

考察

昨年度、SEREX 法により腎癌抗原 PARG1 が単離されたことを報告した。PARG1 は、Protein-tyrosine Phosphatase、PTPL1 などの PDZ ドメインに結合する因子として報告されている遺伝子で(13)、RhoA タンパクに対する GTPase-活性を持つタンパク(RhoGAP)をコードしている。昨年度に報告した RT-PCR の結果に加え、本年度は多検体の腎癌組織、腎癌細胞株について RT-PCR を行った。その結果、PARG1 はほとんどの腎癌組織(91%)、腎癌細胞株(91%)に発現しており、メラノーマ組織、大腸癌組織では弱く発現していることから、特に腎癌で高発現していることが示唆された。

PARG1 タンパクは GTPase 活性化タンパク(GAP)ドメイン、システインの多い領域、*C. elegans* 遺伝子 ZK669.1a と相同性のある(ZPH)領域を持つ。今年度、血清中 IgG 抗体の検出に用いた大腸菌組換え PARG1 タンパク#7 は GTPase 活性化タンパク(GAP)ドメインを含むタンパクである。また、ELISA 法による血清 IgG 抗体の定量も同じ組換え PARG1 タンパクを用いた。ELISA 法で血清 IgG 抗体を定量したところ、腎癌患者血清では 24 検体中 13 検体は、健常人の平均値+ 2SD よりも高く、明らかな違いが見られた。傾向としてはウエスタンブロット法で明らかな抗体の存在が認識された血清では定量によっても高値を示した。しかし、現在までのところ PARG1 のアミノ末端部分を含む組換えタンパクを作製できておらず、PARG1 タンパクの免疫原性に関与している領域については、まだ特定したとはいえない。というのも、RT-PCR で解析した際、PARG1 は報告されている mRNA が 4 k ヌクレオチド以上の大きさであったので 5'側、中央部分、3'側の 3 対のプライマーを用いて、発現の特異性をそれぞれについて調べたが、その時、発現に特異性が見られたのは、5'側のプライマーを用いた PCR であった。今後、アミノ末端部分を含む組換えタンパクを作製し、検討する必要があると考えている。

癌が浸潤、転移していく過程で、上皮細胞の RhoA が高発現すると考えられており(14)、単純に考えると RhoA を不活性化する GAP 活性を持つ PARG1 が高発現することは、浸潤、転移を抑制する方向に働くということになる。しかし、PARG1 には GAP 活性ドメイン以外にもシステインの多い領域、ZPH 領域、

PDZ 結合ドメインを持ち、細胞の種類や環境によって異なる発現制御を受けること考えられる(15)。従って PARG1 が高発現することの意義を推論するのは、単純ではない。今後、腎癌や乳癌での PARG1 高発現による活性型 RhoA の減少との関係を検討する必要性や、腎癌や乳癌細胞で PARG1 遺伝子を RNAi などの手法で発現阻害をすることにより、細胞の浸潤能や転移能などの機能への影響を検討する必要性がある。

以上の結果から、本研究で腎癌抗原として同定した PARG1 は、免疫療法の CD4+T 細胞、さらに CD8+T 細胞の標的抗原として臨床応用できる可能性だけでなく、腎癌のマーカーとして有用である可能性や、腎癌細胞の転移機序の解明に役立つ分子として有用である可能性が示された。

文献

1. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.
2. Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., and Van den Eynde, B. J. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, 44: 323-330, 1996.
3. Brandle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., and Van den Eynde, B. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med*, 183: 2501-2508, 1996.
4. Gaudin, C., Kremer, F., Angevin, E., Scott, V., and Triebel, F. A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J Immunol*, 162: 1730-1738, 1999.
5. Van Den Eynde, B. J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., and Boon, T. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J Exp Med*, 190: 1793-1800, 1999.
6. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 3515-3519, 1994.
7. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 1914-1918, 1997.

8. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 11810-11813, 1995.
9. Jager, E., Jager, D., Karbach, J., Chen, Y. T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjatic, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L. J., and Knuth, A. Identification of NY-ESO-1 Epitopes Presented by Human Histocompatibility Antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and Recognized by CD4(+) T Lymphocytes of Patients with NY-ESO-1-expressing Melanoma. *J Exp Med*, *191*: 625-630, 2000.
10. Tureci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 5211-5216, 1998.
11. Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shah, G. N., Grubb, J. H., Pfreundschuh, M., and Sly, W. S. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 7608-7613, 1998.
12. Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Molecular Medicine Today* 342-349, 1997.
13. Saras, J., Franzen, P., Aspenstrom, P., Hellman, U., Gonez, L. J., and Heldin, C. H. A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1. *J Biol Chem*, *272*: 24333-24338, 1997.
14. Sahai, E. and Marshall, C. J. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*: 133-142, 2002.
15. Moon, S. Y. and Zheng, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, *13*: 13-22, 2003.

表 1. 大腸菌組換えPARG1に対するIgG抗体応答

	RCC	Healthy	Melanoma	Prostate	Bladder	Endometrial	Colon	Pancreas	Eso
+	14	2	2	3	0	1	0	0	1
-	21	17	17	9	12	11	7	7	11
total	35	19	17	12	12	12	7	7	12
positive(%)	40	11	12	25	0	8	0	0	8

図1. PARG1 はRCC細胞株とRCC組織で発現していた
(RT-PCR)

