

と 32%の相同性があり、その他の kelch-like protein とも相同性を認めた。PROSITE プログラムや Pfam プログラムを用いたアミノ酸配列のモチーフを検討すると、KU-BL-2 は kelch-like protein に特徴的に保存されている BTB/POZ ドメインと 6 つの kelch repeat という特徴的な配列を有する可能性が示された(図 6)。KU-BL-2 のアミノ酸配列上の BTB/POZ ドメインと考えられる部位はアミノ酸で 37 個中 35 個(94.6%)が過去に報告されたコンセンサスシーケンス(34)と一致した。これらの結果から、KU-BL-2 は kelch-like proteins の一つであると考えられた。

合成ペプチドを用いた腫瘍反応性 T 細胞の誘導

KU-BL-1 と KU-BL-2 に特異的に反応する T 細胞の誘導を試みた。KU-BL-1 と KU-BL-2 由来の HLA-A24 高親和性ペプチドを合成し、これを用いて 8 人の健常人の PBMC を刺激することによりペプチド特異的に反応する T 細胞の誘導を試みた。4 種類のペプチド(KU-BL-1: NYNKLKNTL および SYKAGEFFL、KU-BL-2: VYILGGSQQL および VYDAAVRML)を合成した。これらの中で、KU-BL-2 から作成したペプチドである VYILGGSQQL を用いることによりペプチド特異的に反応する T 細胞を 1 例において誘導した(図 7A)。VYILGGSQQL で刺激された T 細胞は HLA-A24 と KU-BL-2 を同時に発現する膀胱癌細胞株、FY を認識し、HLA-A24 陰性の膀胱癌細胞株 KU1 は認識しなかった(図 7B)。その他の 3 つのペプチドでは、腫瘍細胞を明確に認識する T 細胞を誘導できなかったが、SYKAGEFFL で刺激することにより、ペプチド特異的に弱く反応する T 細胞が 1 例で誘導された。

考察

腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法は腫瘍抗原の同定に非常に有効な方法であるが、腫瘍反応性 T 細胞株と腫瘍細胞株を同時に同一個体から樹立する必要がある。Pfreundschuh や Old らのグループは SEREX 法により様々な癌腫において腫瘍抗原を単離した。この検討の結果、SEREX 法により CD4⁺T 細胞だけではなく CD8⁺T 細胞にも認識される抗原が同定できることが分かってきた。我々は、ヒトメラノーマの抗原であり、メラノーマとメラノサイトの高発現される KU-MEL-1 を SEREX 法により同定した。本研究では SEREX 法を膀胱癌に対して適用し、自己血清を用いたシステムで KU-BL-1 と KU-BL-2 を、同種のシステムで KU-BL-3 を単離した。

昨年度単離した KU-BL-3 はヒト 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。Galectin は carbohydrate recognition domain (CRD) をもつレクチン結合タンパクで、ファミリー遺伝子を形成しており現時点で 1 ~14 までが報告されている。Galectin はその CRD からプロトタイプ、キメラタイプ、タンデムタイプの 3 つに分類することが出来る。KU-BL-3 は galectin-9 同様 2 つの CRD を持つことから、タンデムタイプの新規 galectin と考えられ、本研究でラクトースに対する結合能を持つことを明らかにした。この結果、KU-BL-3 は新しい腫瘍マーカーとしての可能性が考えられることから、多数の臨床検体を用いた検討が必要である。

さらに多くの膀胱癌抗原を単離するために、自己血清を用いた SEREX を行った。cDNA ライブラリーに使用した FY 細胞株は MAGE-1、-2、-3 を発現していることが報告されている。SEREX 法により MAGE ファミリー遺伝子の単離が報告されているが、本研究では MAGE ファミリーの遺伝子は単離されなかった。この理由はこの患者の血清中の MAGE 抗原に対する抗体価が比較的低かったか、この患者の HLA タイプなどの遺伝的要因で MAGE 抗原に対する IgG 抗体ができなかったためと思われる。

KU-BL-1 は多くの膀胱癌細胞株、すべての膀胱癌組織、全例の胃癌と腎細胞癌組織、正常膀胱粘膜および精巣に発現していた。KU-BL-1 に対する IgG 抗体は 28 例中 2 例の膀胱癌患者血清に存在したが、その他の癌患者血清や健常人血清中には存在しなかった。このため KU-BL-1 は膀胱癌に発現し正常膀胱と精巣以外の正常組織に発現を認めない興味深い免疫原性のある抗原であると考えられた。本研究では、KU-BL-1 はマウスの LAS (35) をはじめとする過去に報告された LAS と構造が類似しており、ヒト LAS をコードしていると推定された。硫黄を lipoic acid に導入する際に必要である金属結合部位 (iron-sulfur cluster) のモチーフである CXXXCXXC という配列を含んでいた。Lipoic acid は硫黄を含む補酵素であり pyruvate dehydrogenase、2-oxoglutarate dehydrogenase、branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase、glycine cleavage system などの酵素の作用に不可欠である。膀胱腫瘍における LAS の役割は今後検討する必要がある。

KU-BL-2 は膀胱癌細胞株、膀胱癌組織、および正常心臓や精巣組織に発現していた。KU-BL-2 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者 28 例中 8 例に存在し、1 例の腎癌に存在したが、その他の癌患者や健常人の血清中には検出されなかった。KU-BL-2 は *kelch* 蛋白およびその他の *kelch-like protein* と相同性が高かった。*Kelch* はショウジョウバエの卵子形成の時に発現し *ring canal* という細胞間輸送の架け橋を形成するときに発現する蛋白である。KU-BL-2 は zinc-type の転写因子に認められる BTB/POZ ドメインを持ち、また *kelch-like protein* に特徴的である *kelch repeat* を有していた。*Kelch repeat* は蛋白蛋白の相互作用に関連する部位であり、これによってクロマチンの構造を変化させたり、細胞骨格や nuclear matrix protein などを変化させることが報告されている (34, 36)。*Kelch repeat* は典型的に約 50 のアミノ酸からなる 6 つのリピートからなっており、 β -superbarrel 構造をなしていると予想される。このリピートはアクチンなどの他の蛋白に作用することが報告されている (37, 38)。これらの所見から KU-BL-2 はヒト *kelch-like protein* の一つであると考えられる。この蛋白の膀胱腫瘍における役割も今後検討を要する。

