

## 研究対象とする検体、細胞株および研究方法

### 患者検体

本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会にて、#1-21-2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。Glioma(WHO grade IV)、anaplastic-astrocytoma(WHO grade III)、diffuse astrocytoma(WHO gradeII)を用いた。組織は液体窒素で凍結後-80度で保存した。

### ライブラリーの作製

成人正常精巢のトータル RNA を Clontech より購入した。RNA プロテイナーゼ K 処理ののち、Oligotex-dT30 super (TAKARA, Kyoto, Japan) で全 RNA から poly A<sup>+</sup> RNA 選択操作を 2 回繰り返す事で得た試料を mRNA とし 5 $\mu$ g をライブラリーの作製に用いた。 $\lambda$ ファージ発現ライブラリーは $\lambda$  ZAP Express cDNA ライブラリーキット(Stratagene, California, USA)を用い、プロトコールに従い作製した。 $\lambda$ ファージライブラリーのサイズは  $3 \times 10^6$  pfu であった。

### SEREX スクリーニング

プレートあたり約 2 万のファージプラークが生じるように宿主大腸菌(XL 1-Blue MRF')と $\lambda$ ファージライブラリーを軟寒天培地中で混合し、直径 15 cm のシャーレに調製した NZY 寒天培地上に重層した。1 血清あたり、50 枚のプレートを用意した。プレートを 42 °C で約 4 時間、プラークのサイズが 1 mm 程度になるまで培養し、予め 20 mM の IPTG に浸して乾燥させておいたニトロセルロース膜を上へのせ、さらに、37°C で 4 時間培養することによりニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.05 % Tween-20) で 2 回洗浄し、さらに TBST-SM (TBST に 5 % skim milk を加えた溶液) でブロッキングを行った。

組換え体タンパクを転写したニトロセルロース膜と 100 倍に希釈した血清を

室温で4時間反応させた。ニトロセルロース膜を TBST で 3 回洗浄後、4000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト Fc $\gamma$  IgG 抗体を加えて室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、TBS で 2 回洗浄し、nitroblue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate で発色させた。

陽性クローンの塩基配列を決定するため、 $\lambda$  ベクター中のプライマー配列である T3 (5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) と T7 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C) で PCR 反応を行った(94 °C 1 分, 55 °C 1 分, 72 °C 2 分, 35 サイクル)。PCR 産物を精製し、Big Dye Terminator Sequence Kit (Perkin Elmer ABI, California, USA)を用いて、T3 プライマーで PCR を行い、ABI310 シークエンサーで配列を決定した。また遺伝子データベース(米国、NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)でホモロジー検索を行い、候補抗原遺伝子を推測した。

#### SOX6のHMG boxドメインタンパクに対する患者血清中のIgG抗体のウエスタンブロット法による分析

SOX6 の HMG box ドメインを pET32a にサブクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) LysS (Novagen) で組換えタンパクを発現させた。SOX6-HMGはHisTrap chelating affinity column (Amersham Pharmacia)を用いて精製した。精製した SOX6-HMGは当量の2xSDS bufferを加え、3分間熱処理した。10 の組換え SOX6-HMGタンパク/laneを10% SDS-PAGE gelで泳動後ニトロセルロース膜に転写した。100倍に希釈した患者血清と一晚反応後、4000倍に希釈したanti-human Fc $\gamma$  antibody conjugated with alkaline phosphatase (Cappel, Aurola, Ohio) で反応後、Nitro blue tetrazolium、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を用いて検出した。

#### ELISA 法による抗SOX6抗体価の測定

SOX6-HMG タンパクを PBS で 1 $\mu$ g/ml に希釈し、100ul/well で 96-well plates にコートした。対照の well は SOX6-HMG を含まない pET32a タンパクを用いた。

ブロッキング後、100-50,000 倍に希釈した 100  $\mu$ l 患者血清を添加し 一晚反応させた。5000 倍に希釈した 100 $\mu$ l の goat anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> labeled with horseradish peroxidase (Coulter Immunodiagnostics, Krefeld, Germany) で 2 時間反応後 tetramethylbenzidine (Sigma, St. Louis, MO) を基質として用いた。

#### RT-PCRおよびノーザンプロット法

正常各組織のトータルRNAはClontech laboratories, Inc. (California, USA)から購入した。患者組織からのトータルRNAの抽出はTRIzol method (Invitrogen, Calsbad, CA)で行った。cDNAの合成は5ug total RNA, oligo (dT), Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Takara, Kyoto)を用いた。SOX6のPCRプライマーには 5'- GATGCCATCAACTCCACAGC (forward), 5'- GCTGCAGAGCCATTCATTGC (reverse) を用いた。 $\beta$ -actin のプライマーには5'- GGCACCCAGCAATGAAG (forward), 5'- GCCGATCCACACGGAGTACT (reverse) を用いた。

定量RT-PCRはSYBR Greenを蛍光試薬としてABI prism 7700を用いて行った。グリオーマ組織におけるSOX6の発現は $\beta$ -actinを用いてノーマライズしたのち、threshold cycle (Ct)を用いて比較した。

ノーザンプロットは各10ugのトータルRNAを添加し変性アガロースゲルで電気泳動したあとナイロン膜に転写した。SOX6の2250-2479bpの領域をアイソトープラベルしプローブとして使用した。シグナルはBAS 5000(Fujii film)を用いて検出した。

