

厚生労働科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

SEREX法を用いた癌抗原単離と免疫応答  
解析による免疫療法開発の基盤的研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 河上裕

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所

平成 16 ( 2004 ) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

SEREX法を用いた癌抗原単離と免疫応答  
解析による免疫療法開発の基盤的研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

河上 裕 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

分担研究者

藤田知信 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

桜井敏晴 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

鈴木ゆり子 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

塚本真 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

住本秀敏 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門

# 目 次

## I. 総括研究報告

SEREX 法を用いた癌抗原単離と免疫応答解析による免疫療法開発の 基盤的研究に関する研究 河上裕	1
--	---

## II. 分担研究報告

同一施設にてそれぞれの課題に関与しているため、分担研究報告書に代えてその  
内容を報告する (藤田知信・桜井敏晴・鈴木ゆり子・塚本真・住本秀敏)

1. SEREX 法による腎癌抗原の単離と解析	11
2. SEREX 法による膀胱癌抗原の単離と解析	29
3. SEREX 法による脳腫瘍抗原の単離と解析	56
4. SEREX 法による子宮体癌抗原の単離と解析	76
5. 子宮体癌移植免疫不全 (SCID) マウス血清を用いた SEREX による子宮体癌 抗原の単離	96

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	115
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	116
-----------------	-----

厚生労働科学研究研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

総括研究報告書

SEREX 法を用いた癌抗原単離と免疫応答解析による免疫療法開発の基盤的研究

主任研究者 河上 裕 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所・教授

\*\*\*\*\*研究要旨\*\*\*\*\*

新しい治療として免疫療法が期待されているが、科学的な開発のためにはヒト癌抗原を同定することが重要である。本研究では、一年目は患者血清を用いた SEREX により、腎癌抗原 PARG1、膀胱癌抗原 KU-BL-3、また、ヒト子宮体癌組織移植免疫不全マウス血清を用いた改良 SEREX 法を試み、癌に高発現する MCM2 を単離した。本年度は、PARG1 の組換え蛋白を作製し、Western blot 法と ELISA 法で腎癌患者において高率に血清抗体が検出できることを明らかにし、診断への応用の可能性を示した。KU-BL-3 は胎児細胞と癌細胞に特異的に発現する新規 galectin であることを証明し、腫瘍マーカーとなる可能性を示した。また、新たに、膀胱癌、脳腫瘍、子宮体癌患者血清を用いた SEREX により、膀胱癌抗原 KU-BL-1 と KU-BL-2、脳腫瘍抗原 SOX6、子宮体癌抗原 CAGE を単離し、それぞれ診断や免疫療法への臨床応用の可能性を示した。KU-BL-2 は in vitro T 細胞誘導法により、日本人に多い HLA-A24 拘束性膀胱癌反応性 CTL を誘導できる T 細胞エピトープを同定し、免疫療法の標的と成り得ることを証明した。癌精巢抗原 CAGE に対する抗体は、MSI 陽性患者に有意に検出され、MSI 陽性癌の診断への応用が考えられた。また、子宮体癌移植免疫不全マウス血清を用いた SEREX 法により、新たに子宮体癌抗原 KU-EM-2 を単離した。KU-EM-2 は各種癌で高発現する膜蛋白であり、抗体療法も含めた免疫療法の標的になり得る。以上、本研究では SEREX 法を用いて 8 種の新規癌抗原を同定した。またヒト腫瘍移植 SCID マウス血清を用いた SEREX 法により効率的に癌抗原単離ができる可能性を示した。これらの癌抗原は、腫瘍マーカーとして診断への利用、T 細胞認識抗原として免疫療法の標的として利用できる。

\*\*\*\*\*

分担研究者

藤田知信 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手

桜井敏晴 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手

松崎ゆり子 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手

塚本真 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手

住本秀敏 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手

#### A. 研究目的

癌の免疫療法は、長年、第4の治療法の候補として期待されてきたが、未だ一部の癌を除いては標準的治療として確立されていない。その原因の一つとして、ヒト癌に対する免疫応答の解析ができないことから、科学的な免疫療法の改良が困難であったためと考えられる。科学的根拠の明らかな免疫療法の開発を行うためには、まず癌抗原を同定し、同定癌抗原を用いた抗腫瘍免疫応答の詳細な解析を行い、腫瘍の免疫からのエスケープ機構を解明し、これら研究結果に基づいた効果的な免疫制御法の開発を行い、臨床試験を施行し臨床的評価をする必要がある。本研究では、様々な癌患者血清を用いて、cDNA発現クローニング法(SEREX ; serological identification of tumor

antigens by cDNA expression cloning)により、癌患者 IgG 抗体が認識するヒト癌抗原を同定し、同定癌抗原に対する抗腫瘍免疫応答の解析を行い、免疫療法の科学的開発の基盤を築き、その可能性を追究することを目的とする。また、従来の SEREX 法だけでなく、免疫療法で効果のみられた患者血清の使用や、免疫不全 SCID マウスに腫瘍組織や所属リンパ節を移植して、癌病巣近辺に集積した B 細胞の産生するヒト IgG 抗体を含むマウス血清を使用することにより、効率よく有用な癌抗原の単離を行う SEREX 法の改良を試みる。このようにして単離した癌抗原は、免疫療法の標的抗原として用いるだけでなく、それを用いた抗腫瘍免疫応答のモニターによる免疫療法の科学的開発を可能にする。また、単離癌抗原は、腫瘍マーカーとして、癌の診断に有用である可能性があり、新しい癌の診断法の開発も試みる。