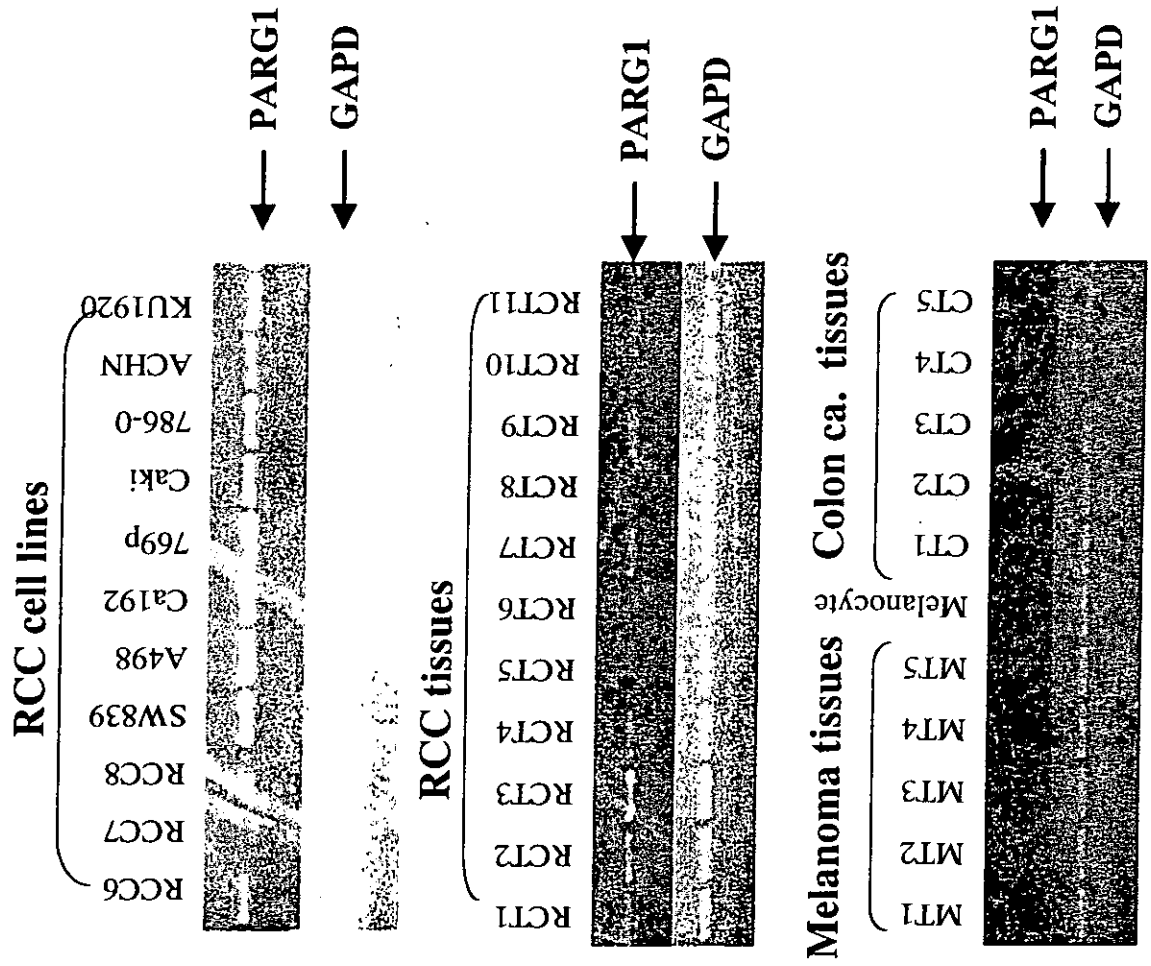


図2. 大腸菌組換えPARG1 タンパクの作製

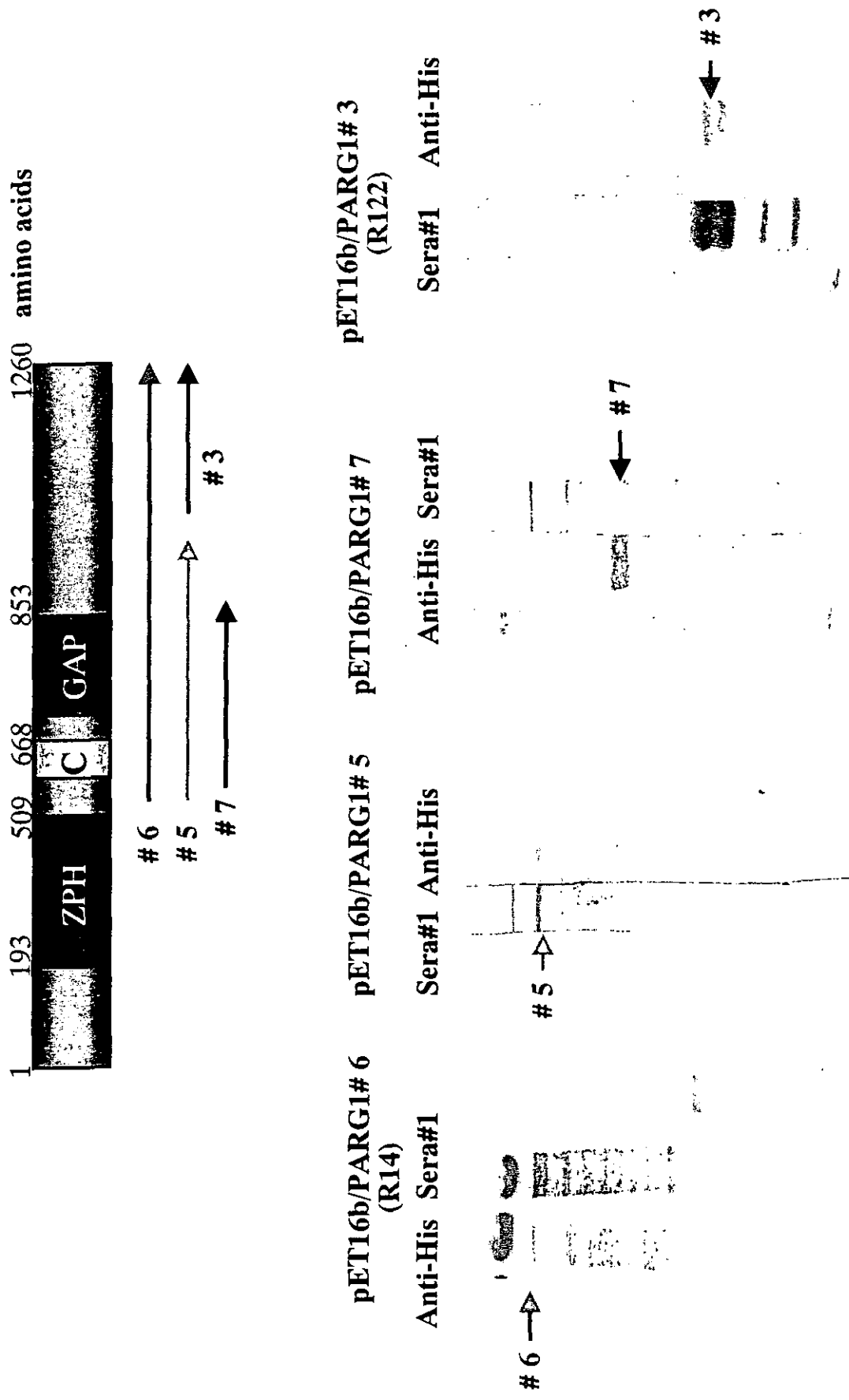


図3. 大腸菌組換えPARG1に対するIgG抗体反応(1)