#### 免疫組織染色

Paraffin固定した5umの切片をxyleneで処理後、heat-based antigen retrieval法で処理した。内因性のperoxidaseをブロックした後、非特異的吸着を5%BSAでブロックした。Rabbit anti human SOX6 polyclonal antibody (Chemicon)で処理後、2次抗体(Universal Immunoperoxidase Polymer, Histofine simple Stain MAX PO,

Nichirei Corporation Japan) とDABを用いて発色させた。腫瘍切片の増殖活性はKi-67タンパクを認識するMIB-1抗体を用いた。

## 結果

### グリオーマ抗原の単離

ヒト精巢より作製した cDNA ライブラリーと 4 名のグリオーマ患者血清を用いて 100 万クローンのスクリーニングを行い、11 個の遺伝子を単離した。この中で 6 個単離された SOX6 は Sry-relatedHMG box 遺伝子で、グリオーマ患者血清で強い抗原性を示した。単離された SOX6 遺伝子は 2 種類あり、1 クローン得られた長い方は 3.5kb で 787 アミノ酸をコードしており、5 クローン得られた短いものは 1.8kb で C 末側の 461 アミノ酸をコードしていた。これらの配列に、変異は認められなかった。

### SOX6 に対する血清中の IgG 抗体の分析

SOX6 に対するグリオーマ、健常人、他の癌患者血清中の IgG 抗体の存在を調べた (表 1)。36 名中 12 名のグリオーマ患者血清中に抗体が存在した。しかし、14 例の他の脳疾患 (meningioma, malignant lymphoma, metastatic brain tumor, Parkinson's disease, craniopharyngioma, central neurocytoma, brain abscess, subarachnoid hemorrhage) では抗体は検出されなかった。54 名の他の癌患者血清では、メラノーマ 10 例、食道癌 10 例、膀胱癌 10 例、大腸癌 7 例、腎癌 7 例から抗体は検出されなかったが、膵癌患者 10 例中 1 例と、健常人血清 37 例中 1 例で認められた。

グリオーマ患者について WHO のグレードにしたがって解析してみると、グレード 4 では 7/19(36.8%)、グレード 3 では 4/14(28.6%)、グレード 2 では 1/3(33.3%)であり、グリオーマのグレードと SOX6 の抗体産生には関連性が認められなかった。また短い SOX6 に対しても長い SOX6 同様の反応が認められたことから、SOX6 の SOX6-HMG を含む C 末端側(326-787)461 アミノ酸を抗体が認識していることが明らかになった。

### SOX6 のエピトープ解析

SOX6 の DNA 結合領域ある SOX6-HMG がグリオーマ患者血清中の IgG 抗体に認識されるかどうかを、His-tag を付加した組換えタンパクを作製し検討した。図 1 に示したように、SOX6 陽性のグリオーマ患者血清は SOX6-HMG をウエスタンブロット法で認識した。この陽性患者に対する抗体価を調べるために、組換え SOX6-HMG タンパクをプレートにコートし酵素標識抗体法を用いてグリオーマ患者と健常人血清中の抗体価を測定した (図 2)。グリオーマ患者では健常人に比べ血清中の SOX6 に対する抗体価が有意に高かった(p,0.05)。これらの結果は SOX6-HMG はグリオーマ患者血清中の IgG に認識されるエピトープ部位であることを示唆していた。

### グリオーマにおける SOX6 遺伝子の発現

グリオーマと正常組織における SOX6 遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べた。SOX6 はグリオーマと正常では精巣に強く発現しており、脳、腎、筋肉に弱い発現が、また他の成人の正常組織には発現が認められなかった (図 3)。そこで SYBR Green を用いて定量 RT-PCR を行い、発現量を比較したところ、調べた全てのグリオーマで正常の成人脳より高い発現が認められた (図 4)。

SOX6 の転写産物について、マウスとヒトで大きさの違いの検討が行われており、その差は 3' と 5' の非翻訳領域に由来することが報告されている(5-7)。マウスの場合、小さいトランスクリプトが成人精巣で優勢に発現しているが、大きいのは発育中の脳に認められるが、成長に伴い減少することが報告されている(8)。ヒトのグリオーマの場合どのようになっているかをノーザンブロット法にて調べた (図 5)。長いバンドが胎児脳とグリオーマに、短いバンドが精巣に認められたが、成人脳にはどちらの発現も認められなかった。

### グリオーマにおける SOX6 タンパクの発現

SOX6 タンパクがグリオーマで発現しているかを抗 SOX6 抗体を用いてウエスタンブロット法にて検討した。用いた抗体は SOX6 を導入した 293T 細胞を認識したが、導入していない細胞を認識しなかった。また抗体はグリオーマを

認識したが、正常脳組織は反応しなかった（図6）。

### グリオーマにおける免疫染色

グリオーマのホルマリン固定標本から切片を作製し、SOX6の発現を調べた。調べた18例全てのグリオーマで核にSOX6の発現を認めた(図7)。しかし癌でない脳からも極少量のSOX6陽性細胞が認められた。細胞の増殖をMIB染色により確認したが、SOX6の発現とは関係がなかった(表2)

。

## 考察

グリオーマ患者血清を用いた SEREX 法により SOX6 を同定した。SOX6 は 1/3 のグリオーマ患者に発現しており、その抗体価はグリオーマ患者血清中で有意に高値を示した。SOX6 が抗原性を持つ理由の一つとして遺伝子変異が考えられるが、変異は認められないことから、グリオーマでの SOX6 の特異的な発現により生じた特異的免疫反応と考えられた。また SOX6 に対する抗体は他の腫瘍ではほとんど認められないことから、SOX6 はグリオーマの免疫療法に有効な抗原と考えられた。