#### B. 研究方法

PARG1 の組換えタンパクを作製し、癌患者血清中の IgG の存在を定性的に Western blot 法で確認し、さらに ELISA 法で定量的に測定した。KU-BL-3 が新規 galectin であることは in vitro で放射線ラベルしたタンパクを作製し、糖への結合能を測定する

ことにより行った。新たな癌抗原スクリーニングは、癌細胞や精巣細胞から作製したλファージ cDNA ライブラリーを、癌患者血清 IgG 抗体を用いたスクリーニングにより単離する SEREX 法により行った。膀胱癌の場合は、手術時に得た癌細胞より樹立した FY 細胞株より作製した cDNA ライブラリーを、自家の患者血清でスクリーニングした。脳腫瘍の場合は、正常精巣より作製した cDNA ライブラリーを、グリオーマ患者血清でスクリーニングした。子宮体癌の場合は 3 種の子宮体癌細胞株より作製した cDNA ライブラリーを子宮体癌患者血清でスクリーニングした。ファージライブラリーを大腸菌に感染させ、タンパクを大腸菌上に産生させ、ニトロセルロース膜に転写した後、癌患者血清と反応させ、血清中の IgG 抗体が認識するクローンを単離した。クローンを単一化した後、塩基配列を決定し、遺伝子データベースとのホモロジー検索により、単離癌抗原を同定した。同定癌抗原の発現特異性を RT-PCR 法やノーザン法で検討し、各種癌患者血清および健常人血清における対応抗原に対する IgG 抗体を測定することにより、癌細胞に選択的に発現して、癌患者に免疫応答を起こす抗原を選択した。

腫瘍組織局所の B 細胞が産生する

抗体による SEREX 法の有用性を確認するために 4 匹の免疫不全マウス (SCID) の左右背側に 1 つずつ計 2 個のヒト子宮体癌組織片を皮下移植しヒト IgG を産生させた。マウス血中ヒト IgG 抗体・マウス IgG 抗体価を EIA 法で 1-6 週の間測定し、6 週目に全採血により血清を調製し、cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会にて、「特異的癌抗原を用いる免疫療法のための癌抗原同定」として承認され、試料はヘルシンキ宣言に従って患者の自由意思の下に、文章による承諾を得て提供された。慶應義塾大学医学部動物実験委員会によって、動物実験計画が動物福祉の精神に則った適正な計画であることが承認されている。

### C. 研究結果

昨年度、腎癌細胞株 cDNA ライブラリーの腎癌患者血清によるスクリーニングを行い、腎癌抗原 PARG1 遺伝子を同定した。PARG1 は GTPase 活性化タンパク、RhoGAP をコードしており、細胞運動や増殖の制御に関与する small G protein、RhoA を不活性

化することが報告されている。単離した PARG1 のファージクローンを用いて、PARG1 に対する血清中 IgG 抗体が腎癌で存在し、大腸癌、食道癌、膵臓癌、メラノーマ、脳腫瘍、子宮体癌、膀胱癌、および、健常人では 1 例も検出されないことを、RT-PCR 法とノーザンブロット法によって遺伝子は、腎癌、乳癌の細胞株で高発現していることを報告した。今年度は、PARG1 の発現や血清中の抗 PARG1 抗体についてさらに研究を行ないその臨床応用の可能性を検討した。多検体の腎癌組織と腎癌細胞株で PARG1 遺伝子の発現を解析したところ、11 検体中 10 検体の腎癌組織、11 株中 10 株の腎癌細胞に発現していた。また PARG1 の中央部分、約 300 アミノ酸からなる大腸菌組換えタンパクを複製し、腎癌患者血清を一次抗体とした Western blot 法を行ったところ、高率(14/35 検体、40%)に血清 IgG 抗体が検出された。ELISA 法で同じ PARG1 組換えタンパクに対する血清中の IgG 抗体価を測定し、健常人血清の基準値(平均値+2SD)よりも高い抗体価を持つ腎癌患者血清が高率(13/24 検体、54%)で存在することを明らかにした。以上の結果から、腎癌抗原として単離した PARG1 は、腎癌マーカー、あるいは、免疫療法の標的抗原として臨床応用できる可能