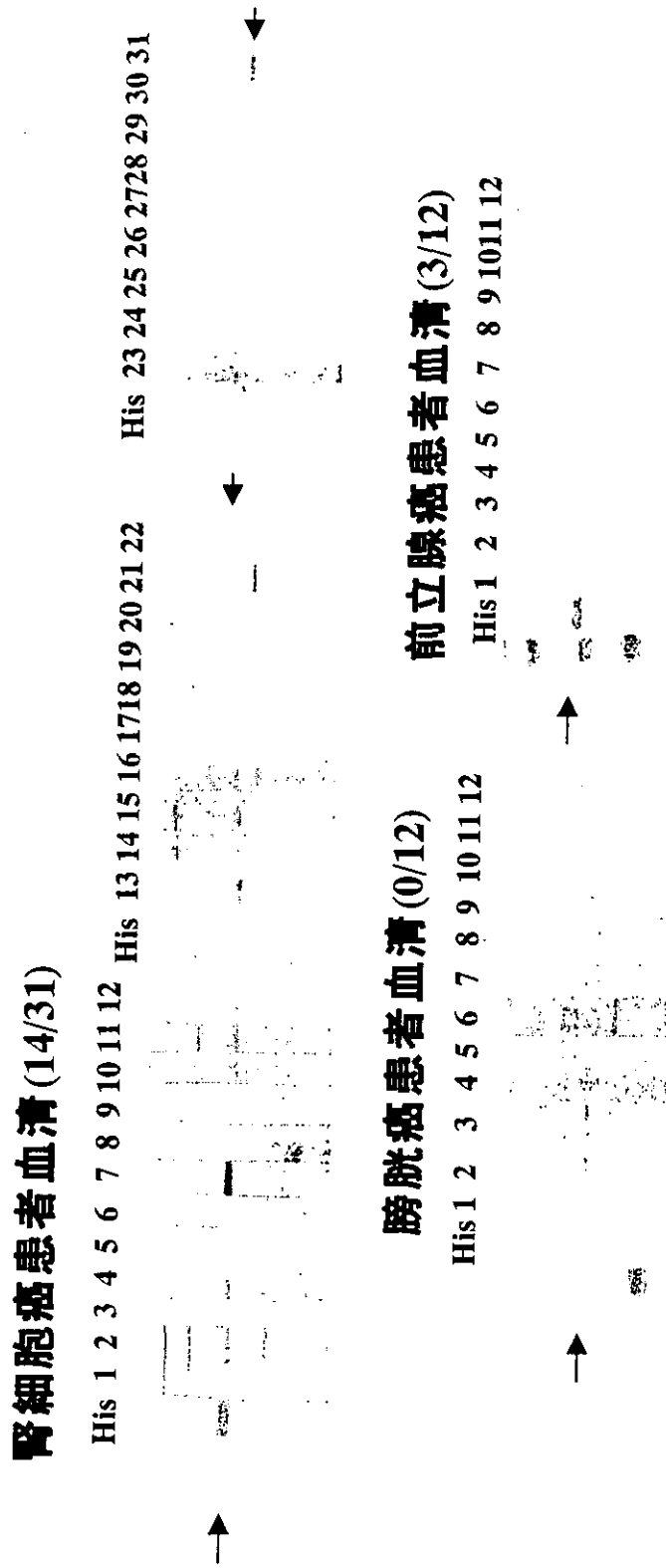


図4. 大腸菌組換えPARG1に対するIgG抗体反応(2)

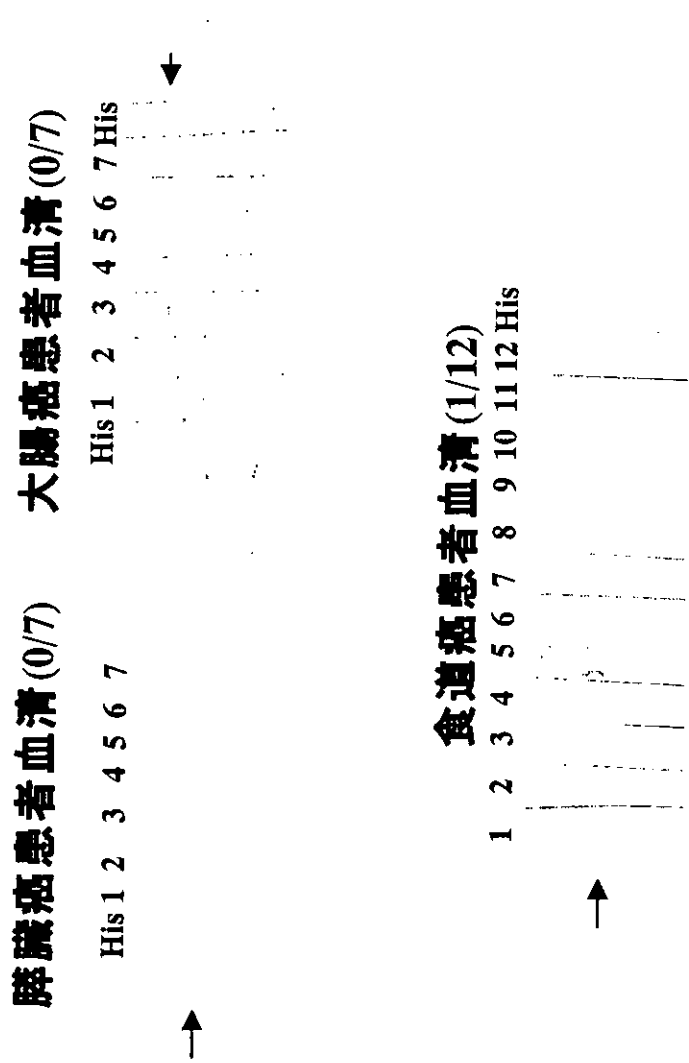


図5. 大腸菌組換えPARG1に対するIgG抗体反応(3)

