

子宮体癌患者血清と組織、大腸癌患者血清と組織、腎癌患者血清、食道癌患者血清、膀胱癌患者血清、悪性黒色腫患者血清、膵癌患者血清を用いた。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」「マイクロサテライト不安定性陽性癌の特異的癌抗原の同定・解析と新しい診断・治療法の開発」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。

子宮体癌細胞発現ライブラリーの作製

子宮体癌細胞株 Heck1b、SNGH、Ishikawa を各々F-12 (含有 10 % FCS)中で培養し、細胞数約 10^8 まで増殖させた。グアニジン溶液中で細胞を懸濁し、塩化セシウム密度勾配遠心により全 RNA を抽出した後、電気泳動を行って RNA の精製度を確認した。各々1 mg の RNA を分取し、混合後プロテイナーゼ K 処理を行った。さらに Oligotex-dT30 super (TAKARA, Kyoto, Japan) で全 RNA から poly A⁺ RNA 選択操作を 2 回繰り返す事で得た試料を mRNA とし 5 μ g をライブラリーの作製に用いた。 λ ファージ発現ライブラリーは λ 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。 λ ファージライブラリーのサイズは 2.5×10^6 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(XL1-Blue MRF')と λ 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 枚の培地を用意した。プレート培地を 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 時間培養した。ブロット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。

組換タンパクを発現させたニトロセルロース膜に 100 倍に希釈した患者血清を室温で 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 γ 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、nitrobluetetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolil-phosphate で発色させた。

塩基配列を決定するため、 λ 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 3')と T7 (5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3') 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。

RT-PCR

患者組織からのトータルRNAの抽出はTRIzol (Invitrogen, Calsbad, CA) で行い DNase I (Takara, Kyoto, Japan) 処理の後 Super Script II reverse transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いてcDNAを作製した。CAGEのPCRプライマーには 5'- CTTCCAACCGTATGTAGGCGAG (forward), 5'- CTCCTTGC GTCTTTGTCCAGGT (reverse) を用いた。GAPDH のプライマーには5'- TGAACGGGAAGCTCACTGG (forward), 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA (reverse) を用いた。

His-tagged CAGE の作製

CAGEはDEAD box family であるため、全長を作製すると共通部分が多いことから特異性が低くなると考えられたため、特異的と考えられるORFのうち codon1261 から 1873 の部分を His-tagged CAGE として作製した。5'- taaaagatccTATTTGAAAGATCCTATGAT (forward), 3'- taaaagtcgacTCAACTTAAAAAATAAAACT (reverse)をプライマーに用いて増幅後、*BamH* と *Sall*を用いて切断しpET28a (Novagen, Darmstadt, Germany) に挿入した。E. coli, AD494(DE3)pLys S (Novagen, Darmstadt, Germany)を用いて発現させ、CAGE タンパクは affinity resin HiTrap Chelating (Amersham, Piscataway, NJ) を用いて精製した。得られたHis-tagged CAGE protein は235 アミノ酸からなり予想される分子量は 31.1kDaであった。

抗CAGE 抗血清の作製

上記の方法で作成した CAGE タンパクをウサギに免疫することにより抗血清を作製した (蛋白精製工業、群馬)。

pcDNA3.1 への挿入とトランスフォーメーション

5'- taaaaaggatccATGTCCCACTGGGCCCCAGAG (forward), 3'-
taaaaagcggccgcTCAACTTAAAAAATAAACT (reverse)をプライマーに用いて増幅
後、*Bam*HI と *Not*Iで切断し、 pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) に
挿入した。8 μ g の pcDNA3.1-CAGE プラズミドを Lipofectamine (Invitrogen,
Carlsbad, CA) を用いて 5.0×10^5 NIH-3T3 cells にトランスフォームした。48 間
後、細胞を回収し SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% sodium dodecil
sulfate, 1M 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, bromphenol blue)に溶解した。

CAGEタンパクの発現

癌細胞株におけるCAGEタンパクの発現は作製したウサギ抗血清によりウエ
スタンプロット法で行った。

子宮癌細胞株IshikawaとSNGII、melanoma cell lines 888mel と正常melanocyte
を調製し、 5.0×10^4 cells per laneで10% SDS-PAGE gelを用いて泳動後、ニトロセル
ロース膜 (Hybond ECL; Amersham Pharmacia)に転写した。ブロッキング後1000
倍に希釈したウサギ血清と反応後、4000倍に希釈したgoat anti-Rabbit Fc γ
antibody conjugated with alkaline phosphatase (Cappel, Aurola, Ohio)、Nitro blue
tetrazoliumと5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を用いて検出した。