性が示された。

昨年度、膀胱癌の診断、治療に応用可能な膀胱癌抗原の SEREX 法による単離を試み、KU-BL-3 を同定した。KU-BL-3 は galectin-9 に高い相同性を示す新しい遺伝子であった。RT-PCR 法で KU-BL-3 の発現は、正常組織では認められず、膀胱癌、腎癌、前立腺癌、食道癌で発現を認めたことから癌特異的抗原と考えられた。今年度、KU-BL-3 が 2 つの carbohydrate-recognition domains (CRDs) をもつタンデムリピートタイプの新規 galectin であることを *in vitro* トランスレーションにより放射線ラベルした KU-BL-3 タンパクを合成し、ラクトースに対する結合能を検討することにより証明した。KU-BL-3 は、既知の galectin と異なり、様々な癌種に腫瘍特異的に発現し、IgG 抗体反応が認められることから、各種癌の診断や免疫療法の標的抗原として臨床応用できる可能性がある。また自家の血清と膀胱癌ライブラリーを用いて SEREX を行い KU-BL-1 と KU-BL-2 を同定した。KU-BL-1 は膀胱癌で高発現し、膀胱癌患者で血清特異抗体が 28 例中 2 例に認められたが、健常人 30 例には認めなかった。KU-BL-2 の mRNA は正常膀胱組織では発現が認められないが 12 例全ての膀胱癌組

織で発現しており、血清抗体は膀胱癌患者 28 例中 8 例で認められたが、健常人 16 例では認められなかった。また、KU-BL-2 の合成ペプチドを用いて、末梢血単核球を刺激し、HLA-A24 拘束性で膀胱癌を認識する T 細胞の誘導を行い、CD8+T 細胞の標的抗原にもなることを明らかにした。

脳腫瘍抗原を同定するために正常精巢から作製した cDNA ライブラリーとグリオーマ患者血清を用いて SEREX 法を行った。同定抗原の中で一番多く単離された SOX6 に注目した。SOX6 は Sry-related high -mobility group (HMG) box-containing 遺伝子で、発達中の中樞神経系とマウス初期胚の軟骨形成期に特異的に発現している転写因子として知られている。SOX6 に対する血清中の IgG 抗体は 36 例中 12 例のグリオーマ患者に認められるが、14 例の他の脳疾患患者には認められなかった。他の癌患者では 54 例中 1 例に、37 例の健常人では 1 例を除いて検出されなかった。Western blot 法と ELISA 法によりグリオーマ患者血清中の IgG 抗体は SOX6 の DNA 結合領域である HMG box を主に認識していると考えられた。RT-PCR とノーザンブロットによると精巢を除く成人組織よりグリオーマで高い発現が認められた。Western blot により、

SOX6 の発現は成人正常脳には認められず、グリオーマ組織で認められた。免疫染色により SOX6 の発現を解析すると、全てのグリオーマ組織で発現していたが、腫瘍部でない皮質で少量の SOX6 陽性の細胞が観察された。これらの結果は、SOX6 がグリオーマで発現しており、かつ抗体がグリオーマ患者で認められることを示している。

ヒト子宮体癌由来細胞株を用いて cDNA ライブラリーを作製し、7 検体の子宮体癌患者血清を用いて約 500 万クローンをスクリーニングしたところ、193 個の陽性クローンを単離した。これらは 60 種の遺伝子からなっており、その中の KU-EM-1 (CAGE) に注目した。CAGE は X 染色体に位置する癌精巢抗原で、Northern blot 法では正常組織の精巢にのみ発現が認められた。RT-PCR 法では正常組織では精巢に、癌細胞では 3 例中 2 例の子宮体癌細胞株、7 例中 4 例のメラノーマ、3 例中 1 例の肺癌、4 例中 2 例の腎癌で発現が認められた。CAGE に対する血清中 IgG 抗体の存在を、組換えタンパクを作製し Western blot 法により検討したところ、40 名の健常人血清には認められなかったが、45 名中 5 名の子宮体癌患者、24 名中 2 名のメラノーマ、32 名中 2 名の大腸癌で



も検出された。CAGE に対するウサギ抗体を作製し、細胞で CAGE がタンパクとして存在しているかを確認したところ、子宮体癌細胞株 (Ishikawa、Hec-Ib) とメラノーマ細胞株 (888mel) に発現が認められた。CAGE に対する血清中の IgG 抗体を、ELISA 法により定量的に測定したところ、子宮体癌患者 5 名、メラノーマ患者 2 名、大腸癌患者 2 名で高値を示した。これら高値を示した患者は Western blot 法で検出された患者と一致した。また健常人と子宮体癌患者の抗体価を比較すると子宮体癌患者で有意な上昇が認められた。子宮体癌と MSI は関連することが報告されていることから、子宮体癌で MSI の有無で抗体価を調べてみると、13 例中 7 例の MSI を持つ患者血清で抗 CAGE 抗体高値が認められたが、MSI 高値でない血清では 1 例も認められなかった。また、大腸癌でも高値なものは MSI 陽性であった。