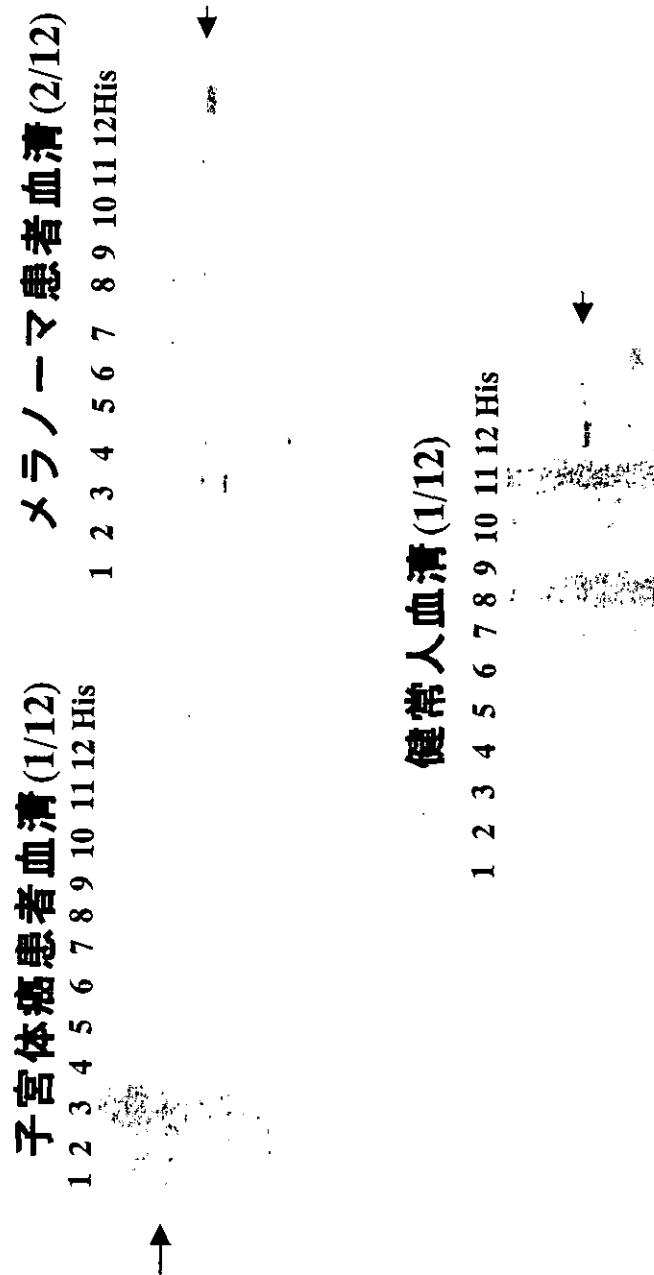
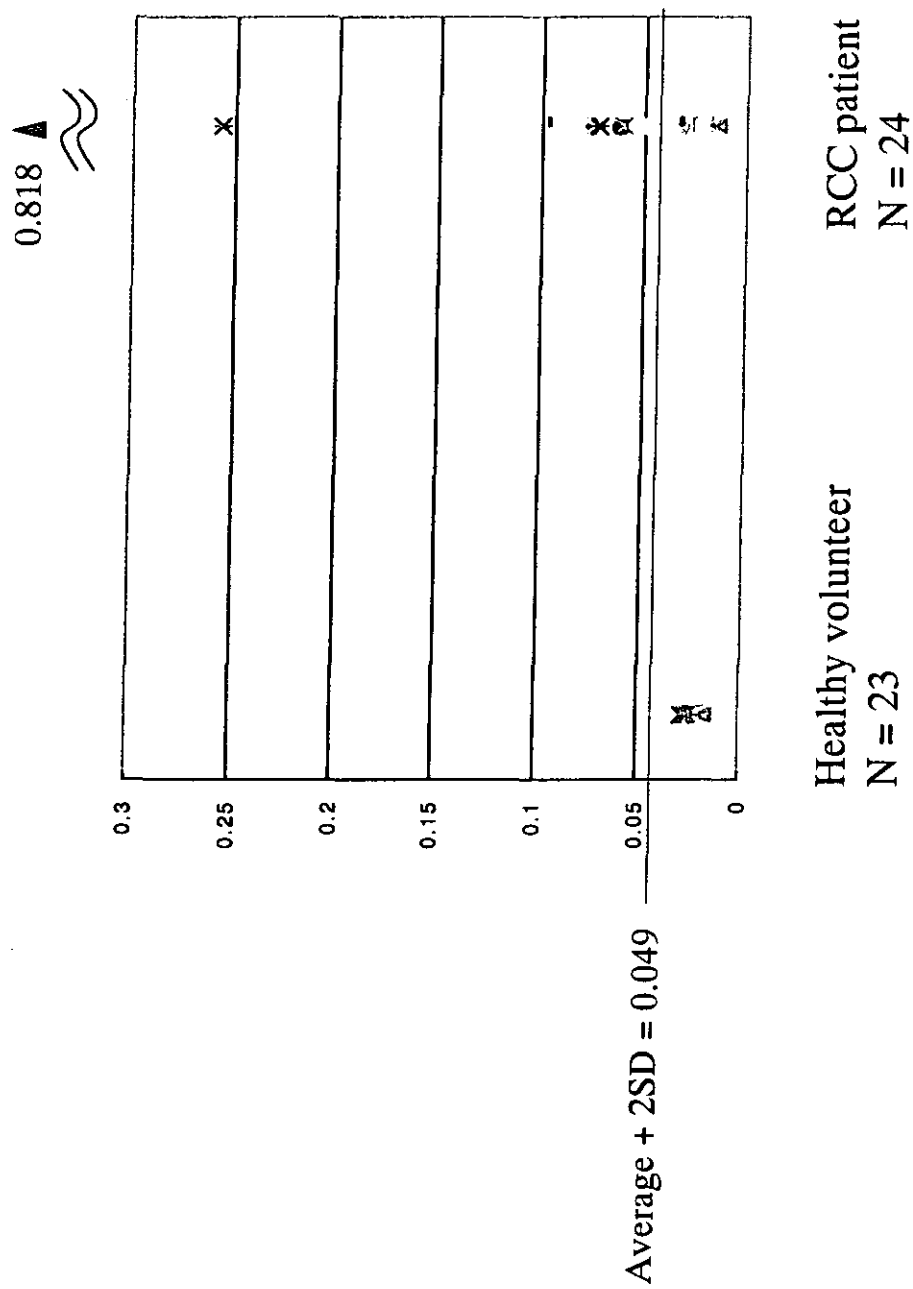


図6. PARG1抗体量は腎癌患者血清中で高値を示した



2-2 膀胱癌抗原の解析

要旨

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、新規 galectin と考えられる 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。KU-BL-3 は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ので、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。

また自己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、末梢血単核球から HLA-A24 拘束性で膀胱癌を認識する T 細胞が誘導できたことから、CD8+T 細胞の標的抗原にもなることが確認された。