## 文献

1. Prados MD, G. P., Philips TL Highly anaplastic astrocytoma: review of 357 patients treated between 1977 and 1989. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 23: 3-8, 1992.
2. 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.
3. Sahin, U., Koslowski, M., Tureci, O., Eberle, T., Zwick, C., Romeike, B., Moringlane, J. R., Schwechheimer, K., Feiden, W., and Pfreundschuh, M. Expression of cancer testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res*, 6: 3916-3922, 2000.
4. 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.
5. Lefebvre, V., Li, P., and de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J*, 17: 5718-5733, 1998.
6. Hagiwara, N., Klewer, S. E., Samson, R. A., Erickson, D. T., Lyon, M. F., and Brilliant, M. H. Sox6 is a candidate gene for p100H myopathy, heart block, and sudden neonatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4180-4185, 2000.
7. Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M. F., Horton, J. P., and Brilliant, M. H. Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene*, 265: 157-164, 2001.
8. Connor, F., Wright, E., Denny, P., Koopman, P., and Ashworth, A. The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res*, 23: 3365-3372, 1995.

Table 1 The presence of IgG antibodies against SOX6<sup>1</sup>

<i>Sera</i>	<i>Positive/total (%)</i>
<i>WHO grade IV</i>	7/19 (36.8%)
<i>WHO grade III</i>	4/14 (28.6%)
<i>WHO grade II</i>	1/3 (33.3%)
<b>Glioma</b>	<b>12/36 (33.3%)</b>
<b>Other brain diseases<sup>2</sup></b>	<b>0/14 (0%)</b>
Melanoma	0/10 (0%)
Esophageal cancer	0/10 (0%)
Pancreatic cancer	1/10 (10%)
Bladder cancer	0/10 (0%)
Colorectal cancer	0/7 (0%)
Renal cell cancer	0/7 (0%)
<b>Healthy individuals</b>	<b>1/37 (2.7%)</b>

<sup>1</sup> The presence of IgG antibodies against SOX6 was evaluated by screening lambda phage infected *E. coli* on nitrocellulose membranes with sera at 1:100 dilution.

<sup>2</sup> Other brain diseases included four meningiomas, two malignant lymphomas, two metastatic brain tumors, two Parkinson diseases, craniopharyngioma, central neurocytoma, brain abscess, and subarachnoid hemorrhage.

Table 2. Association of the SOX6 expression with immunogenicity and proliferation status in gliomas

Case No.	Histology	Age Sex	Anti-SOX6 antibody in serum <sup>1</sup>	MIB-1 <sup>2</sup> Immunohistochemistry <sup>3</sup>
< WHO grade IV >				
GB1	Glioblastoma	25 F	+	41.1 +++
GB2	Glioblastoma	31 M	+	12.7 +++
GB3	Glioblastoma	7 M	+	17.7 +++
GB4	Glioblastoma	50 M	NA	14.5 +++
GB5	Glioblastoma	34 F	+	0.9 +++
GB6	Glioblastoma	41 F	+	0.8 +++
GB7	Glioblastoma	21 F	+	2.1 ++
GB8	Glioblastoma	14 M	+	28.1 +
< WHO grade III >				
AA1	Anaplastic Astrocytoma	28 M	+	4.5 +++
AA2	Anaplastic Astrocytoma	26 M	-	5.2 ++
AA3	Anaplastic Astrocytoma	36 M	-	1.2 ++
AA4	Anaplastic Astrocytoma	30 F	+	2.3 +
AA5	Anaplastic Astrocytoma	37 F	+	1.5 +
AA6	Anaplastic Astrocytoma	32 F	+	NA
OA1	Oligoastrocytoma (grade III)	31 M	-	15.1 +++
OA2	Oligoastrocytoma (grade III)	41 M	-	5.2 +++
OA3	Oligoastrocytoma (grade III)	51 M	-	6.8 +
< WHO grade II >				
DA1	Diffuse Astrocytoma	3 F	-	2.7 +
OA4	Oligoastrocytoma (grade II)	7 F	+	NA ++

<sup>1</sup> The seroreactivities of SOX6 are described as +, positive; -, negative.

<sup>2</sup> The proliferating cell indexes were analyzed in a total of more than 1,000 tumor cells on more than three areas expressing the highest numbers of MIB-1-positive nuclei.

<sup>3</sup> The patterns of staining are described as -, negative or faint stainings; +, positive in less than 30% of tumor cells; ++, positive in 30% to less than 70% of tumor cells; +++, positive in more than 70% of tumor cells. NA, not available; M, male; F, female.