KU-BL-1 と KU-BL-2 で 4 種類の HLA-A24 親和性のペプチドを用い、腫瘍反応性 T 細胞を誘導できるか検討した。KU-BL-2 に由来する 1 つのペプチドがペプチド特異的 T 細胞を誘導でき、同時に KU-BL-2 を発現する腫瘍細胞株を認識した。さらにその他のペプチドにおいて CTL を誘導できるか、膀胱腫瘍の患者の PBMC から CTL が誘導できるか、特に KU-BL-1 や KU-BL2 に対する IgG 抗体が血清中に存在する患者において CTL が誘導できるかを今後さらに検討していく必要がある。KU-BL-2 は正常心臓に、KU-BL-1 は正常膀胱に比較的強く発現していたが、免疫治療に使用する抗原として除外する必要はないと思われる。もし KU-BL-2 のエピトープの密度が心筋細胞に低ければ、心臓に対する自己免疫反応は起こらないであろうし、KU-BL-1 が正常膀胱粘膜において発現していても膀胱切除症例では免疫治療の妨げとはならない。SEREX 法で同定された抗原の免疫細胞治療における意味は、最近マウスの腫瘍モデルにおいて検討された。その報告では、SEREX 法で同定された抗原は有用なヘルパー CD4⁺ T 細胞の抗原になりうることが証明され、抗原性のあるペプチドで同時に CD8⁺ T 細胞を刺激することにより、強い抗腫瘍効果を認めることが示された。それゆえ KU-BL-1 や KU-BL-2 は細胞免疫治療の際に免疫反応を誘導できる可能性がある。

これらの結果は、KU-BL-1、KU-BL-2、KU-BL-3 はいずれも臨床応用可能なことを示しており、今後検体数を増やして詳細な検討を行う必要がある。

文献

1. De Boer, E. C., De Jong, W. H., Steerenberg, P. A., Aarden, L. A., Tetteroo, E., De Groot, E. R., Van der Meijden, A. P., Vegt, P. D., Debruyne, F. M., and Ruitenberg, E. J. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*, *34*: 306-312, 1992.
2. Prescott, S., James, K., Hargreave, T. B., Chisholm, G. D., and Smyth, J. F. Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy [see comments]. *J Urol*, *144*: 1248-1251, 1990.
3. Taniguchi, K., Koga, S., Nishikido, M., Yamashita, S., Sakuragi, T., Kanetake, H., and Saito, Y. Systemic immune response after intravesical instillation of bacille Calmette-Guerin (BCG) for superficial bladder cancer. *Clin Exp Immunol*, *115*: 131-135, 1999.
4. Patard, J. J., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., Francois, P., Abi-Aad, A., Van Cangh, P., Abbou, C. C., Chopin, D., and et al. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer*, *64*: 60-64, 1995.
5. Kurashige, T., Noguchi, Y., Saika, T., Ono, T., Nagata, Y., Jungbluth, A., Ritter, G., Chen, Y. T., Stockert, E., Tsushima, T., Kumon, H., Old, L. J., and Nakayama, E. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*, *61*: 4671-4674., 2001.
6. Heidecker, L., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Gueguen, M., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. Cytolytic T lymphocytes raised against a human bladder carcinoma recognize an antigen encoded by gene MAGE-A12. *J Immunol*, *164*: 6041-6045., 2000.
7. Gueguen, M., Patard, J. J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, J. C., Van Cangh, P. J., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol*, *160*: 6188-6194, 1998.
8. Nishiyama, T., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Nakamura, K., Ikeda, Y., Takesako, K., and Murai, M. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res*, *7*: 23-31., 2001.
9. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol*, *154*: 3961-3968, 1995.
10. Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res*, *16*: 313-339, 1997.
11. Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, *183*: 1185-1192, 1996.
12. 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.

13. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzenuber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma [see comments]. *Nat Med*, 4: 321-327, 1998.
14. 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.
15. Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J., and Knuth, A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, 187: 265-270, 1998.
16. Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y. T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L. J., and Knuth, A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12198-12203., 2000.
17. Kuniwa, Y., Fujita, T., Akada, M., Ito, K., Shofuda, T., Suzuki, Y., Yamamoto, A., Saida, T., and Kawakami, Y. Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res*, 61: 7900-7907, 2001.
18. Ishikawa, T., Fujita, T., Suzuki, Y., Okabe, S., Yuasa, Y., Iwai, T., and Kawakami, Y. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, 63: 5564-5572, 2003.
19. Bascom, R. A., Srinivasan, S., and Nussbaum, R. L. Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem*, 274: 2953-2962, 1999.
20. Adamus, G., Amundson, D., Seigel, G. M., and Machnicki, M. Anti-enolase-alpha autoantibodies in cancer-associated retinopathy: epitope mapping and cytotoxicity on retinal cells. *J Autoimmun*, 11: 671-677, 1998.
21. Kondo, H., Sahara, H., Miyazak, A., Nabeta, Y., Hirohashi, Y., Kanaseki, T., Yamaguchi, A., Yamada, N., Hirayama, K., Suzuki, M., Hamuro, J., Torigoe, T., Takahashi, N., Kohama, G., Ikeda, H., and Sato, N. Natural Antigenic Peptides from Squamous Cell Carcinoma Recognized by Autologous HLA-DR8-restricted CD4+ T Cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 917-924, 2002.
22. Ozaki, I., Yamamoto, K., Mizuta, T., Kajihara, S., Fukushima, N., Setoguchi, Y., Morito, F., and Sakai, T. Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma. *Gut*, 43: 837-842, 1998.
23. Zhu, X., Mancini, M. A., Chang, K. H., Liu, C. Y., Chen, C. F., Shan, B., Jones, D., Yang-Feng, T. L., and Lee, W. H. Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol Cell Biol*, 15: 5017-5029, 1995.
24. Clark, G. M., Allred, D. C., Hilsenbeck, S. G., Chamness, G. C., Osborne, C. K., Jones, D., and Lee, W. H. Mitosin correlates with clinical outcome in node-negative breast cancer. *Cancer Res*, 57: 5505-5508, 1997.
25. Stubbs, A. P., Abel, P. D., Golding, M., Bhangal, G., Wang, Q., Waxman, J., Stamp, G. W., and

- Lalani, E. N. Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer: association with chromosomal regions involved with genetic aberrations. *Am J Pathol*, 154: 1335-1343, 1999.
26. Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., and Hirohashi, S. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol*, 140: 1383-1393, 1998.
27. Sterpetti, P., Hack, A. A., Bashir, M. P., Park, B., Cheng, S. D., Knoll, J. H., Urano, T., Feig, L. A., and Toksoz, D. Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1999 May;19(5):3930]. *Mol Cell Biol*, 19: 1334-1345, 1999.
28. Oshiba, G., Kijima, H., Himeno, S., Kenmochi, T., Kise, Y., Tanaka, H., Nishi, T., Chino, O., Shimada, H., Machimura, T., Tsuchida, T., Nakamura, M., Ueyama, Y., Tanaka, M., Tajima, T., and Makuuchi, H. Stromal thrombospondin-1 expression is correlated with progression of esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*, 19: 4375-4378, 1999.
29. Chang, K. S., Wang, G., Freireich, E. J., Daly, M., Naylor, S. L., Trujillo, J. M., and Stass, S. A. Specific expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 79: 1802-1810, 1992.
30. Sulo, P. and Martin, N. C. Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268: 17634-17639, 1993.
31. Tate, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. Cloning and transcriptional analysis of the lipA (lipoic acid synthetase) gene from *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Lett*, 149: 165-172, 1997.
32. Lai, F., Orelli, B. J., Till, B. G., Godley, L. A., Fernald, A. A., Pamintuan, L., and Le Beau, M. M. Molecular characterization of KLHL3, a human homologue of the *Drosophila* kelch gene. *Genomics*, 66: 65-75., 2000.
33. Xue, F. and Cooley, L. kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell*, 72: 681-693, 1993.
34. Soltysik-Espanola, M., Rogers, R. A., Jiang, S., Kim, T. A., Gaedigk, R., White, R. A., Avraham, H., and Avraham, S. Characterization of Mayven, a novel actin-binding protein predominantly expressed in brain. *Mol Biol Cell*, 10: 2361-2375., 1999.
35. Morikawa, T., Yasuno, R., and Wada, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett*, 498: 16-21., 2001.
36. Bardwell, V. J. and Treisman, R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev*, 8: 1664-1677., 1994.
37. Way, M., Sanders, M., Garcia, C., Sakai, J., and Matsudaira, P. Sequence and domain organization of scruin, an actin-cross-linking protein in the acrosomal process of *Limulus* sperm. *J Cell Biol*, 128: 51-60., 1995.
38. Tilney, L. G., Tilney, M. S., and Guild, G. M. Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *J Cell Biol*, 133: 61-74., 1996.