癌抗原を同定する有力な方法として SEREX 法が用いられているが、この方法は自己抗原の同定法を改良したものであることから、多くの自己抗原も同定され、その後の癌抗原の同定は簡単ではない。昨年度、患者血清にかえて腫瘍移植 SCID マウス血清を用いた SEREX 法を行ない、腫瘍

抗原が効率的に同定できる可能性を示した。本年度は引き続き子宮体癌でスクリーニングを行い、その有効性の確認を行った。50 万クローンをスクリーニングして 45 個の陽性クローンを得、塩基配列を決定したところ 15 種の遺伝子を同定した。このうち Chromosome11q13 に位置する KU-EM-2 遺伝子に注目した。RT-PCR 法にて KU-EM-2 遺伝子の各組織正常細胞および各種癌細胞における mRNA レベルでの発現を検討したところ、正常組織では精巣組織に高発現しており各種癌細胞株 26 例中 24 例に発現を認めた。子宮体癌患者や他臓器癌患者で、抗体保有の有無をフェージ法・WESTERN BLOT 法を用いて検討した。前者では子宮体癌患者 20 例中 8 例に健常人では 24 例中 3 例に直腸癌患者で 20 例中 6 例に悪性黒色腫患者で 20 例中 6 例に抗体を検出した。組換えタンパクを用いた Western blot 法では KU-EM-2 に対する抗体を子宮体癌患者 40 例中 6 例で検出した。以上の結果から、腫瘍移植 SCID マウス血清中に免疫原性の高い抗原を認識するヒト型抗体が選択的に産生されることにより、効率的な癌抗原のスクリーニングが行われることが再現された。

#### D. 考察

1) 腎癌抗原：昨年同定した腎癌抗原 PARG1 の組換え蛋白を作製し、癌患者血清中に IgG 抗体が存在するかを Western blot 法で調べたところ、腎癌患者に高率(14/35, 40%)に血清 IgG 抗体が検出された。ELISA 法によりその抗体価を定量的に検討したところ、健常人と比較して腎癌患者(13/24, 54%)に高い抗体価を認めた。今後、抗体量と腎癌との関連を詳細に調べ、腎癌マーカーとして早期・病期・予後診断への臨床応用の可能性を検討する必要がある。また PARG1 は GTPase 活性化タンパク、RhoGAP をコードしており、細胞運動や増殖の制御に関与する small G protein、RhoA を不活性化することから、腎癌細胞の浸潤転移に関与する可能性があり、腎癌浸潤転移機構の解明に寄与すると考えられる。

2) 膀胱癌抗原：昨年同定した KU-BL-3 は糖結合性をもつ新規 galectin であることを証明した。これまでに報告されている 14 種の galectin で癌との関連性が検討されているが、いずれも正常組織に発現が認められることから、免疫療法の標的分子としては適切ではなく、また腫瘍マーカーとしてもその適応に制限があると考えられる。KU-BL-3 はその発現が癌特異的であることから、免疫療法

の標的としてだけでなく腫瘍マーカーとしても有用な可能性がある。新たに単離した KU-BL-1 と KU-BL2 は膀胱癌に高発現し、血清抗体がそれぞれ 2/28, 8/28 例に検出された。KU-BL-2 合成ペプチドを用いて、末梢血から膀胱癌反応性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導でき、免疫療法の標的となることが示されたことから臨床応用の可能性についての検討が必要である。また KU-BL-1-3 はいずれも患者血清中の IgG を用いる SEREX 法で単離されたことから、ヘルパー抗原として使用できる可能性があり、CD4 を用いた CD8 の活性化による免疫療法免疫療法に有効と考えられる。

3) 脳腫瘍抗原：グリオーマ患者血清を用いた SEREX で単離した転写因子 SOX6 は、多くのグリオーマに高発現し、成人脳ではほとんど発現が認められず、約 30%(12/36)のグリオーマ患者血清中に抗体が検出されたことから、今後グリオーマの診断や免疫療法の標的として使用できる可能性が考えられ、臨床応用の可能性を検討する必要がある。

4) 子宮体癌抗原：子宮体癌患者血清を用いた SEREX で、多くの子宮体癌(7/10)に発現する癌精巢抗原 CAGE を単離した。組換え蛋白を用いた Western blot により子宮体癌 (3/41) に血清抗体が検出され、ELISA 法で

は MSI(microsatellite instability)+の患者 13 例中 7 例に抗体が検出されたが、MSS18 例では検出されないことから、MSI 陽性癌との相関が認められた。癌精巣抗原 CAGE は免疫療法の標的抗原としての臨床応用だけでなく、MSI 陽性子宮癌に有意に抗体が認められたことから、大腸癌などの他の MSI 陽性癌についても検討を行い、MSI の診断への応用の可能性を検討する必要がある。

