228	1										1
06.229	1										1
06.230	1										1
06.231	1										1
06.232	1										1
06.233	1										1
06.234	1										1

【 2 - 1 4 】

clone #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
06.187	1										1
06.188	1										1
06.189	1										1
06.190	1										1
06.191	1										1
06.192	1										1
06.193	1										1
06.194	1										1
06.195	1										1
06.196	1										1
06.197	1										1
06.198	1										1
06.199	1										1
06.200	1										1
06.201	1										1
06.202	1										1
06.203	1										1
06.204	1										1
06.205	1										1
06.206	1										1
06.207	1										1
06.208	1										1
06.209	1										1
06.210	1										1
06.211	1										1
06.212	1										1
06.213	1										1
06.214	1										1
06.215	1										1
06.216	1										1
06.217	1										1
06.218	1										1
06.219	1										1
06.220	1										1
06.221	1										1
06.222	1										1
06.223	1										1
06.224	1										1
06.225	1										1
06.226	1										1
06.227	1										1
06.228	1										1
06.229	1										1
06.230	1										1
06.231	1										1
06.232	1										1
06.233	1										1
06.234	1										1

【 2 - 1 5 】

clone #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
06.235	1										1
06.236	1										1
06.237	1										1
06.238	1										1
06.239	1										1
06.240	1										1
06.241	1										1
06.242	1										1
06.243	1										1
06.244	1										1
06.245	1										1
06.246	1										1
06.247	1										1
06.248	1										1
06.249	1										1
06.250	1										1
06.251	1										1
06.252	1										1
06.253	1										1
06.254	1										1
06.255	1										1
06.256	1										1
06.257	1										1
06.258	1										1
06.259	1										1
06.260	1										1
07.01	1										1
07.02	1										1
07.03	1										1
07.04	1										1
07.05	1										1
07.06	1										1
07.07	1										1
07.08	1										1
07.09	1										1
07.10	1										1
07.11	1										1
07.12	1										1
07.13	1										1
07.14	1										1
07.15	1										1
07.16	1										1
07.17	1										1
07.18	1										1
07.19	1										1
07.20	1										1
07.21	1										1
07.22	1										1

【 2 - 1 6 】

clone #	HVs	AML1 (Res1)	AML2 (Res2)	AML3 (nonRes1)	AML4 (nonRes2)	MDS1	MDS-2	MDS-3	MDS-4	MDS-5	total
07.23	1										1
07.24	1										1
07.25	1										1
07.26	1										1
07.27	1										1
07.28	1										1
07.29	1										1
07.30	1										1
07.31	1										1
07.32	1										1
07.33	1										1
07.34	1										1
07.35	1										1
07.36	1										1
07.37	1										1
07.38	1										1
07.39	1										1
07.40	1										1
07.41	1										1
07.42	1										1
07.43	1										1
07.44	1										1
07.45	1										1
07.46	1										1
07.47	1										1
07.48	1										1
07.49	1										1
07.50	1										1
07.51	1										1
07.52	1										1
07.53	1										1
07.54	1										1
07.55	1										1
07.56	1										1
07.57	1										1

【 2 - 2 1 】

code #	HVs	AML1 (Rest)	AML2 (Resz)	AML3 (nonResz)	AML4 (nonResz)	MDS1	MDS2	MDS3	MDS4	MDS5	total
12.43											1
12.44											1
12.45											1
12.46											1
12.47											1
12.48											1
12.49											1
12.50											1
12.51											1
12.52											1
12.53											1
12.54											1
12.55											1
12.56											1
12.57											1
12.58											1
12.59											1
12.60											1
12.61											1
12.62											1
12.63											1
12.64											1
12.65											1
12.66											1
12.67											1
12.68											1
12.69											1
12.70											1
12.71											1
12.72											1
12.73											1
12.74											1
12.75											1
12.76											1
12.77											1
12.78											1
12.79											1
12.80											1
12.81											1
12.82											1
12.83											1
12.84											1
12.85											1
12.86											1
12.87											1
12.88											1
12.89											1
12.90											1
12.91											1
12.92											1
12.93											1
12.94											1
12.95											1
12.96											1
12.97											1
12.98											1
12.99											1
13.00											1
13.01											1
13.02											1
13.03											1
13.04											1
13.05											1
13.06											1
13.07											1
13.08											1
13.09											1
13.10											1
13.11											1
13.12											1
13.13											1
13.14											1
13.15											1
13.16											1
13.17											1
13.18											1
13.19											1
13.20											1
13.21											1
13.22											1
13.23											1
13.24											1
13.25											1
13.26											1
13.27											1
13.28											1
13.29											1
13.30											1
13.31											1
13.32											1
13.33											1
13.34											1
13.35											1
13.36											1
13.37											1
13.38											1
13.39											1

【 2 - 2 3 】

code #	HVs	AML1 (Rest)	AML2 (Resz)	AML3 (nonResz)	AML4 (nonResz)	MDS1	MDS2	MDS3	MDS4	MDS5	total
15.23											1
15.24											1
15.25											1
15.26											1
15.27											1
15.28											1
15.29											1
15.30											1
15.31											1
15.32											1
15.33											1
15.34											1
15.35											1
15.36											1
15.37											1
15.38											1
15.39											1
15.40											1
15.41											1
15.42											1
15.43											1
15.44											1
15.45											1
15.46											1
15.47											1
15.48											1
15.49											1
15.50											1
15.51											1
15.52											1
15.53											1
15.54											1
15.55											1
15.56											1
15.57											1
15.58											1
15.59											1
15.60											1
15.61											1
15.62											1
15.63											1
15.64											1
15.65											1
15.66											1
15.67											1
15.68											1
15.69											1
15.70											1
15.71											1
15.72											1
15.73											1
15.74											1
15.75											1
15.76											1
15.77											1
15.78											1
15.79											1
15.80											1
15.81											1
15.82											1
15.83											1
15.84											1
15.85											1
15.86											1
15.87											1
15.88											1
15.89											1
15.90											1
15.91											1
15.92											1
15.93											1
15.94											1
15.95											1
15.96											1
15.97											1
15.98											1
15.99											1
16.00											1
16.01											1
16.02											1
16.03											1
16.04											1
16.05											1
16.06											1
16.07											1
16.08											1
16.09											1
16.10											1
16.11											1
16.12											1
16.13											1
16.14											1
16.15											1
16.16											1
16.17											1
16.18											1
16.19											1
16.20											

【配列表】

2014176382000001.app