TABLE I - PREVIOUSLY CHARACTERIZED MOLECULES THAT WERE ISOLATED BY SEREX

Clone	No. of isolated clones	Identity	Chromosome
B2	1	Transcription factor tat-CT1	19q13
B5	1	Golgin-84	14q
B6	1	α -enolase	1p36.3-p36.2
B7	1	Laminin receptor 1	3p21.3
B8	1	Mitotin	1q32-q41
B9	1	PM5 protein	16p13.11
B10	1	EBNA-2 coactivator	7q31.3
B11	1	Hsp70-1	6p21.3
B12	1	α -actin 4	19q13
B13	8	High-density lipoprotein binding protein	2q37
B14	1	Lbc protooncogene	15q24-q25
B16	2	Negative cofactor 2 α subunit	11q13.3
B17	1	Nitric oxide synthase 3	7q36
B18	1	Kinectin 1	14q22.1
B20	1	STE20-like kinase	12q24.2
B21	1	Follistatin-related protein	3q13.33
B23	1	Tyrosyl-tRNA synthetase	1p34.3
B24	1	Initiation factor 4B	12q12
B25	1	Elongation factor-1 α	6q14.1
B26	1	Translation factor CA150	5q31
B27	1	Thrombospondin 1	15q15
B28	1	Translocon-associated protein δ	Xq28
B29	1	C-terminal binding protein 2	10q26.13
B30	1	Protective protein for β -galactosidase	20q13.1
B32	1	Lens epithelium-derived growth factor	9p22.1
B35	1	Histone macro H2A1.2	5q31.3-q32
B37	1	Annexin VIII	10q11.2
B38	1	Ribosomal protein L28	19q13.4
B40	1	Pyruvate dehydrogenase- α subunit	Xp22.2-p22.1
B41	1	Ribosomal protein L19	17q11.2-q12
B42	1	Ribosomal protein L37a	2
B43	1	Ribosomal protein S6	9p21
B45	1	Succinate dehydrogenase complex subunit A	5p15
B46	1	Protein tyrosine phosphatase receptor type U	1p35.3-p35.1
B47	1	Pinch-2 protein	2q14-q21
B48	2	Pinch protein	2q12.2

TABLE II - PREVIOUSLY UNCHARACTERIZED GENES THAT WERE ISOLATED BY SEREX

Clone	Number of isolated clones	Identity	Unigene	Chromosome
B1	2	Putative lipoic acid synthetase	Hs.53531	6p21.3
B3	8	Hypothetical protein	Hs.26481	7p21.3
B4	7	KIAA0603	Hs.173802	13q21.33
B15	2	KIAA0782	Hs.21264	11q13.3
B19	1	EST	Hs.288897	2q36.1
B22	1	EST	Hs.173259	6q25.3
B31	1	EST	Hs.21486	2p11.2
B33	1	EST	-	
B34	1	EST	-	
B36	1	Hypothetical protein	-	6
B39	1	EST	-	
B44	1	Hypothetical protein	Hs.8836	22q13.2

TABLE III - PRESENCE OF IGG ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE SEREX-IDENTIFIED ANTIGENS

IN SERA FROM PATIENTS WITH VARIOUS CANCERS AND HEALTHY INDIVIDUALS

Clone	Healthy individuals n=16	Bladder cancer n=28	Prostate cancer n=14	Melanoma n=10	Brain cancer n=10	Pancreatic cancer n=10	Renal cancer n=10	Esophageal cancer n=10	Colon cancer n=7	Testicular cancer n=6
B1	0*	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	8	0	0	0	0	1	0	0	0
B4	0	3	1	0	1	0	0	1	0	0
B5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	5	1	1	1	4	0	0	1	1
B9	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0
B10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
B13	0	4	0	1	0	0	1	0	0	0
B14	0	1	2	0	0	0	3	1	0	0
B15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
B20	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0
B22	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
B28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B33	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
B44	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

* n = 30

**TABLE IV - EXPRESSION OF KU-BL-1 (B1) IN VARIOUS CANCER CELL LINES
EVALUATED BY RT-PCR**

Cancer	Positive/Total
Melanoma	11/11
Bladder cancer	4/6 (23/23)
Breast cancer	1/2
Colon cancer	5/7
Esophageal cancer	1/2
Gastric cancer	ND (3/3)
Glioma	1/2
Hematological cancer	4/4
Lung cancer	1/4
Prostate cancer	1/2
Pancreatic cancer	3/3
Renal cancer	2/4(10/10)

Parentheses : tumor tissues

Cell lines (25 cycle), tissues (30 cycle)