5) 癌浸潤 B 細胞が産生するヒト IgG 抗体を含む SCID マウス血清を用いた SEREX により、KU-EM-2 を単離した。昨年度はこの方法により MCM2 を単離し、今年度の検討により、この改良法により効率的な癌抗原の単離が可能ながことが検証できた。KU-EM-2 は各種癌で高発現する膜タンパクであることから、細胞療法の標的となるだけでなく、抗体療法も可能と考えられる。また液性と細胞性免疫を組み合わせ合わせた療法の可能性について検討を行う必要がある。

#### E. 結論

1. 腎癌抗原として単離した PARG1 は、血清中抗 PARG1 抗体が健常人と比較して腎癌において高値を示したことから、腎癌マーカーとして診断に応用できる可能性が示唆された。また、PARG1 は Rho を介して腎癌の浸潤転移に関与する可能性があり、腎癌浸

潤転移機構の解明に役立つ可能性がある。

2. 膀胱癌抗原として単離した KU-BL-3 は新規 galectin であり、様々な癌種で癌特異的発現を示すことから、免疫療法の標的抗原としてだけでなく、腫瘍マーカーとして、癌の診断にも有用である可能性が示唆された。新たに単離した KU-BL-1 と KU-BL2 は膀胱癌に高発現し、血清抗体高頻度に検出されるた。KU-BL-2 合成ペプチドを用いて、末梢血から膀胱癌反応性細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導でき、免疫療法の標的として臨床応用の可能性ある。

3. グリオーマ抗原として転写因子 SOX6 を単離した。グリオーマに高発現し、成人脳ではほとんど発現が認められず、約 30 のグリオーマ患者に血清抗体が検出されたことから、診断へ応用できる可能性があるばかりでなく、免疫療法の標的になり得ることが明らかになった。

4. 子宮体癌から癌精巣抗原 CAGE を単離した。血清中の CAGE に対する抗体が MSI 陽性子宮癌に有意に認められたことから MSI 陽性癌診断への応用の可能性を検討する。また免疫療法の標的抗原の可能性を検討する。

5. ヒト腫瘍（子宮体癌）移植 SCID マウス血清を用いた SEREX 法により、KU-EM-2 を単離した。KU-EM-2 は各種癌で高発現する膜タンパクであることから、抗体療法も含めた免疫療法の標的になり得ることから、その臨床応用の可能性を検討する。MCM2、KU-EM-2 を単離したことから、腫瘍移植 SCID マウス血清を用いる SEREX 法により効率よく癌抗原単離できることが示された。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ito K, Fujita T, Akada M, Kiniwa Y, Tsukamoto M, Yamamoto A, Matsuzaki Y, Matsushita M, Asano T, Nakamura J, Tachibana M, Hayakawa M, Ikeda H, Murai M and Kawakami Y. Identification of novel bladder cancer antigen, human lipoic acid synthetase, recognized by antibodies in serum of a patient with metastatic bladder cancer.

Int J Cancer. 108:712-724,2004.

Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, and Toda M. Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera.

Oncogene,22(55):8823-8834,2004.

Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, and Toda M. Expression of a transcriptional factor, SOX6, in human gliomas. Brain Tumor Pathology. in press.

河上裕：樹状細胞腫瘍内投与による免疫療法：医学のあゆみ：208（7）：634，2004

木村康子、河上裕：新規腫瘍抗原同定法：血液・免疫・腫瘍：9（1）：41-44，2004

河上裕：悪性腫瘍に対する細胞免疫療法：臨床血液：44（6）：358-367，2003

松崎ゆり子、河上裕：皮膚がんのジェネティクス：臨床遺伝子学：最新医学 58：287-294，2003

河上裕：癌のワクチン療法（特集：癌の免疫学—癌免疫療法の理論と臨床—）：呼吸 22（12）：1207-1212，2003.

##### 2. 学会発表

第7回基盤的癌免疫研究会総会：平成15年7月17-18日：岡山：松崎ゆり子、河上裕「腎癌患者血清 Ig G抗体が認識する腫瘍抗原 PART 1 の解析」

第 23 回札幌がんセミナー国際シンポジウム：平成 15 年 7 月 31 日-8 月 1 日：札幌：河上裕：「Identification of human tumor antigens using various genetic and immunological methods.」

第 62 回日本癌学会：平成 15 年 9 月 25 日-27 日：名古屋：河上裕「樹状細胞の腫瘍内投与による免疫療法」（シンポジウム）

第 34 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム：平成 15 年 11 月 11 日-14 日：東京：河上裕：「Identification of human tumor antigens for immunotherapy with various immunological and genetical methods」