はじめに

膀胱癌に対する免疫療法としては、BCG の膀胱内投与が標準的治療として施行されている。その作用機序として免疫反応が考えられており、投与後血清中の IL-2 や IFN- γ の上昇、末梢血中キラー細胞活性の増加など、投与局所だけでなく全身性の免疫増強が報告されている(1-3)。また膀胱癌では MAGE ファミリーや NY-ESO-1 などの癌精巢抗原が高頻度で発現しているとの報告もあり(4-6)、膀胱癌反応性 T 細胞を用いた cDNA クローニング法により、mutated KIAA0205 と MAGE-A12 が同定されている(7)。最近、膀胱癌で HLA-A24 結合 MAGE-3 ペプチド感作樹状細胞をリンパ節投与し免疫反応が惹起されたとの報告がある(8)。したがって、膀胱癌は、メラノーマや腎癌のように、免疫療法の対象になり得ると考えられるが、今までに、膀胱癌の免疫療法に利用可能な癌抗原は少数しか同定されていない。

近年、メラノーマを中心に、免疫系に認識される癌抗原が同定されつつあり(9-12)、メラノーマにおいては、T 細胞エピートープペプチドを用いた免疫療法の一部で、抗腫瘍効果が認められている(13)。メラノーマ抗原の多くは、腫瘍反応性 T 細胞を用いて単離されているが、その他の癌では、腫瘍反応性 T 細胞と癌細胞株を同時に樹立することは難しいために、まだ、十分に癌抗原が同定されていない。これらを必要としない癌抗原単離法として、癌患者血清を用いる SEREX (serological identification of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning) 法があり、どんな癌腫に対しても適応可能である(14)。SEREX 法は患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原を単離するので、少なくとも得られた抗原が CD4+T 細胞に認識されると考えられるが、SEREX 法で単離された NY-ESO-1 などいくつかの癌抗原は CD4+T 細胞に認識されるばかりでなく、CD8+T 細胞にも認識されることが判明し、また CD8+T 細胞を用いて単離された MAGE や tyrosinase などの癌抗原は SEREX 法でも単離されている(14-16)。

我々は膀胱癌の免疫療法に利用可能な癌抗原を単離するために SEREX 法を行った。昨年度、3種の膀胱癌細胞株から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、新規膀胱癌抗原 KU-BL-3 を単離した。組換えタンパクを作製し、ラクトースに対する結合能を検討することにより新規 galectin であることを証明した。KU-BL-3 は、既知の galectin と異なり、発現が癌特異的であり、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。また新たな自己の SEREX スクリーニングにより KU-BL-1 と KU-BL-2 を同定した。KU-BL-2 の合成ペプチドを用い、末梢血単核球から HLA-A24 拘束性で膀胱癌を認識する T 細胞が誘導できたことから、CD8+T 細胞の標的抗原にもなることが確認された。

In vitro translation 法によるタンパクの生成

In vitro translation は Novagen のキットを用いて行った (Perfectly Blunt Vectors (Novagen); Blunt Vector, End Conversion Mix, Single Tube Protein System 3, T7 (Novagen); STP3 T7 transcription Mix, STP3 Translation Mix)。プライマーには、KU-BL-3-S2-sense (5'-CGCCCAGGCTCCCTACATGAA), KU-BL-3-AS1-antisense (5'-CCAGGGCGGGCTCGTCTATG)を用い、95°C 1分、61°C 1分、72°C 1分で 25 サイクル、Galectin-9-S-sense (5'-GATGCCTTCAGCGGTTCCCA), Galectin-9-AS-antisense (5'-GAAGCCGCCTATGTCTGCACA)を用い、95°C 1分、62°C 1分、72°C 1分で 25 サイクルの条件で PCR 反応を行った。PCR 産物をプロパノール沈殿にて精製後、10 μ l の精製水に溶解、KU-BL-3 はさらに 5 倍希釈して、その PCR 産物 1 μ l、水 4.5 μ l、End Conversion Mix 4.5 μ l を混合し、22°C 5分、75°C 10分反応後、氷上 2分、これに pT7Blure-2 Blunt Vector (50ng/ μ l) 1 μ l に T4 DNA Ligase (4U) 1 μ l を加え 22°C 1時間反応後、TE (pH8.0) 90 μ l を加えた。プライマー R-20mer と先述の AS1 を用いて 95°C 1分、55°C 1分、72°C 2分で 30 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 産物 2 μ l と Transcription Mix 8 μ l を混和し 30°C 15分反応後、水 6 μ l、S-35 標識メチオニン (ICN Biomedicals, Inc.) 4 μ l、Translation Mix 30 μ l を混和、30°C 60分反応。Quick spin で低分子を除去後、一部を 2 \times SDS loading buffer と混和し、残りを TBS で 10 倍に希釈して、糖結合能の試料とした。

生成タンパクの糖結合能

Lactose-Agarose (ホーネンコーポレーション) 懸濁液 500 μ l をカラムに詰め、TBS 5ml で洗浄後、カラムに生成タンパク試料全量を添加した。TBS 4ml で洗浄し、約 500 μ l ずつ 8 本 (T1~8) に洗浄液を分取した。次に 200mM Sucrose 2ml を添加し 4 本 (S1~4) に分取、最後に 200mM Lactose 2ml を添加し 4 本 (L1~4) に分取した。分取した分画の T1, 2, 4, 6, 8 と S1~3, L1~3 をそれぞれ 2 \times SDS loading buffer を当量加え、各 15 μ l を 10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ゲルを乾燥後、4日間感光後 BAS5000 (FUJI film) で検出を行った。

ライブラリー作製とスクリーニングに用いた血清を得た患者(FY)

イムノスクリーニングに用いた血清を得た患者(FY)は、日本人の 76 才の女性で、invasive bladder cancer に対して膀胱全摘除術を施行、その後リンパ転移をきたし、化学療法を施行した。病理組織は、transitional cell carcinoma、grade 3、pT3a。一部に squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and sarcomatoid carcinoma を認めた。腫瘍は MAGE-1、-2、-3 を発現していた。この患者に対して HLA-A24 restricted MAGE-3 ペプチドをパルスした樹状細胞を用いた臨床試験を施行し、CTL の誘導が見られた。また一部でリンパ節の縮小が観察されたが治療効果は認められなかった(8)。

細胞株と total RNA

ヒト膀胱移行上皮癌 (transitional cell carcinoma: TCC) 細胞株である FY、KU-1、KU-7、KU-19-19、NBT-2、T24 は RPMI1640 (10% fetal bovine serum; FBS、100 IU/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin) で培養した。FY および KU-19-19 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade 3) の転移巣から樹立された細胞株である。NBT-2 と T24 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade 3) の原発巣から樹立された細胞株である。KU-1 と KU-7 も膀胱癌 (それぞれ grade 2 と grade 1) の原発巣から樹立されたものである。