ND : not done

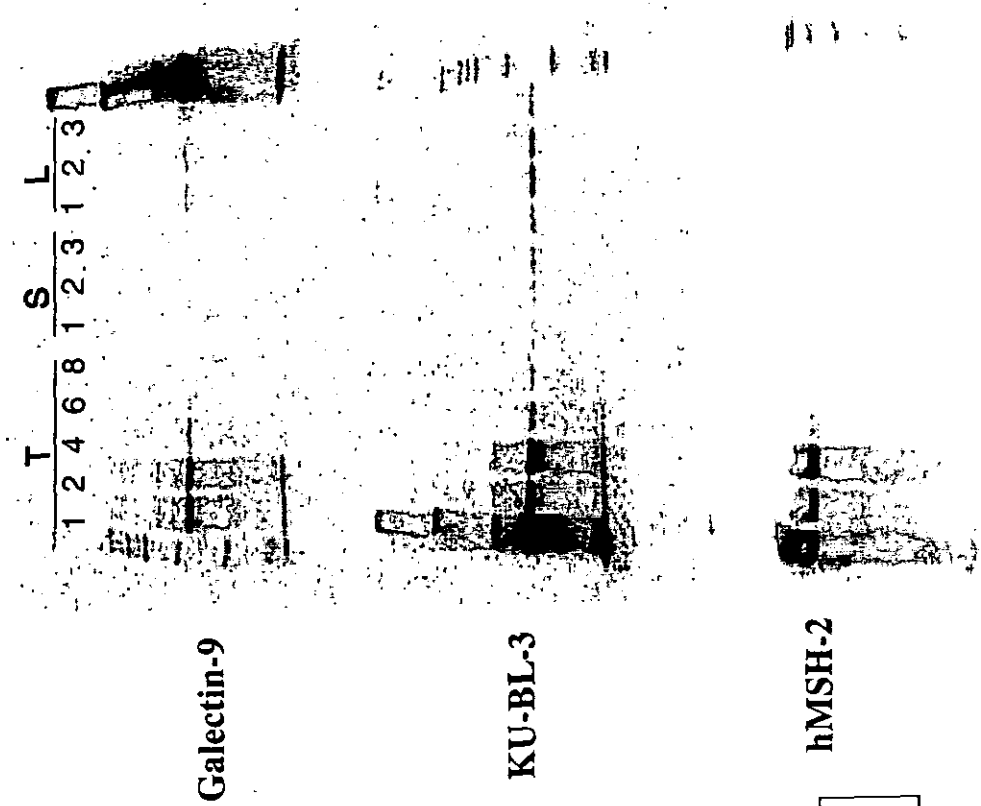
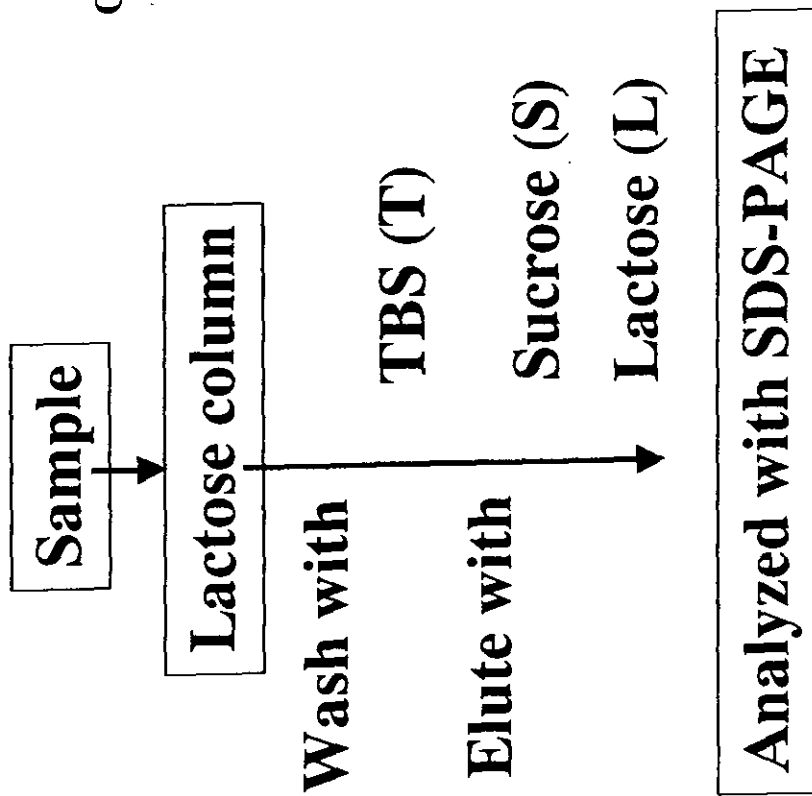