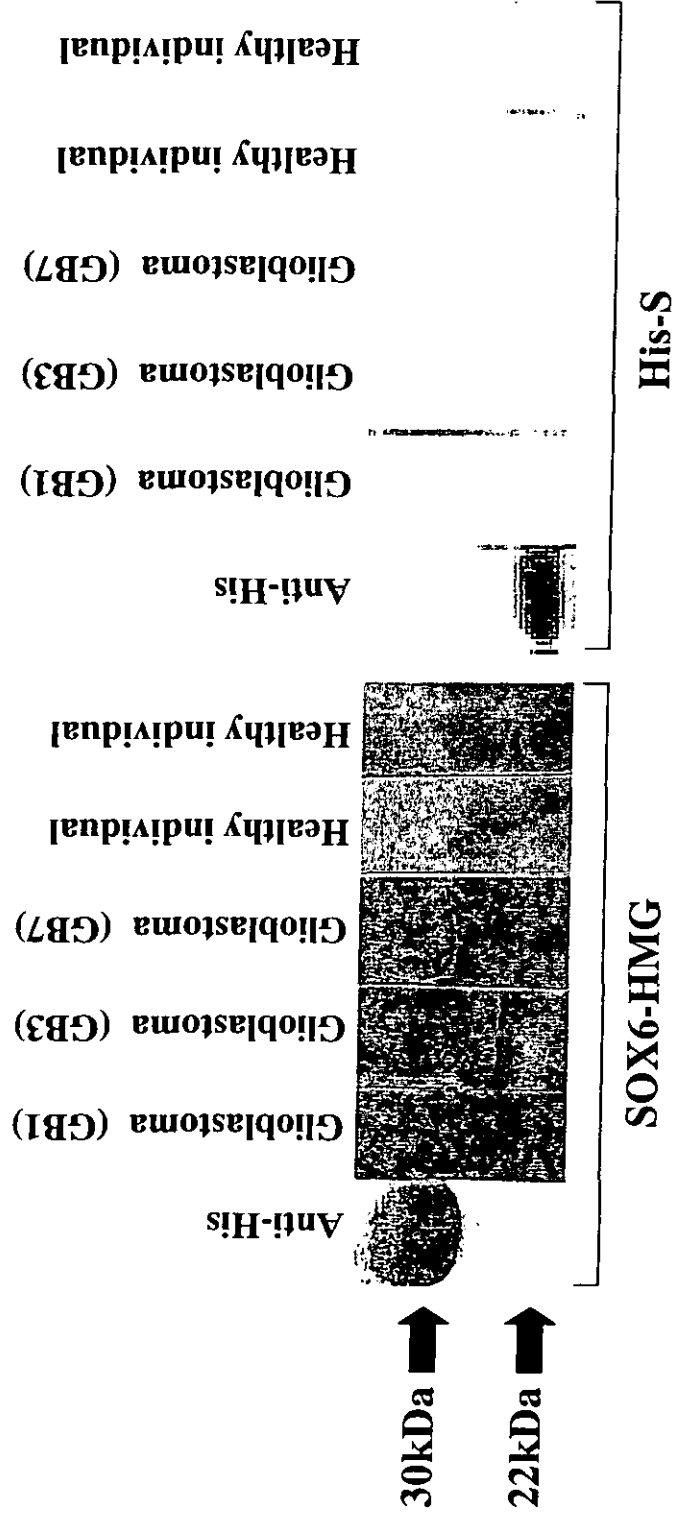


図1. ウェスタンブロット法でグリオーマ患者血清中に SOX6-HMGに対する抗体が存在する

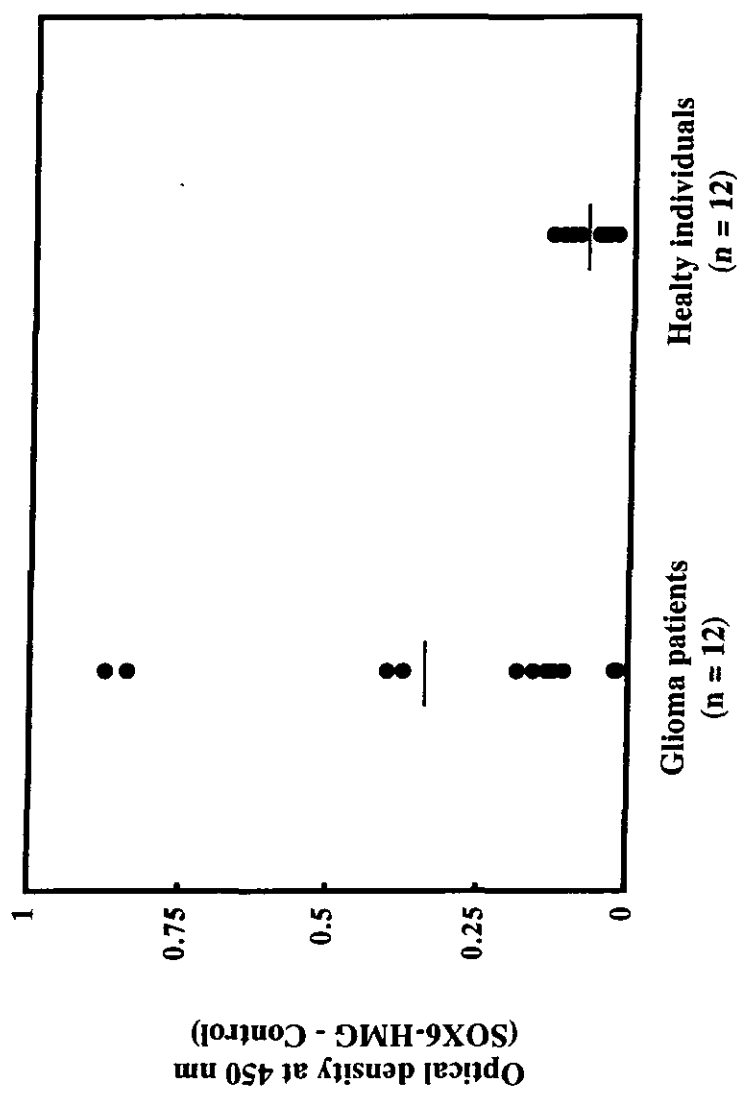


図2. SOX-HMGを用いたELISA法でグリオーマ患者血清は有意に高値を示す

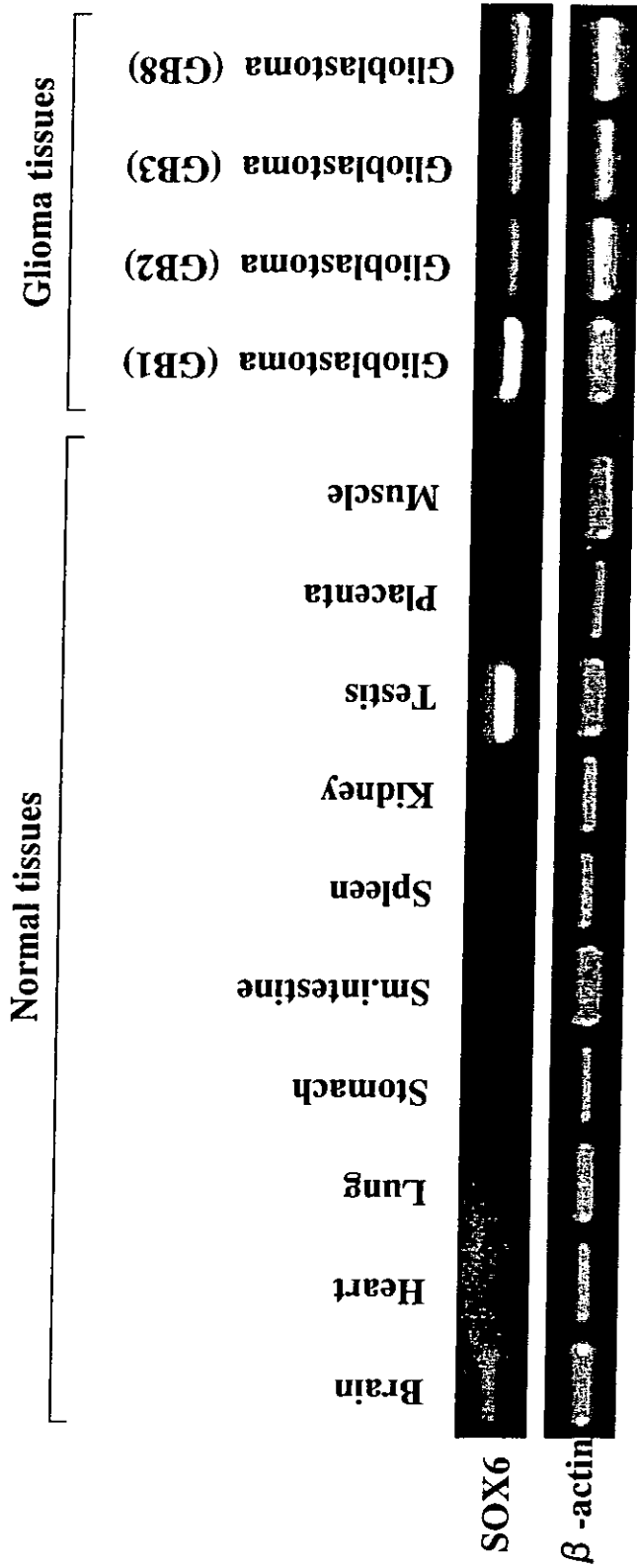


図3. RT-PCR法によるSOX6の発現

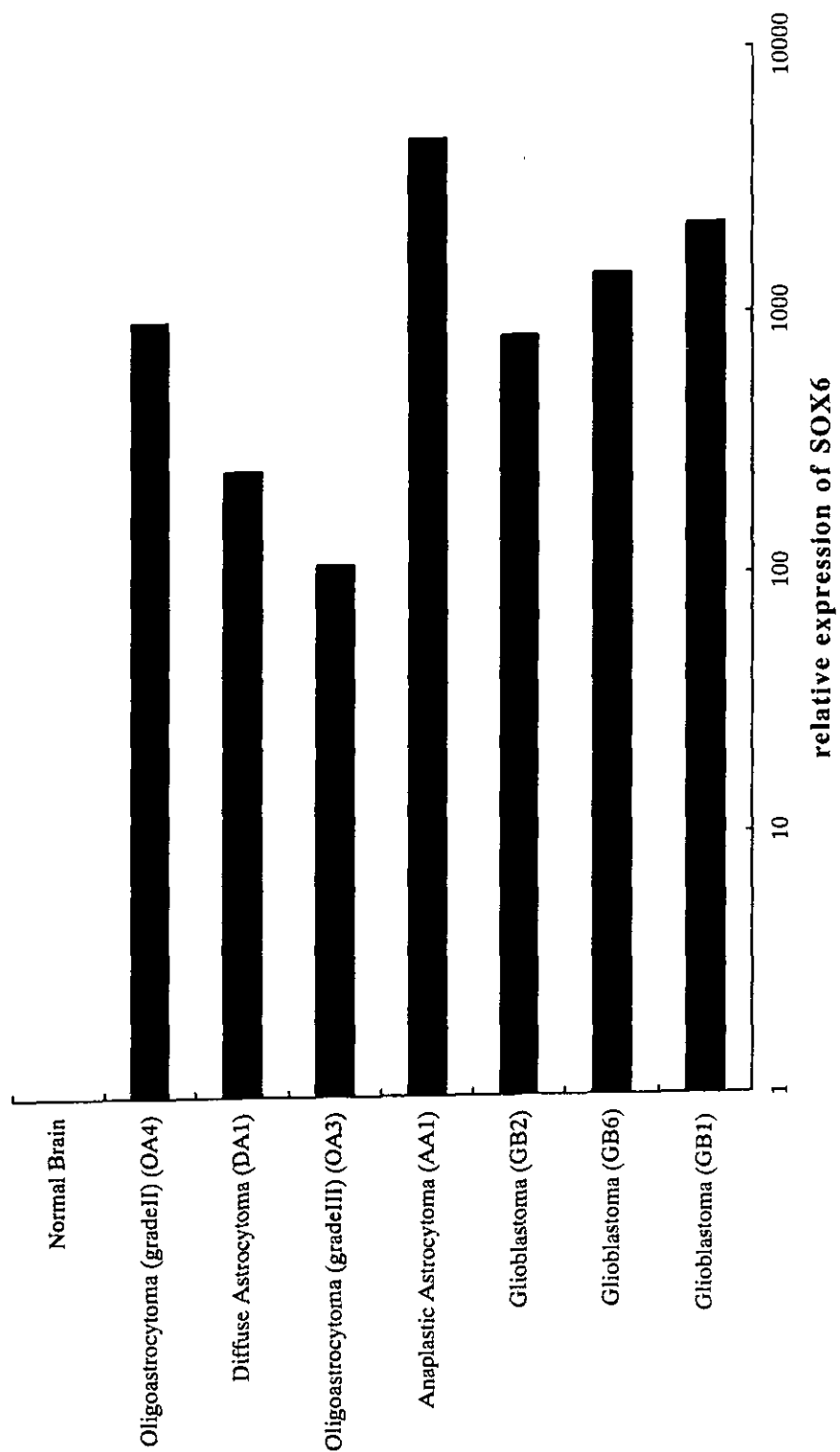


図4. 定量RT-PCR法でSOX6はグリオーマに高発現している

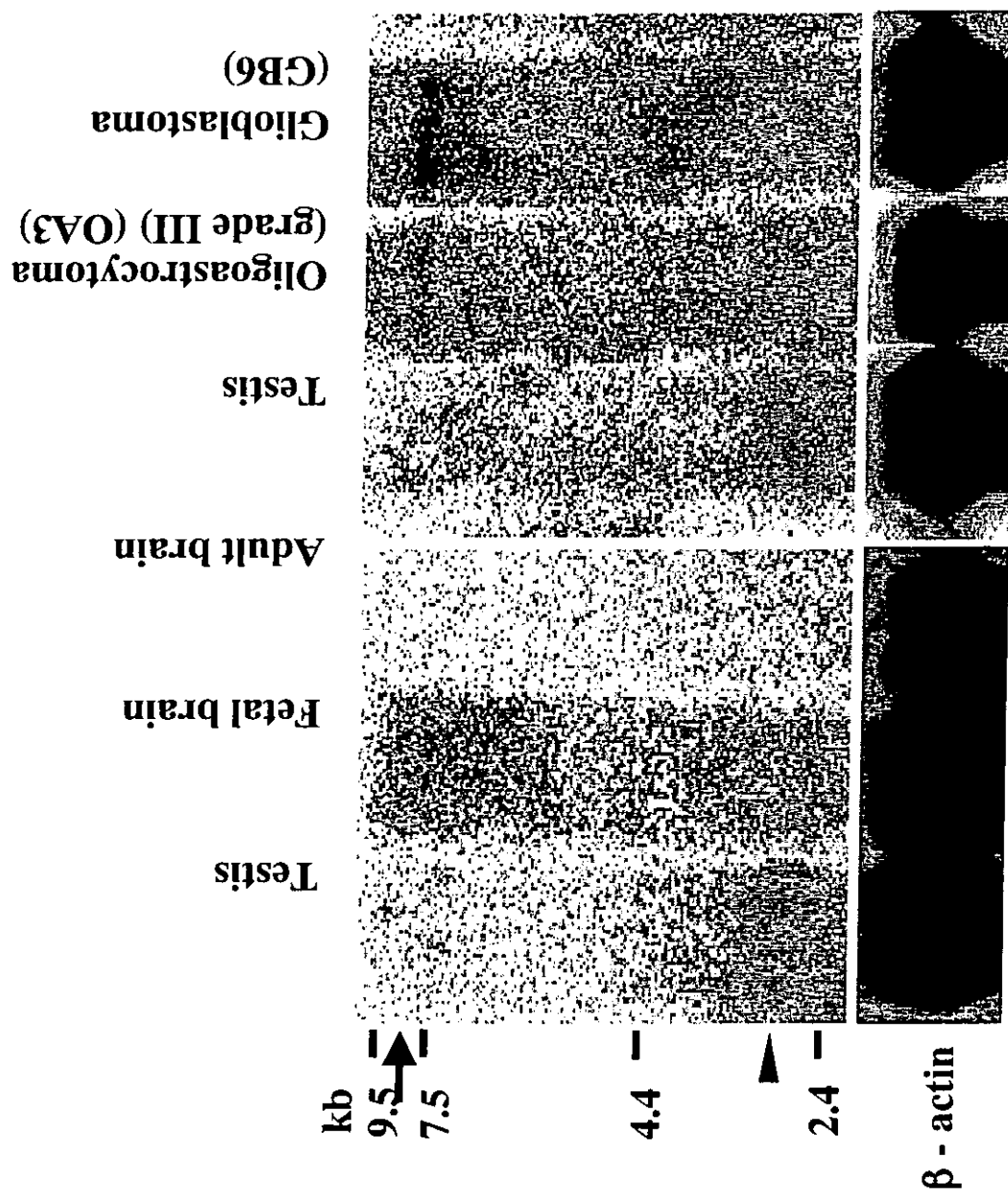


図5. ノーザンブロット法によるSOX6の発現



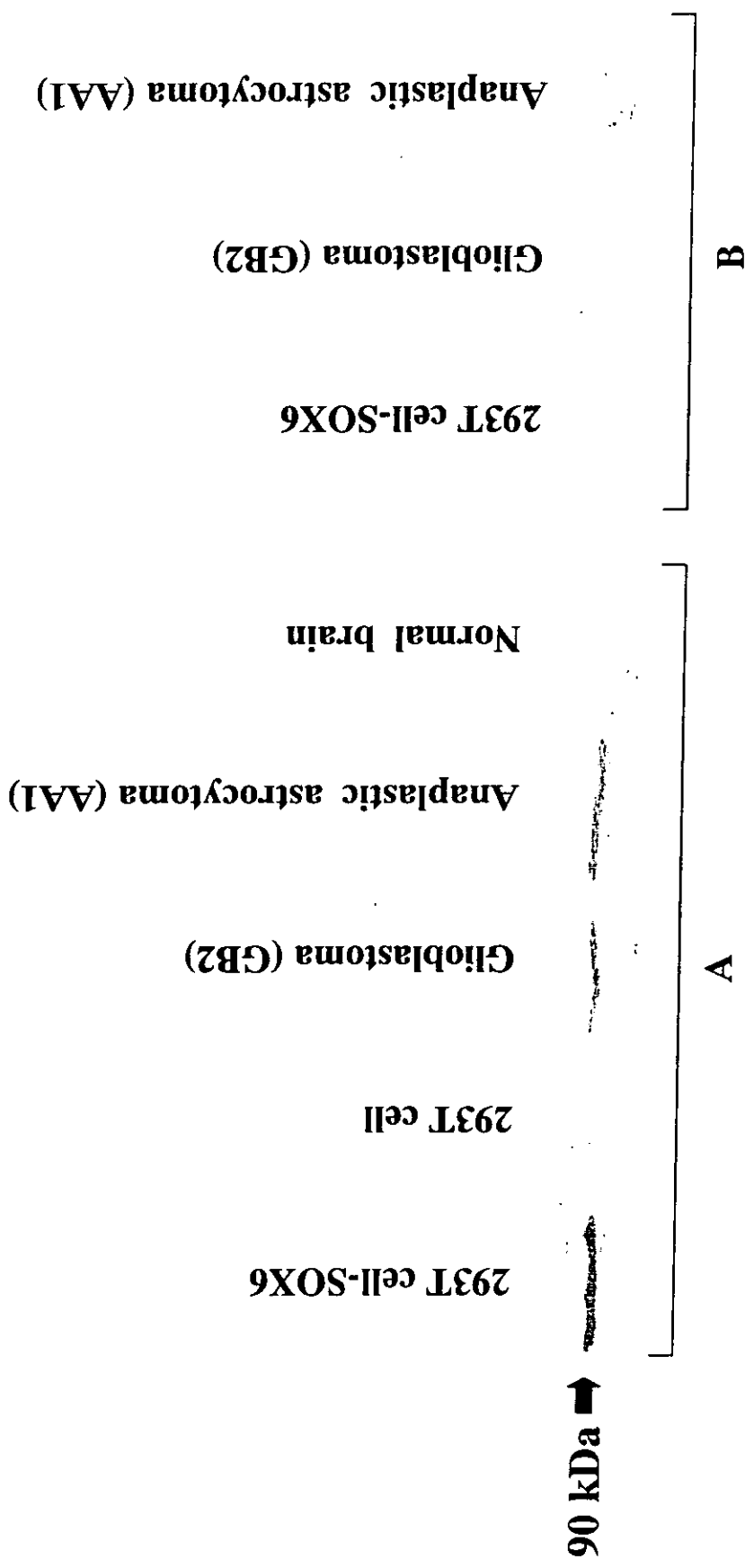


図6. ウェスタンブロット法によるSOX6タンパクのグリオーマ細胞での発現の確認