第 3 回難治性免疫疾患先端治療開発研究会：平成 15 年 12 月 6 日：東京：河上裕：「ヒト腫瘍抗原の同定と免疫療法の開発」

第 33 回日本免疫学会総会・学術集会：平成 15 年 12 月 8-10 日：福岡：岩田卓、藤田知信、平尾薫丸、岡田勉、松崎ゆり子、桜井敏晴、野澤志郎、

河上裕「子宮体部原発癌肉腫移植 SCID マウス血清を用いた SEREX」

第 18 回 Transfusion Medicine Conference 葉山市国際交流センター細胞療法講演：平成 16 年 1 月 24 日：河上裕：「悪性腫瘍に対する T 細胞と樹状細胞を用いた細胞療法」

第 1 回日本癌学会カンファレンス「癌の免疫的制御一次世代癌治療の創生を目指して」平成 16 年 2 月 26-28 日：蓼科：藤田知信：包括的抗原検査

泌尿器科分子・細胞研究会：平成 16 年 2 月 27 日：東京：河上裕「癌抗原の同定と新しい免疫療法の開発」

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 2-1 SEREX 法による腎癌抗原の単離と解析

### 要旨

昨年度、腎癌細胞株 cDNA ライブラリーの腎癌患者血清によるスクリーニングを行い、腎癌抗原 PARG1 遺伝子を同定した。PARG1 は GTPase 活性化タンパク、RhoGAP をコードしており、細胞運動や増殖の制御に関与する small G protein、RhoA を不活性化することが報告されている。単離した PARG1 のファージクローンを用いて、PARG1 に対する血清中 IgG 抗体の存在を、腎癌、大腸癌、食道癌、膵臓癌、メラノーマ、脳腫瘍、子宮体癌、膀胱癌、および、健常人血清で調べ、腎癌でのみ IgG 抗体が存在した（14 例中 5 例）が、健常人血清 50 検体とその他の癌 97 検体では 1 例も検出されないことを報告した。また RT-PCR 法とノーザンブロット法によって PARG1 遺伝子は、腎癌、乳癌の細胞株では高発現していることを報告した。

今年度は、PARG1 の発現や血清中の抗 PARG1 抗体についてさらに研究を行ない、その臨床応用の可能性を検討した。多検体の腎癌組織と腎癌細胞株で PARG1 遺伝子の発現を解析したところ、11 検体中 10 検体の腎癌組織、11 株中 10 株の腎癌細胞に発現していた。また PARG1 の中央部分、約 300 アミノ酸からなる大腸菌組換えタンパクを作製し、腎癌患者血清を一次抗体としたウェスタンブロット法を行ったところ、高率(14/35 検体、40%)に血清 IgG 抗体が検出された。ELISA 法で同じ PARG1 組換えタンパクに対する血清中の IgG 抗体価を測定し、健常人血清の基準値(平均値+2SD)よりも高い抗体価を持つ腎癌患者血清が高率(13/24 検体、54%)で存在することを明らかにした。以上の結果から、腎癌抗原として単離した PARG1 は、腎癌マーカー、あるいは、免疫療法の標的抗原として臨床応用できる可能性が示された。

## はじめに

腎細胞癌の治療法としては現在外科的腎摘除以外に有効な方法がなく、しかも外科的腎摘除で治癒が期待できるのは進展度の低い症例である。化学療法は有効でなく、放射線療法は免疫療法との併用で効果が報告されているが確立されていない。しかし、IL-2 や IFN- $\gamma$  投与の免疫療法で 2 割程度の効果が報告され、免疫療法の改良が期待されている。1991 年 Boon らがメラノーマから T 細胞が認識する癌抗原 MAGE1 を同定し(1)、それにより、免疫療法の科学的開発が可能になった。本研究の主任研究者である河上らはメラノーマ抗原、MART-1, gp100, tyrosinase などを単離し、その T 細胞エピトープペプチドを同定した。さらに米国における改変 gp100 ペプチド免疫の第 1 相臨床試験では、進行メラノーマ患者に対して 42%の奏功率を認めている。

今までに腎癌細胞反応性 CD8<sup>+</sup>T 細胞が認識する抗原として、RAGE-1 (2)、変異 HLA-A2(3)、変異 hsp70-2(4)、RU2 のアンチセンス産物(5)の 4 種類が単離同定されている。RAGE-1、変異 HLA-A2 は多くの腎癌細胞に共通に発現している抗原ではないため、免疫療法への使用は難しい。他の 2 つの免疫療法への応用に関してはまだ不明である。したがって、腎癌に対する免疫療法開発のためには、新たな腎癌抗原を単離する必要がある。

癌抗原の単離法の一つとして、1995 年、Pfreundschuh は、癌患者自己血清を用いて癌組織から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法 (SEREX: serological analysis of recombinant cDNA expression libraries)を開発し、IgG 抗体で認識される癌抗原を単離した(6)。IgG 抗体の存在は、同じ抗原に対する CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化を意味し、SEREX で単離した抗原は CD4<sup>+</sup>T 細胞の標的抗原になると考えられる。さらに、SEREX 同定メラノーマ抗原 MAGE-1、tyrosinase、食道癌抗原 ESO-1 は、CD8<sup>+</sup>T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法で以前に単離されており、SEREX 法により、CD8<sup>+</sup>T 細胞認識癌抗原も単離できることが判明した。(7-9)。近年腎癌においても、SEREX 法により、SCP1(10)、carbonic anhydrase XII(11)、HERV-K10(12)が単離されたが、まだ、その臨床応用の可能性は十分に検討されていない。本研究では、SEREX 法を用いて、腎癌における免疫療法の標的抗原、あるいは、診断に応用可能な新規抗原として PARG1