図1 KU-BL-3の Lactose に対する親和性

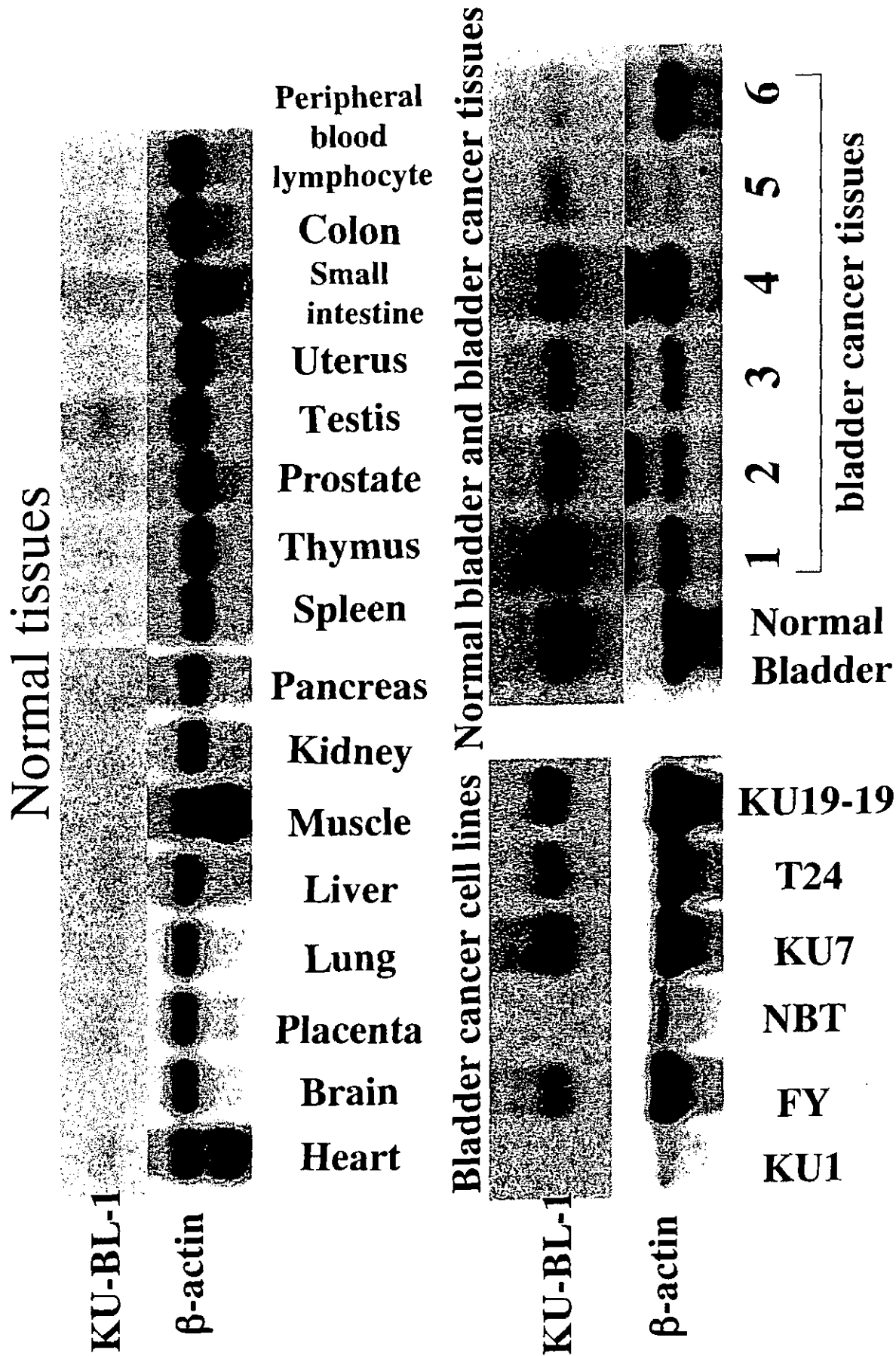


図2 KU-BL-1のNorthern blot法による解析

A

Normal tissues

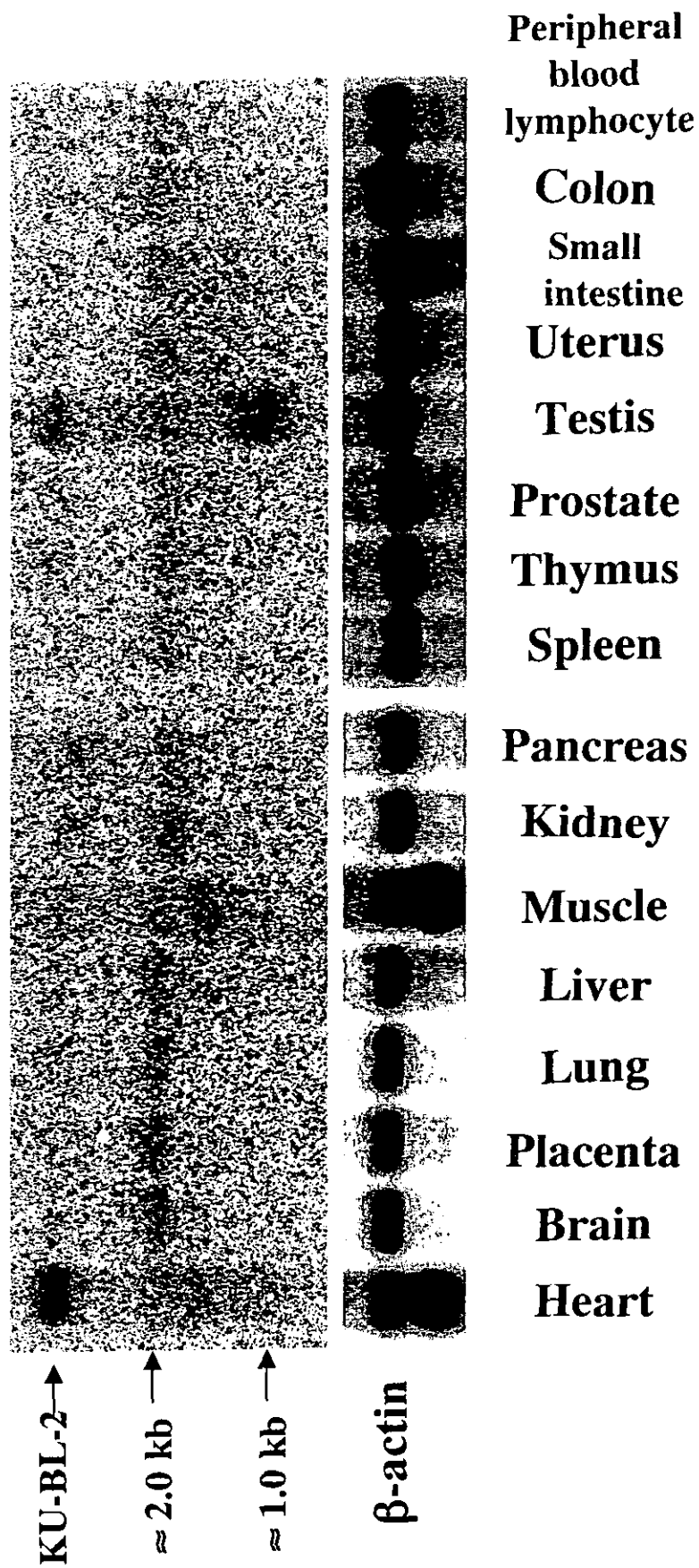
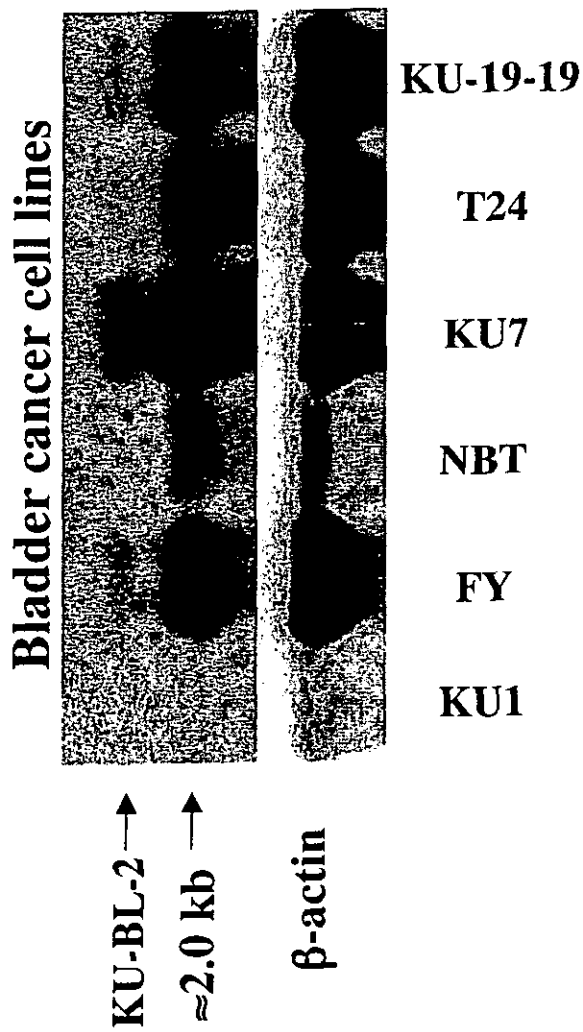