11 種類のヒトメラノーマ細胞株、4 種類のヒト肺癌細胞株、7 種類のヒト大腸癌細胞株、4 種類のヒト白血病細胞株、4 種類のヒト腎細胞癌細胞株、2 種類のヒト乳癌細胞株、2 種類のヒト前立腺癌細胞株、2 種類のヒトグリオーマ細胞株、2 種類のヒト食道癌細胞株、3 種類のヒト膵癌細胞株、腫瘍浸潤性 T 細胞株 (TIL)、EB virus transformed B cell 細胞株、皮膚線維芽細胞株から total RNA を抽出した。正常膀胱粘膜組織、膀胱癌組織、腎細胞癌組織はインフォームドコンセントが得られた患者の手術献体から採取し、使用するまで -80°C で保存した。

正常組織の total RNA は Clontech より購入した。また上記細胞や組織より total RNA を抽出して使用した。

cDNA ライブラリーの作製

FY 細胞からグアニジン-塩化セシウム超遠心法を用いて total RNA を抽出した。Poly (A)⁺ RNA は Oligotex-dT30 super (TAKARA, Kyoto, Japan) で 2 回処理を行い純化した。cDNA ライブラリーの作成には Poly (A)⁺ RNA 5 µg を使用した。First-strand の合成は oligo (dT) プライマーを用いて行った。cDNA 断片はバクテリオファージ発現ベクター (ZAP express、Stratagene、La Jolla, CA) に封入し、*E. coli* に感染させ 2.3×10^6 個のリコンビナントを有する cDNA ライブラリーを作成した。

患者血清による cDNA ライブラリーのイムノスクリーニング

FY 細胞から作成した cDNA ライブラリーを用いて、15 cm シャーレに約 1.0×10^4 個のプラークを発現させ、ニトロセルロースメンブレン (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) に転写した (17, 18)。リコンビナントタンパクの誘導は isopropyl-thiogalactoside を用いた。*E. coli* とラムダファージに対する患者血清中の抗体を吸収するために、*E. coli* 細胞ライセートとインサートのないバクテリオファージ発現蛋白により血清を処理後、血清を 100 倍に希釈し用いた。TBS-T (0.05% Tween 20) 溶液でメンブレンを 3 回洗浄し、1:4000 の 2 次抗体 (alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman Fcγ antibodies; Cappel, Aurora, Ohio) を使用した。陽性のプラークは 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (SIGMA, St. Louis, MO) と nitroblue tetrazolium (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany)を用いた発色反応で検出した。単離した陽性クローンのコードする cDNA インサートは、T3 プライマー (5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG) と T7 プライマー (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC)を用いた PCR により塩基配列を決定するか、pBK CMV プラスミドに変換した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を用い ABI Prism 310 genetic analyzer (PE Biosystems, Branchburg, NJ)で行った。決定された cDNA の塩基配列は National Center for Biotechnology Information の遺伝子データベースである BLAST プログラムを用いて解析した。

血清中の単離抗原特異的な IgG 抗体の存在

単離したそれぞれの抗原に対する IgG 抗体の存在を、癌患者や健常人の血清を用いて、イムノスクリーニングと同様の手法で検討した。単離された抗原遺伝子をコードするファージとインサートのないファージ(negative control)を 1:1 の割合で混合しプラークを発現させることにより、陽性と陰性を区別した。

RT-PCR およびノーザンブロット

Total RNA はグアニジン-塩化セシウム超遠心法で細胞株や組織から抽出した。正常膀胱粘膜は手術検体を使用し、他の正常組織の RNA は Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)から購入した。逆転写反応は Super Script II 逆転写酵素 (Gibco BRL, Rockville, MD)を用いた。検討する各遺伝子に特異的なプライマーを以下に示す: KU-BL-1 のプライマーは 5'-GGAAATGTCTCTACGCTGCG (センスプライマー)および 5'-AACATGATCGTGGCTGTGGC (アンチセンスプライマー)、KU-BL-2 のプライマーは 5'-GGTGGAGAAGAGCAGCAAGAAG (センスプライマー)および 5'-GGTCCTCTGGAGACAGTAGATG (アンチセンスプライマー)を使用した。PCR は Ex-Taq DNA polymerase (TAKARA)を用いて行った。

ノーザンブロットを行うために正常組織の poly (A)⁺ RNA (2 μg) が各レーンに使用されているナイロンメンブレン (Human Multiple Northern Blot)を購入した(Clontech)。その他の組織や細胞株の RNA に関しては 20 μg の total RNA を各レーンに使用し 1.0% ホルムアルデヒド が含まれるアガロース上で電気泳動を行いナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham)に RNA を転写した。目的の遺伝子を増幅した PCR 産物と High Prime DNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH)を用い、³²P で標識したプローブを作成した。プレハイブリダイゼーションは Quick Hyb 溶液 (Stratagene)を用い 68°C で 20 分間行い、ハイブリダイゼーションは 68°C で 2 時間行った後、メンブレンは十分に洗浄した。シグナルは Molecular Imager Fx (BIO RAD, Hercules, CA)で検出した。コントロールにはβ-actin cDNA プローブ (Clontech)を用いた。

Real-time PCR

正常組織と癌組織における B2 遺伝子の発現レベルを検討するために Taqman real-time PCR を行った。センスプライマー(5'TCAAGGAGATGACAGACGTGC)、アンチセンスプライマー(5'-GACCCAGGACTTTGGTTTCGA)、プローブ(5'(FAM)CAAAGTGGTGAAGGAGGTGGCCAA-(TAMRA))を用いた。データの検討は ABI Prism 7700 Sequence Detector System (PE Biosystems)を用いて行った。それぞれの PCR は 5 つのスタンダードで標準曲線を作成し発現レベルを検討した。

5'-RACE

5'末端の塩基配列を決定するために Marathon TM cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いて 5'-RACE を行った。FY 細胞から抽出した 1 μ g の poly (A)⁺ RNA を oligo(dT)プライマーで AMV 逆転写酵素を用い反応を行った。Second strand の合成は、*E. coli* DNA polymerase I、RNase H 用いて、T4 DNA polymerase を用いて 2 本鎖 DNA の末端を平坦化、T4 DNA ligase を用いて Marathon cDNA adaptor 1 と結合した。この cDNA を Marathon cDNA adaptor 1 と KU-BL-1 に特異的なプライマー(5'-TCGTGGCTGTGGCGGTGGCATATTCTCC)を用い PCR を行った。アダプタープライマー2 と KU-BL-1 特異的プライマー (5'-GGCATATTCTCCACCTCCCCAACACTC)を用いた、二次 PCR を 20 サイクル行った。pGEM-T (Promega Inc.、Madison、WI)に挿入し、塩基配列を決定した。