を単離し、その免疫原性の検討を試みた。



## 研究対象とする検体および研究方法

### 解析した組織、細胞株と血清

用いた細胞株は以下のとおりである。腎癌細胞株：RCC6、RCC7、RCC8、SW839、A498、Ca192、769p、Caki、786-0、ACHN、KU1920。実験に用いられた組織検体は、腎癌組織 11 検体、悪性黒色腫組織 5 検体、大腸癌組織 5 検体である。実験に用いられた血清検体は以下のとおりである。腎癌患者血清 14 検体、健常人血清 50 検体、大腸癌患者血清 17 検体、食道癌患者血清 10 検体、膵臓癌患者血清 4 検体、脳腫瘍患者血清 20 検体、子宮体癌患者血清 14 検体、膀胱癌患者血清 12 検体、悪性黒色腫患者血清 20 検体、卵巣癌患者血清 9 検体。

### PCR プライマーと条件

PARG1 の特異的発現確認 PCR は、次のプライマー PARG1-SP-sence (5'-GGGCATCAGGTCAACTCTCTAC-3')、PARG1-SP-antisence (5'-CCAAGTAGAGGCTGCACAAA-3')、で、94°C 1分、58°C 1分、72°C 2分、30 サイクル。GAPD の発現確認 PCR は次のプライマー GAPD-sence (5'-GTCAACGGATTTGGTCGTATT-3')、GAPD-antisence (5'-ATCACTGCCACCCAGAA GACT-3')で、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分、25 サイクルで行った。

### 大腸菌組換え PARG1 タンパクの作製

PARG1 cDNA の中央部分の制限酵素 BglII で囲まれた約 300 アミノ酸からなる領域を、マルチクローニング部位の一部改変した大腸菌発現ベクター pET16K の BamHI 部位に挿入した組換えプラスミド PARG1#7 を作製した。組換え体が導入された宿主大腸菌 AD494(DE3)で組換えタンパクの発現を IPTG で誘導し、2 時間後に集菌し、PAGE sample buffer に懸濁した溶液を大腸菌組換え PARG1 タンパク (PARG1 #7 タンパク) 溶液とし、電気泳動に用いた。

## 腎癌抗原 PARG1 に対する血清 IgG 抗体のウエスタンブロット法による検出

電気泳動後、ゲル上の PARG1#7 タンパクをニトロセルロース膜に転写し、TBST (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20)に 5 % skim milk を加えた溶液でブロッキングを行った。転写膜に大腸菌抽出液で吸収した 100 倍希釈の血清を 4 °Cで一晩反応させた。TBST で 3 回洗浄後、3000 倍希釈したビオチン標識抗ヒト Fc $\gamma$  IgG 抗体を室温で 30 分反応させ、さらに TBST で 3 回洗浄、3000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識アビジンを室温で 30 分反応させ、TBST で 3 回洗浄、その後 nitroblue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolil-phosphate で発色させた。

## 腎癌抗原 PARG1 に対する血清 IgG 抗体の ELISA 法による定量

PARG1#7 タンパクを 2  $\mu$ g/ml の濃度で 10mM CAPS(pH 11.0)バッファーに溶解し、96 ウェルイムノプレートに 100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 2 時間放置しコーティングした。PBS(NaCl 137mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KCl 2.68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.147 mM) に 1 % BSA を加えた溶液(1%BSA-PBS)で、室温、2 時間のブロッキングを行った後、PBS に 0.05 % Tween 20 を加えた溶液(0.05%T20-PBS)でプレートを 3 回洗浄した。1%BSA-PBS で 100 倍および 300 倍希釈した血清検体を、100  $\mu$ l/ウェルで加え一晩 4°Cで放置。0.05%T20-PBS でプレートを 3 回洗浄し、1%BSA-PBS で 4000 倍希釈した抗ヒト IgG-HRPO を 100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 30 分反応させた。0.05%T20-PBS でプレートを 3 回洗浄した後、基質 (Tetramethylbenzidine Free Base Tablet, SIGMA T-5525)タブレットを 1 錠/1 ml DMSO で溶解し、基質バッファー(SIGMA, P-4922) 9 ml を加えて作製した溶液を、100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 45 分反応させた。1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて反応を停止し、450 nm と 570 nm の二波長で吸光度を測定した。