図3A KU-BL-2のNorthern blot法による解析

B



Normal bladder and bladder cancer tissues



図3B KU-BL-2のNorthern blot法による解析

1 gagcgacgtaatttogaacctgtcctttcccgggagtttagcgatccctcaaccctgcact
 61 gcgctagtoctaaagaggaaATGTCTCTACGCTGCGGGGATGCAGCCCGCACCCCTGGGGC
 121 CCCGGGTATTTGGGAGATATTTTGCAGCCCAGTCAGACCGTTAAGCTCCTTGCCAGATA
 181 CAAAAAAGGAACCTCCTAAGAATGGACCAGACCTTCAAGATTTTGTATCTGGTGATCTTG
 241 CAGACAGGAGCACCTGGGATGAATATAAAGGAAAACCTAAAACGCCAGAAAGGAGAAAGGT
 301 TAAGACTACCTCCATGGCTAAAGACAGAGATTCCCATGGGGAAAAATTACAATAAACTGA
 361 AAAATACTTTGCGGAATTTAAATCTCCATACAGTATGTGAGGAAGCTCGATGTCCAATA
 421 TTGGAGAGTGTGGGGAGGTGGAGAATATGCCACCGCCACAGCCACGATCATGTTGATGG
 481 GTGACACATGTACAAGAGGTTGCAGATTTTGTCTGTGTAAGACTGCAAGAAATCCTCCTC
 541 CACTGGATGCCAGTGAGCCCTACAATACTGCAAAGGCAATTGCAGAATGGGGTCTGGATT
 601 ATGTTGTCCTGACATCTGTGGATCGAGATGATATGCCTGATGGGGGAGCTGAACACATTG
 661 CAAAGACCGTATCATATTTAAAGGAAAGGAATCCAAAAATCCTTGTGGAGTGTCTTACTC
 721 CTGATTTTCGAGGTGATCTCAAAGCAATAGAAAAAGTTGCTCTGTCAGGATTAGATGTGT
 781 ATGCACATAATGTAGAAACAGTCCCGGAATTACAGAGTAAGGTTGCTGATCCTCGGGCCA
 841 ATTTTGATCAGTCCCTACGTGTAAGTAAACATGCCAAGAGGTTTCAGCCTGATGTTATTT
 901 CTAAAACATCTATAATGTTGGGTTTAGGCGAGAAATGATGAGCAAGTATATGCAACAATGA
 961 AAGCACTTCGTGAGGCAGATGTAGACTGCTTGACTTTAGGACAAATATATGCAGCCAACAA
 1021 GCGTACCTTAAGGTTGAAGAATATATTAAGTCTGAAAAATTCAAATACTGGGAAAAAG
 1081 TAGGAAATGAACTTGATTTTCAATATACTGCAAGTGGCCCTTTGGTGCCTTCTTCATATA
 1141 AAGCAGGTGAATTTTCTGAAAAATCTAGTGGCTAAAAAGAAAAACAAAAGACCTCtaaa
 1201 acttcaacaagaccttcaagatcacagaaaattttaaaatttgattccagttaataacag
 1261 aggtggtgccagaaatgcctggactgcagtggaatgccccacctctttgcttaaaaaaaa
 1321 aaatgtcaatagccaggeatagtggtcaccgctgtaatcccagcactttaggaggccaa
 1381 ggcgggtggatcacctgaggtcaggagttogagaccagcctggccaacatgggtgaaaatcc
 1441 tgtctccactaaaaacacaaaaattagtcaggegtggtagtgggtgctgtaatcccagc
 1501 tactcgggaggctaaggcaggagaaatcactgaaacctgggagggggaggttgacgtgagc
 1561 caagatcgctccattgccctccagcctgggtgacaagagcaaaaactccatctcaaaataaa
 1621 taaaaaggaaaaaaaagtcaataaactgtacaaaatattaattacagtaaaaaaaaaaaaaaa
 1681 aaaaaaaaaaaaaa

図4 KU-BL-1の塩基配列

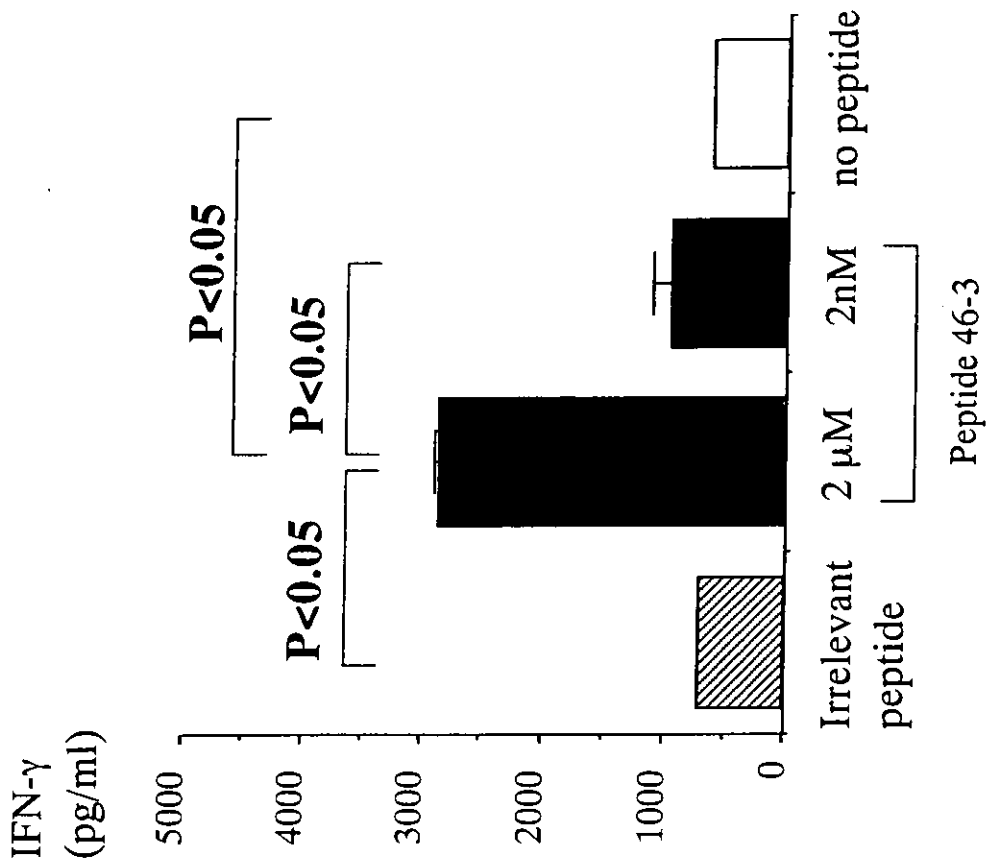
BL-1	1	MSLRGDAARTLGPRVFGRYFCSFVRPLSSLDPDKKKE LLQNGPDL	45
MLAS	1	MALRCWDTARSLGSRIFGRYAFT-VRALSSLDPDKKKE FLHNGPDL	44
LIP5	57	RVPVGNSTEVENATSQLTGTSGKRRKGNRKR I TE FKDALNLGPSF	91
BL-1	46	QDFVSGDLADRSTWDEYKGNLKRQKGERLRLPPWLKTE I PMGKNY	90
MLAS	45	QDFVSGDLADKSTWDEYKGNLKRQKGERLRLPPWLKTKI PMGKNY	89
LIP5	92	ADFVSGK-ASKMILDPL-EKARQNTTEAKKLPRLKVP I PKGTNY	134
BL-1	91	NKLKNTLRNLNLHTVCEEARCPNIGE CWGGGEYATATAT IMLMGD	135
MLAS	90	NKLKNTLRNLSLHTVCEEARCPNIGE CWGGGEYATATAT IMLMGD	134
LIP5	135	HKLKGDVKE LGLSTVCEEARCPNIGE CWGGKDKSKATAT IMLLGD	179
		* * *	
BL-1	136	TCTRGCRFCSVKTARNPPPLDASEPYNTAKAIAEWGLDYVVLT SV	180
MLAS	135	TCTRGCRFCSVKTARNPPPLDANE PDNTAKAIAEWGLDYVVLT SV	179
LIP5	180	TCTRGCRFCSVKTNRTPSKPDPMEPENTAEA I KRWGLGYVVLT TV	224
BL-1	181	DRDDMPDGGAEHIAKTVSYLKERNPKILVECLTPDFRGDLKAI EK	225
MLAS	180	DRDDVADGGAEHIAKTVSCLKERNPKILVECLTPDFRGDLRAVEK	224
LIP5	225	DRDDLVDGGANHLAETVRKIKQKAPNTLVE TLSGDFRGDLKMVD I	269
BL-1	226	VALSGLDVYAHNVETVPELQSKVRDPRANFDQSLRVLKHAKKVQP	270
MLAS	225	VALSGLDVYAHNVETVPELQKVRDPRANFDQSLRVLRHAKKEVQP	269
LIP5	270	MAQCGLDVYAHNLETVE SLTPHVRDRRATYRQSLSVLERAKATVP	314
BL-1	271	DVISKTSIMLGLGENDEQVYATMKALREADVDCLTLGQYMQPTRR	315
MLAS	270	DVVSKTSIMLGLGETDEQVYATLKALRAADVCLTLGQYMQPTKR	314
LIP5	315	SLITKTSIMLGLGETDEQITQTLKDLRNIQCDVVTFGQYMRPTKR	359
BL-1	316	HLKVEEYITPEKFKYWEKVGNELGFHYTASGPLVRSSYKAGEFFL	360
MLAS	315	HLKVEEYVTPKFKYWEKVGNELGFY T ASGPLVRSSYKAGEFFL	359
LIP5	360	HMKVVEYVKPEKFDYWKERALEMGFLYCASGPLVRSSYKAGEAFI	404
BL-1	361	KNLVAKRRTKDL	372
MLAS	360	KNLVARRKTK	369
LIP5	405	ENVLKKRNMK	414