HLA-A24 高親和性合成ペプチドを用いた CTL の誘導

樹状細胞 (DC) の誘導は既に報告された方法に従った。Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS、Oslo、Norway) を用いて健常人から末梢血単核球 (PBMC) を分離した。PBMC をプレート (Primaria、Falcon、Beckton-Dickinson、Franklin Lakes、NJ) 上で 30 分間培養し、浮遊細胞は凍結保存した。付着細胞は RPMI1640 (10% FCS) に GM-CSF (50 ng/ml) と interleukin-4 (50 ng/ml) を加え 7 日間培養した。抗 CD40 モノクローナル抗体 (500 ng/ml)、IFN- γ (500 IU/ml)、LPS (0.4 ng/ml) で 5 日目に添加し成熟 DC を誘導した。

KU-BL-1 と KU-BL-2 のアミノ酸配列上で HLA-A24 高親和性ペプチドを BIMAS プログラムにより解析した。HLA-A24 高親和性であるペプチドをそれぞれ 2 つずつ選択した (KU-BL-1₈₉₋₉₇: NYNKLKNTL、KU-BL-1₃₅₂₋₃₆₀: SYKAGEFFL、KU-BL-2₃₃₈₋₃₄₆: VYILGGSQL、KU-BL-2₂₀₇₋₂₁₅: VYDAAVRML)。ペプチドは Fmoc 法で合成し、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製し、質量分析にて確認を行った。CTL の誘導に際しては、 2×10^6 個の同一人の PBMC 中の浮遊細胞を、20 μ g/ml のペプチドで刺激した 5×10^5 個の DC と Iscove's DMEM (10% human serum) 中で共培養した。共培養 3 日目に 50 IU/ml で IL-2 (Shionogi、Osaka、Japan) を加えた。培養 7 日目に ペプチドで刺激した 2×10^6 個の自己 PBMC を放射線照射後に加え刺激を行い、さらに 10 日目と 12 日目に IL-2 を加えた。同様の刺激を 2 回を行い最後の刺激から 7 日後に抗原特異的反応を IFN- γ release assay を用いて検討した。

結果

KU-BL-3 の糖結合能

KU-BL-3 の塩基配列によるホモロジー検索の結果、ヒト galectin-9 (NM_002308.2) と ecalectin (AB005894) に 83% の相同性を示した。またアミノ酸レベルで、KU-BL-3 はヒト galectin-9 と 79.2% 一致した。さらに Pfam と SMART プログラムを用いてモチーフ検索を行ったところ、2 つの carbohydrate recognition domains (CRDs) の存在が強く予想された。KU-BL-3 が新規 galectin であるためにはラクトースに対する結合能を持つことを明らかにしなければならない。そこで、*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した (図 1)。陽性コントロールとして galectin9 を、陰性コントロールとして hMSH-2 を用いた。KU-BL-3 は galectin9 同様にショ糖では溶出されず、ラクトースで溶出されたことから糖結合能を持ち、これまでに報告されていない新規 galectin であることが明らかになった。

自己の SEREX 法により患者血清で認識された膀胱癌抗原の単離

膀胱移行上皮癌細胞株 FY から作成したラムダファージ cDNA ライブラリーを同一患者 (FY) の血清を用いてスクリーニングした。合計 1.2×10^6 個のファージクローンをスクリーニングし、78 個の陽性 cDNA クローンを単離した。78 個のクローンは 48 個の異なった分子に分けられ (B1-B48)、36 個の既知の分子 (表 1) と 12 個の未知の分子に分けられた (表 2)。12 個の未知分子のうち 8 分子は部分的な塩基配列が GenBank データベース上に登録されている Unigene cluster と一致した。High density lipoprotein binding protein (HDLBP) (B13)、negative cofactor 2 α -subunit (B16)、pinch protein (B48)、B1、B3、B4、B15 の 7 つの分子は 2 回以上単離された。このうち HDLBP、B3、B4 が最も多く単離された。

膀胱癌の診断や治療に応用しうる抗原を見つけるために、既知の分子に関しては以前に癌との関連性が示唆されているもの、未知の分子に関しては完全に新規であるか、DNA データベースで一致する cDNA 断片の由来組織が癌や限られた正常組織に限定されるものを慎重に評価し、検討を加える分子を選別した。36 個の既知分子の中で、9 分子は癌との関連性が過去に報告されていた。これらは Golgin-84 (B5) (19)、 α -enolase (B6) (20, 21)、laminin receptor 1 (B7) (22)、mitosin (B8) (23, 24)、PM5 protein (B9) (25)、 α -actinin4 (B12) (26)、LBc protooncogene (B14) (27)、thrombospondin-1 (B27) (28)、AnnexinVIII (B37) (29) であった。未知の分子に関してはデータベース上で一致する cDNA 断片の由来組織を検討し、癌で高発現している可能性のあるものを選択した。例えば、B1 の一致する Unigene cluster (Hs. 53531) は癌組織 (神経芽腫、網膜芽腫、胚細胞腫瘍、メラノーマ、リンパ腫、メラノーマなど) や、良性腫瘍 (膀胱移行上皮乳頭腫) や限られた正常組織 (胎児心臓、胎盤、メラノサイト) であった。この結果から、この未知分子 B1 が癌細胞と限られた正常組織のみに発現する可能性があると考えられる。また B3 の一致する Unigene cluster (Hs. 26481) は癌組織

(神経芽腫、肺癌、メラノーマ、皮膚扁平上皮癌、腎癌、胚細胞腫瘍)、限られた正常組織(胎児心臓、精巣、妊娠時の子宮、メラノサイト)などであった。多くの正常組織に発現し癌組織に対して発現の差がないと考えられる分子は除外し、36種類の分子を免疫原性の有無を評価する分子として選択した。選別された36分子に対してIgG抗体が健常人の血清中に存在するかを16例に対して行った。36抗原中24抗原は、健常人血清16例中に抗体が存在しないか、1例にのみ抗体が存在した。その24抗原に対して、膀胱癌患者血清28例の検討を行った。24抗原中13抗原が28例中2例以上にIgG抗体が存在した(表3)。残りの11分子に関してはcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた同一患者の血清にのみIgG抗体が存在した。特にB3は膀胱癌患者血清中に最も高頻度にIgG抗体が存在した(28例中8例)。