## 結果

### 腎癌抗原 PARG1 遺伝子の組織特異的発現性

昨年度、既に PARG1 遺伝子の発現について正常組織 8 種、正常培養細胞 4 種、腎癌細胞株 3 種を含む 28 の癌細胞株を用いて RT-PCR 解析を行い腎癌と乳癌に高発現していることを明らかにした。今年度は多検体の腎癌組織と腎癌細胞株で PARG1 遺伝子の発現を解析した。その結果、11 検体中 10 検体の腎癌組織、11 株中 10 株の腎癌細胞株に PARG1 遺伝子は発現していた (図 1)。また、メラノーマ組織 5 検体中 2 検体、大腸癌組織 5 検体中 2 検体で PARG1 遺伝子は低発現していた。

### 腎癌抗原 PARG1 に対する IgG 抗体反応

昨年度、ファージ組換え PARG1 タンパクに対する IgG 抗体反応を腎癌患者、他の癌患者、および健常人血清で検討し解析したところ、腎癌患者のみ 14 検体中 5 検体で血清 IgG 抗体が検出されたことを報告した。今年度は、大腸菌組換え PARG1 タンパクを電気泳動してニトロセルロース膜に転写し、PARG1 に対する血清中 IgG 抗体反応についてウエスタンブロット法で検出を試みた。当初、1260 アミノ酸からなる PARG1 タンパクの全コード領域で大腸菌組換え体作製を試みたが、全長を含む PCR 産物を cDNA から得ることができず、次に分割した領域で大腸菌組換え体(PARG1 #1 - #7)作製を試みた。ヒスチジンタグを持つベクター pET16b で作製した組換えタンパクについて、タンパク粗抽出液を調製し、ベクター中のヒスチジンタグに対する抗体と腎癌患者血清で、組換え PARG1 タンパクの反応性を調べた(図 2)。カルボキシル末端側 750 アミノ酸を持つ組換えタンパク PARG1#6 は、ほとんどのタンパクが分解しており、解析に使うことはできなかった。カルボキシル末端側 250 アミノ酸を持つ組換えタンパク PARG1#3 は、ヒスチジンタグに対する抗体で 2 種の産物を検出した。しかし、腎癌 cDNA ライブラリーから PARG1 が同定された際に用いられた腎癌患者血清(serum#1)でこの産物が検出された以外は全く陽性血清が得られず、スクリーニングには用いなかった。中央部分約 400 アミノ酸を持つ組換え

タンパク PARG1#5 は、ヒスチジンタグに対する抗体で、予想される大きさの産物とそれ以外の数種の産物が検出された。血清でスクリーニングすると腎癌患者血清、健常人血清のほとんどで、非特異的と思われる IgG 抗体の存在が検出されたため、スクリーニングには適していないと考えた。PARG1 の中央部分、約 300 アミノ酸を持つ組換えタンパク PARG1#7 は、ヒスチジンタグに対する抗体で、予想される大きさの産物が主に検出された。血清でスクリーニングすると腎癌患者血清の数例で特異的と思われる IgG 抗体の存在が検出され、健常人血清では陽性血清は検出されなかったため、以降のスクリーニングに用いた。

腎癌患者血清 35 検体、悪性黒色腫患者血清 17 検体、前立腺癌患者血清 12 検体、膀胱癌患者血清 12 検体、子宮体癌患者血清 12 検体、大腸癌患者血清 7 検体、膵臓癌患者血清 7 検体、食道癌患者血清 12 検体、健常人血清 19 検体を用い、この PARG1#7 に対する血清中 IgG 抗体の存在を検討した(図 3-5)。その結果、腎癌患者血清 35 検体中 14 検体 (40 %)、健常人血清 19 検体中 2 検体(11 %)、悪性黒色腫患者血清 17 検体中 2 検体(12 %)、前立腺癌患者血清 12 検体中 3 検体(25 %)、子宮体癌患者血清 12 検体中 1 検体(8 %)、食道癌患者血清 12 検体中 1 検体(8 %)で IgG 抗体の存在が検出され、膀胱癌患者血清 12 検体、大腸癌患者血清 7 検体、膵臓癌患者血清 7 検体では、陽性血清は検出されなかった (表 1)。したがって、PARG1 は、腎癌特異的に免疫誘導を起こせる抗原として有用であると考えられる。

#### 腎癌抗原 PARG1 に対する血清 IgG 抗体の ELISA 法による定量

ELISA 法を用い、組換えタンパク PARG1#7 に対する血清 IgG 抗体の定量を行った。健常人血清 24 検体で得られた値 0.049 (平均値 0.021 + 2SD) よりも高い値を示した血清を陽性血清とした(図 6)。健常人血清 24 検体では陽性血清は検出されなかったが、腎癌患者血清では 24 検体中 13 検体 (54 %) が陽性であった。腎癌 cDNA ライブラリーから PARG1 が同定された際に用いられた腎癌患者血清(serum#1)は 24 検体中最も高い値(0.818)を示した。