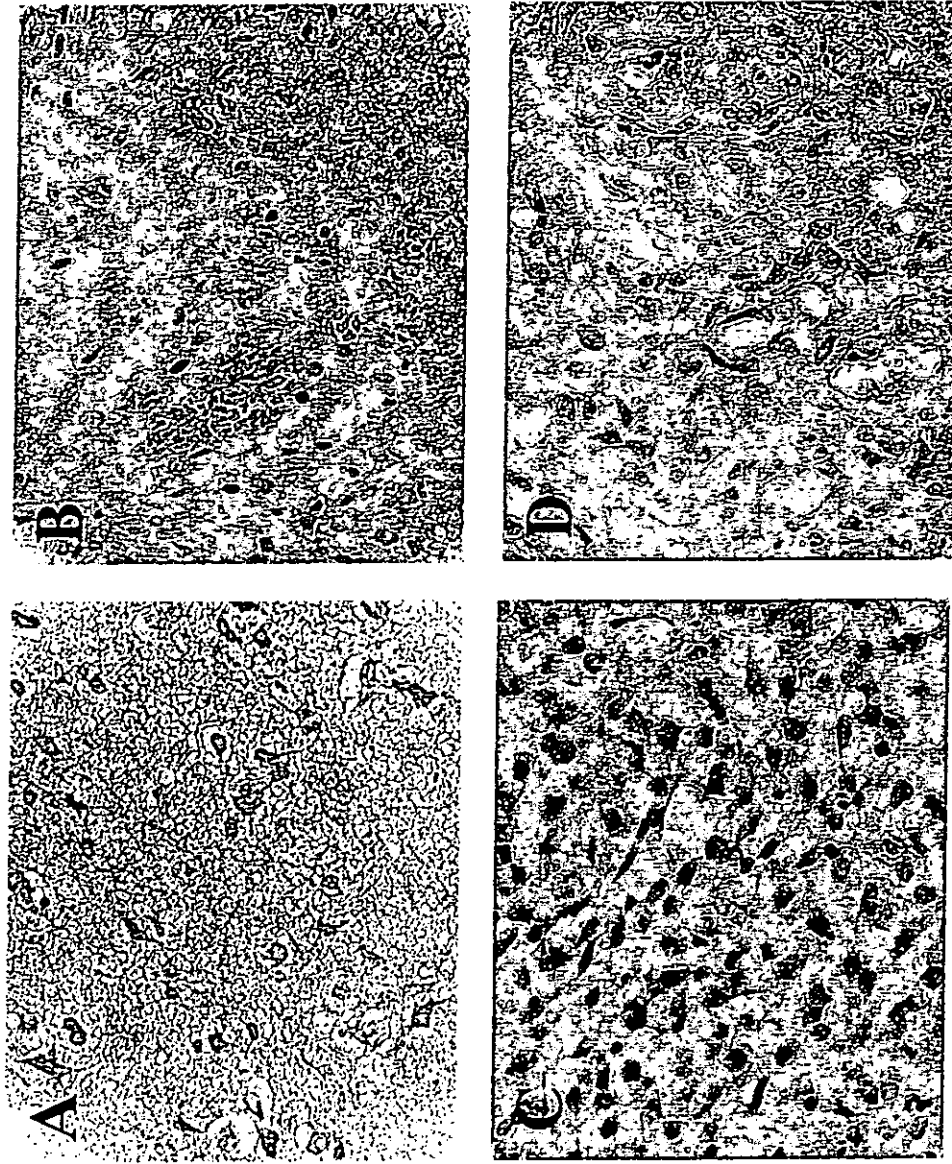


図7. グリオーマ組織での免疫染色によるSOX6発現

## 2-4 SEREX 法による子宮体癌抗原の単離と解析

### 要旨

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、癌細胞では子宮体癌細胞株 3 例中 2 例、メラノーマ 7 例中 4 例、肺癌 3 例中 1 例、腎癌 4 例中 2 例に発現が認められた。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ウエスタン・ブロット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、子宮体癌患者 45 例中 5 例、メラノーマ 24 例中 2 例、大腸癌 32 例中 2 例に検出された。CAGE に対するウサギ抗体を作製し実際に細胞で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-1b) 