B3に特異的なIgG抗体は8例(28例中)の膀胱癌患者血清中に認められたが、その他の癌腫においては腎癌患者血清で1例でIgG抗体を認めるのみで、その他の癌患者血清や健常人血清では抗体の存在を認めなかった。B1に特異的なIgG抗体は膀胱癌患者28例中2例の血清中に認められ、その他の癌患者や健常人血清中にはIgG抗体を認めなかった。

つぎにRT-PCRにより組織発現パターンを検討した。25サイクルのPCRを行ったところ、ほとんどの抗原は多くの正常組織に発現していたが、B1、B2、B3の3抗原は癌細胞株と精巣などのごく限られた正常組織のみに25サイクルのPCRで発現を認めた(データの掲載は省略した)。

SEREX法で単離された抗原の組織、細胞株における発現の検討

B1はRT-PCRの解析結果より6例中4例の膀胱癌細胞株(FY、KU-7、T-24、KU-19-19)と正常精巣に発現を認めた。また正常膀胱粘膜、脳、平滑筋にも弱く発現を認めた。さらに様々な癌組織や癌細胞株にパネルを広げて発現をRT-PCRの解析により検討した。多くの癌細胞株で発現を認め、また23例の膀胱癌組織、3例の胃癌組織、10例の腎細胞癌組織では全例で発現を認めた(表4)。ノーザンブロットでB1は約1.7-kbにバンドが認められ、4例の膀胱癌細胞株、6例の膀胱癌組織では全例、正常膀胱粘膜に発現を認め、RT-PCRの結果とほぼ一致した(図2)。B1は正常膀胱粘膜に発現しているが、膀胱癌組織にも強く発現していた。B1は精巣にも発現し、その他の組織では正常の心臓や肝臓にごく弱い発現を認めるのみであった。これらの結果から、B1は膀胱癌、正常膀胱粘膜に強く発現し、精巣以外の正常組織にはほとんど発現がみられない抗原と考えられた。KU-BL-1と命名しさらなる検討を行った。

B2(Tat-CT1)はRT-PCRとノーザンブロットでは、正常膀胱粘膜との比較において膀胱癌組織に発現が高かった(データの掲載は省略した)。このため定量的な評価のためにReal-time PCRを行った。B2は正常膀胱粘膜と比較し膀胱癌組織に発現は高かったが、膀胱癌組織での発現はB2の発現を認める心臓や腎臓などの正常組織と比べ高いとはいえなかった。それゆえB2は膀胱腫瘍に対する免疫組織学的検討に利用しうる抗原であるが、免疫治療に使用しうる可能性は低いと思われた。

B3に関して、25サイクルのRT-PCRでは検討したほとんどの癌細胞株で発現を認め、膀

膀胱癌細胞株では 6 例中 4 例 (FY、KU-7、T-24、KU-19-19) で発現を認めた。正常組織では脳、心臓、肺、精巣に発現を認めた (データの掲載は省略した)。ノーザンブロットでは、正常組織において B3 と考えられる弱い 3.2-Kb のバンドを心臓と精巣に認め、精巣にのみ弱い 1.0-kb のバンドを認めた。弱い 2.0Kb のバンドを正常組織全般に認めた (図 3A)。B3 と考えられる 3.2Kb のバンドは 6 例中 3 例の膀胱癌細胞株とほとんどの膀胱癌組織に発現を認めた (図 3B)。これらの結果から、B3 は膀胱癌の診断や治療に応用できる可能性がある抗原と考えられた。このため我々は B3 を KU-BL-2 と命名しさらなる検討を行った。

KU-BL-1 の cDNA の全長の同定と KU-BL-1 蛋白の機能の予測

SEREX 法で単離された KU-BL-1 フェージクローンがコードする cDNA で最長のものは 1,603-bp の cDNA フラグメントであったことから、5'末端側の残りの塩基配列を決定するために 5'-RACE 法を行った。5'-RACE により、ノーザンブロットで認められる約 1.7-kb のバンドにほぼ一致するといえる 1,668-bp の cDNA を同定した (図 4)。この cDNA 配列は 1,116-bp の 372 個のアミノ酸で構成される open reading frame (ORF; 下線) と Kozak 配列と推定の first ATG よりもさらに上流にストップコドンをもつことから、全長の塩基配列と考えられた。KU-BL-1 は推定の human lipoic acid synthetase (LAS) (AJ224162) の部分配列と human cDNA clone FLJ22636 (UniGene number: 53531) とほとんど一致した。このため KU-BL-1 は human LAS と考えられた。NCBI の protein BLAST でそのアミノ酸配列を検討すると、マウスの乳癌から同定された LAS (NP_077791) と 87%一致し、分裂酵母から同定された LAS の可能性のある蛋白 (O13642) と 59%一致し、分裂酵母から同定された LAS precursor (BAA21430) と 67%一致した。また酵母から同定された Lip 5p (NP_014839) (30) と 56%一致し、その他の LAS と考えられるアミノ酸配列とも相同性が高かった。マウス LAS (NP_077791) と Lip 5p (NP_014839) とのアミノ酸配列の相同性を図 5 に示した。KU-BL-1 は iron-sulfur cluster である CXXXCXXC という特徴的なモチーフを他の LAS と同様に有していた。この構造は硫黄が lipoic acid に導入されるさいに関与していると報告されている (31)。

KU-BL-2 の構造と機能の検討

KU-BL-2 をコードする最長の cDNA クローンは 3,112-bp の長さの cDNA をコードしており、ノーザンブロットの 3.2-kb のバンドとほぼ一致した。KU-BL-2 をコードするその他の 7 つのクローンの塩基配列と比較し、ORF は 1,758-bp であり 586 個のアミノ酸で構成される蛋白であることが分かった (図 6)。Kozak 配列とストップコドンが最初の ATG と推定される部位の 5'側に存在し ORF の正当性が確認された。DNA データベース上で検討すると KU-BL-2 はヒト胎児脳組織に由来する機能不明の cDNA clone DKFZp564C1616 (AL136597) と一致し、7 番染色体上に存在することが分かった。DKFZp564C1616 と比較し 584 番目と 887 番目の塩基が異なっていたが、アミノ酸配列に変化はなかった。相同性のある蛋白をデータベース上で検索すると、KU-BL-2 のアミノ酸配列は機能不明の蛋白 hypothetical protein (CAB66532) とほぼ一致した。KU-BL-2 はヒト kelch-like protein 3 (KLHL3: Q9UH77) (32) と 34%、ショウジョウバエの kelch protein (Q04652) (33) と 33%、kelch-like 250 (Mayven: NP_009177)