図5 KU-BL-1のアミノ酸配列とその比較

1 cggggcagcagcccagttggtagcgtcgctccctgagcgttttctaagggggccgcccggc
61 cttgtcttttcggcagtgggccgagccaccgcccctgcccgcggttccagagctggggcgt
121 gcagctgcactgcccgatcgccgtgttggtcgatagaaatccccagtggtgccagagagtG
181 cgacccctcgcccggcccggcgagccccggggtgaaccgagctgagggaggATGGCAGC
M A A
241 CTCTGGGGTGGAGAAGAGCAGCAAGAAGAAGACCGAGAAGAACTTGCTGCTCGGGAAGA
S G V E K S S K K K T E K K L A A R E E
301 AGCTAAATTTGGCGGGTTTCATGGCGTCATGAATAACATGCGGAAACAGAAAACGTT
A K L L A G F M G V M N N M R K Q K T L
361 GTGTGACGTGATCCTCATGGTCCAGGAAAGAAAGATACCTGCTCATCGTGTGTTCTTGC
C D V I L M V Q E R K I P A H R V V L A
421 TGCAGCCAGTCATTTTTTAACCTAATGTTTCACTAATAACATGCTTGAATCAAAGTCCCT
A A S H F F N L M F T T N M L E S K S F
481 TGAAGTAGAACTCAAAGATGCTGAACCTGATATTATTGAACAACTGGTGAATTTGCTTA
E V E L K D A E P D I I E Q L V E F A Y
541 TACTGCTAGAATTTCCGTGAATAGCAACAATGTTGCTGCTGCTGATGTCAGCAACCA
T A R I S V N S N N V Q S L L D A A N Q
601 ATATGAGATTGAACCTGTGAAGAAAATGTGTGTTGATTTTTTGAAGAACAAGTTGATGC
Y Q I E P V K K M C V D F L K E Q V D A
661 TTCAAATTTGCTTGGTATAAGTGTGCTAGCGGAGTGTCTAGATTGCTCTGAATTGAAGC
S N C L G I S V L A E C L D C P E L K A
721 AACTGCAGATGACTTTTATTCATCAGCACTTTACTGAAGTTTACAAAACCTGATGAATTTCT
T A D D F I H Q H F T E V Y K T D E F L
781 TCAACTGATGTCAAGCAGTAAACATCTTCAACCAGGACACTCTGACTGTGAGAGC
Q L D V K R V T H L L N Q D T L T V R A
841 AGAGGATCAGGTTTATGATCTGCAGTCAAGTGGTGAATACGATGAACCTAATCGCCA
E C D Q V Y D A A V R W L K Y D E P N R Q
901 GCCATTTATGGTTGATATCCTTGAAGTCAAGTGGTTCCTCTTATATCAAAGAAATTTCTT
P F M V D I L A K V R F P L I S K N F L
961 AAGTAAACCGGTACAAGCTGAACCACTTATTCAAGACAATCTGAAATGCCTTAAGATGGT
S K T V Q A E P L I Q D N P E C L K M V
1021 GATAAGTGAATGAGGTACCATCTACTGTCTCCAGAGGACCGAGAAGAACTTGATAGTGG
I S G M R Y H L L S P E D R E E L V D G
1081 CACAAGACCTAGAAGAAAGAAACATGACTACCGCATAGCCCTATTGGAGGCTCTCAACC
T R P R R K K H D Y R D I A L F G G S Q P
1141 ACAGTCTGTAGATATTTAACCCTAAGGATTATAGCTGGACAGACATCCGCTGCCPCTT
Q S C R Y F N P K D Y S W T D I R C P F
1201 TGAAAAACGAAGAGATGCAGCATGCGTGTGTTGGGACAATGTAGTATACATTTGGGAGG
E K R R D A A C V F W D N V V Y I L G G
1261 CTCTCAGCTTTCCCAATAAAGCGAATGGACTGCTATAATGTAGTGAAGGATAGTGGTA
S Q L F P I K R M D C Y N V V K D S W Y
1321 TTCGAAATGGGTCTCCGACACCTCGAGACAGCCTTGTGCTGCTGCTGAGAGCA
S K L G P P T P R D S L A A C A A E G K
1381 AATTTATACATCTGGAGGTTCAGAAGTAGGAAACTCAGCTCTGTATTTATTTGAGTGCTA
I Y T S G G S E V G N S A L Y L F E C Y
1441 TGATACGAACTGAAAGCTGGCACACAAGCCAGCATGCTGACCCAGCGCTGCAGCCA
D T R T E S W H T K P S M L T Q R C S H
1501 TGGGATGGTGAAGCCAATGGCCTAATCTATGTTTGTGGTGAAGTTTAGGAAACAATGT
G M V E A N G L I Y V C G G S L G N N V
1561 TTCTGGGAGAGTCTTAATTCCTGTGAAGTTTATGATCCTGCCACAGAAACATGGATGA
S G R V L N S C E V Y D P A T E T W T E
1621 GCTGTGCTCAATGATTGAAGCCAGGAAGAATCATGGGCTGGTATTGTAAGACAAGAT
L C P M I E A R K N H G L V F V K D K I
1681 ATTTGCTGTGGGTGCTCAGAATGTTTAGGTGCTGACCAATGTGGAATATTACGATAT
F A V G G Q N G L G G L D N V E Y I D I
1741 TAAGTTGAACGAATGGAAGATGGTCTCACCATGCCAATGGAAGGGTGAACAGTGAATG
K L N E W K M V S P M P W K G V T V K C
1801 TGCAGCAGTTGCTCTATAGTTTATGCTTGGTGGTGTTCAGGGTGGTGGTTCGATAGG
A A V G S I V Y V L A G F Q G V G R L G
1861 ACACATTTCTCGAATATAATACCGAAACAGACAAATGGGTTGCCAACTCCAAAGTTCGTGC
H I L E Y N T E T D K W V A N S K V R A
1921 TTTCCAGTCACAAGTTGTTAATTTGTGTTGTCGATACTTGTGAGCAAATGAAGAGAC
F P V T S C L I C V V D T C G A N E E T
1981 CCTTGAACATgaaaaatgagtggacttcagactcatcagagactctaaaaatagccac
L E T
2041 cagtgcctttgttccaggagtttgggtgacaaaagtttgggttgggttttggtaaagaaag
2101 tttcaagtgaatgaggttccataaaaaatagatgtttcttttatatggatttcccttaatt
2161 caaagatcatattttagctggccacaaaaccaagaacatactagcaagaaaacttgaaa
2221 aagtataagcatttgttaaaaatgtgaatttcttgaatgaatttcacatttgtaactatg
2281 attttggcagaatagaagattggctcatcagtgagcgcagatcttagctctagattct
2341 atttcatgcatcacagaagtgcataacggttaggtctgtttgtgctcagtaagaacta
2401 agaaatagatgaattgtaagtaagatgggaactcagatggagcagcttagtctcaca
2461 gtttctgtctatttatttatgtgccaatgtattccattttaaagtaagccag
2521 agtgagtcaaggcatatacacactttctcaaaaacttccaaacagatttgggggttta
2581 atatgtccaactcctcatgaaatataatcaatccacttaaaatattccattcttttaac
2641 ataaaatgtaaaagcttagcaccatcatattatgtctctgttttataccagtggttaa
2701 aaaaggattctgcctcttagtctcactgttaaaataaaacccaatcatagtaagtgatt
2761 aactagcaaaaagtaaaagctatttatagcaaatcttagatcattagaaaagcactggta
2821 gttgtacaatatcagtggtgactttgacttcttaacagagatcatgaattctttccct
2881 tagccaaaacatgaaatatttaacctagttgtctctaaaagtttggtaatcatgagttag
2941 atatatgtcatctcctattcattgttttatgtgatcaataaacttttacaacccaac
3001 tactcattcctcctagtaatactttgacttttctcactgtgtatggaaatgaaacatgta
3061 aagctgtcacaatcaatgtttttatctgataatattaaatatttttaacttaaaaaaa
3121 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