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 抗体価を、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。これらの患者はウエスタン・ブロット法で検出された患者と一致した。また健常人の抗体価の平均+2SD を境にすると、子宮体癌患者のみで抗体価の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。このことから、抗 CAGE 抗体の産生は MSI による変異タンパクが産生によるものと考えられた。さらに変異が予想される部位の DNA 配列を子宮体癌で調べたところ変異がないことから、抗体の産生は MSI による直接的な変化でなく 2 次的な効果によるものと考えられた。

## 緒言

子宮体癌の治療法としては現在外科的摘除以外に有効な方法がなく、しかも外科的摘除で治癒が期待できるのは進展度の低い症例である(1)。化学療法の効果は限られ、放射線療法も効果は低い。このような観点から、新しい治療法の開発が期待されている。SEREX 法による癌抗原の検索は多くの癌で行われているが、子宮体癌患者血清を用いた癌特異抗原を検索したとする報告は無い。しかしながら、SART2 ペプチドを用いて末梢血単核球 (PBMC) を刺激することで、子宮体癌細胞株を融解させ得る PBMC を得たとする報告もあり、子宮体癌に対する免疫療法が有効であると考えられる。我々は、子宮体癌に対する免疫療法を行なうための前段階として、子宮体癌に発現する癌抗原を同定することは非常に重要であると考え当研究を行なった。

## 研究対象とする検体、細胞株および研究方法

### 癌細胞株

子宮体癌細胞株 Ishikawa(2)、SNGII(3)、HeckIb(4)、卵巣癌細胞株 RMGI(5)、RMGII(6)は F-12+10 % FCS で培養した。悪性黒色腫細胞株である 888mel、A375mel、586mel、301Amel、脳腫瘍細胞株 T98G、肺腺癌細胞株 LU99、肺扁平上皮癌細胞株 EBC1、肺小細胞癌細胞株 RERF-LC-MA、腎癌細胞株 RCC7、膀胱癌細胞株 KU7、前立腺癌細胞株 PC3、乳癌細胞株 MDA231、AML 細胞株 HL60、T 細胞白血病細胞株 Molt4 は RPMI + 10 % SCF で培養した(7)。膀胱癌細胞株 PK1 は RPMI + 10 % FCS + 2 mM L-glutamine, +10 mM hepes + 6  $\mu$ g / l EGF + 150 units / l insulin + 0.5 mg / l hydrocortisone + 10 mg / l transferin にて培養した。

### 正常組織

正常各組織 (脳・心臓・腎・脾・肝・小腸・筋・肺・精巣・胎盤・胃・大腸) の全 RNA は Clontech laboratories, Inc. (California, USA) から購入した。当研究室で樹立した Fibroblast 細胞株、T 細胞株 1362TIL1 および 1362TIL2 は DMEM + 10 % FCS で培養した。DMEM + 10 % FCS で培養した。EB virus 感染 B 細胞株は RPMI + 10 % FCS で培養した。

### 患者検体