図6 KU-BL-2の塩基配列

A



B

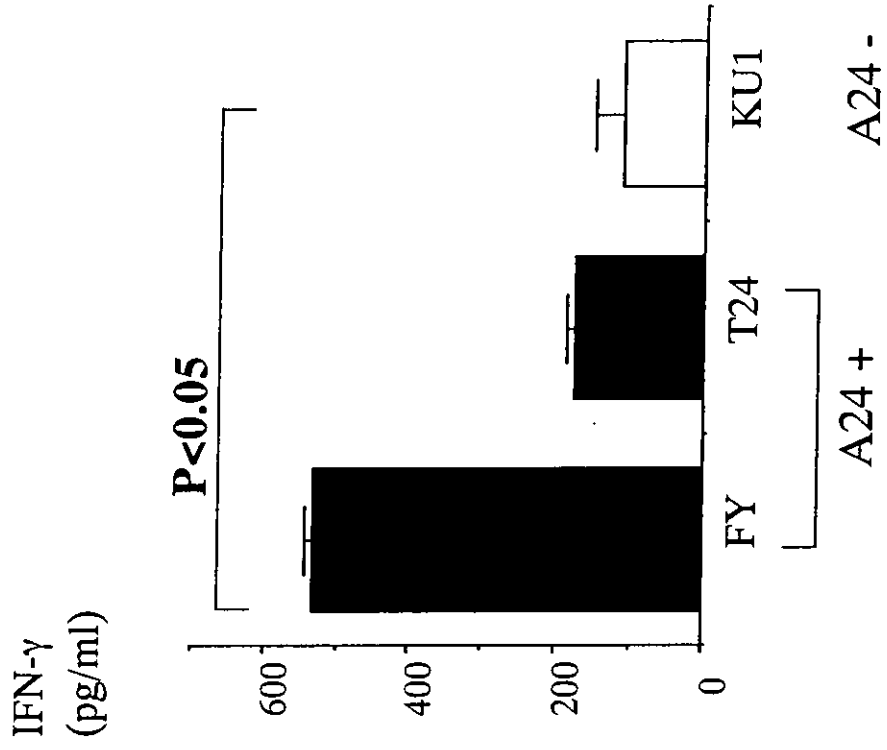


図7 KU-BL-2ペプチドによるCTLの誘導

2 - 3 脳腫瘍抗原の同定

要約

グリオーマ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、発達中の中枢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たが、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。ウエスタンブロット法と ELISA 法の解析により、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遺伝子発現は正常組織では精巢に、またグリオーマで高い発現が認められた。ウエスタンブロットにより、SOX6 タンパクは成人正常脳には認められず、グリオーマ組織で発現していた。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、かつグリオーマ患者血清中に抗体が認められることを示している。

はじめに

悪性のグリオーマは脳腫瘍の中では進行が早く、治療成績も悪い。現在の標準治療は外科的切除後の放射線療法と化学療法であるが、生存期間は1年未満であることから、新しい治療法の開発が求められている(1)。中枢神経系は抗原提示細胞のMHC発現のレベルが低いこと、血液脳関門が免疫グロブリンや補体の流入をブロックすることなどから、長い間免疫寛容部位として考えられている。しかし最近の報告では、活性化したリンパ球が血液脳関門を通過すること、中枢神経系の抗原に対して特異的免疫応答が存在することが示されている。ペプチドパルスした樹状細胞を用いた悪性グリオーマ患者へのワクチン療法では、全身性の抗腫瘍免疫反応だけでなく頭蓋内でのT細胞の浸潤も認められている。これらの結果は、中枢神経系が免疫寛容部位なく免疫応答が十分に起こることを示唆している。

最近種々の癌抗原が同定され、腫瘍特異的な免疫療法の可能性が示されている。その中でも癌精巣(CT)抗原は癌細胞と正常組織では精巣だけに発現することから免疫療法のよいターゲットとして注目されている(2)。MAGE-3、NY-ESO-1、HOM-MEL-40/SSX-2、SSX-1、SSX-4、HOM-TES-1/SCP-1、HOM-TES-85の7つのCT抗原の発現を見てみると60%の astrocytoma で少なくとも1つは発現していることから、グリオーマに対するCT抗原を用いた免疫療法は有効ではないかと考えた(3)。癌患者血清を用いた発現クローニング法であるSEREX法は抗原を同定するための有効な方法で、NY-ESO-1(2)やMAGEなどが同定されている。これらの抗原はT細胞を用いた発現クローニング法によっても同定されており、SEREX法により同定される抗原はB細胞だけでなくT細胞にも認識されることを示している(4)。今回我々は、精巣のライブラリーとグリオーマ患者血清を用いてSEREX法により転写因子であるSOX6をグリオーマ抗原として同定した。