ウエスタンプロット法によるCAGEのイムノスクリーニング

20 μ g of recombinant CAGE タンパクを10% SDS-PAGE gelで泳動後ニトロセ
ルロース膜に転写した。膜を11枚に切断し、100倍に希釈した患者血清と一晚反
応後、4000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識anti-human Fc γ 抗体
(Cappel, Aurola, Ohio) と nitro blue tetrazolium、5-bromo-4-chloro-3-indolyl
phosphateを用いて検出した。

ELISA 法による抗CAGE抗体の測定

His-tagged CAGE タンパクをPBSで3 μ g/mlに希釈し、100 μ l/wellで96-well
platesにコートした。ブロッキング後、100倍に希釈した100 μ l患者血清を添
加し一晚反応させた。5000倍に希釈した100 μ lのgoat anti-human IgG F(ab')₂
labeled with horseradish peroxidase (Coulter Immunodiagnosics, Krefeld, Germany)
で2時間反応後 tetramethylbenzidine (Sigma, St. Louis, MO) を用いて検出し

2時間反応後 tetramethylbenzidine (Sigma, St. Louis, MO) を用いて検出した。

MSI の検出

MSI の検出は栃木がんセンターにより行われた。ゲノムを抽出後、PCR により *D2S123*, *D5S346*, *D17S250*, *BAT26*, *BAT25*, *MSH3*, *MSH6*, *TGF β RII*, *BAX*, *MBD4A10*, and *MBD4A6* を増幅しマイクロサテライトを調べた。これらマーカーで 30%以上に変異が見られたのを MSI-H、30%未満のものを MMS とした(8)。

結果

SEREX 法による癌抗原の単離

約 10^8 細胞の腎癌細胞株 SNGII、Hecklb、Ishikawa から全 RNA を抽出し混合し、poly A⁺ RNA 選択操作で mRNA とし、 λ ファージライブラリーを作製した。プライマリーサイズは 2.5×10^6 pfu で、挿入 cDNA のサイズは 700 bp から 5 kbp 程度であった。子宮体癌患者血清のうち 7 検体 (EC1 - EC7) を反応に用いた。まず、3 検体の患者血清 EC1、EC2、EC3 を等量混合し約 100 万クローンについて 1 次スクリーニングを行なったところ、24 個の陽性クローン得た。次に患者血清 EC4、EC5、EC6、EC7 をそれぞれ単独に用いてスクリーニングを行なった (表 1)。合計 500 万クローンから、陽性クローンが 193 得られ、最終的に 60 種の遺伝子であることが判明した。この中で 12 種の遺伝子が得られた EC6 の結果を表 2 に示す。EC6-5 にデータベース上の情報から注目し、KU-EM-1 と命名し詳細な検討を行った。しかし KU-EM-1 を検討中、この遺伝子は新規癌精巣抗原 CAGE として報告されたため本報告では以後 CAGE と呼ぶことにする (9)。

RT-PCR による CAGE の発現解析

CAGE mRNA の発現を RT-PCR により検討した。35 サイクルの増幅で CAGE は正常では精巣以外にバンドが認められなかった (図 1)。次に癌細胞株での発現を調べてみると、7 株中 4 株のメラノーマ細胞株で、3 株中 1 株の肺癌細胞株で、4 株中 1 株の腎癌細胞株で、3 株中 2 株の子宮体癌細胞で発現が認められた (図 2)。この結果から CAGE は癌精巣抗原であることが確認された。また正常子宮内膜の増殖期と分泌期で CAGE の発現はいずれも認められなかった (図 3)。また 10 例の子宮体癌 (4 例のグレード 1、4 例のグレード 2、2 例のグレード 3) と 3 例の異常内膜過形成の組織で CAGE の発現を調べたところ、10 例中 7 例の子宮体癌と 3 例中 1 例の異常内膜過形成で発現が認められた。腫瘍の分化度と発現には関係は認められなかった。

CAGE タンパクの発現

CAGE タンパクの発現を RT-PCR で発現が認められた細胞と認められなかった細胞を用いて電気泳動後、ウサギ抗血清を用いて調べた。ネガティブコントロールとして NIH3T3、ポジティブコントロールとして pcDNA3.1 に組み込んだ CAGE をトランスフォームした NIH3T3 を用いた (図 4)。RT-PCR で発現が認

められた Hec-1b、Ishikawa では予想された分子量約 82kDa の位置にバンドが認められたが、発現が認められなかったメラノサイトではバンドを認めなかった。

ウエスタンブロット法による患者血清中の抗 CAGE 抗体の検出

患者血清中の CAGE に対する IgG 抗体の有無を、リコンビナント CAGE を用いてウエスタンブロット法にて検討した (表 3)。40 名の健常人血清中には IgG 抗体は検出されなかった。45 例中 5 例の子宮体癌、24 例中 2 例のメラノーマ、32 例中 2 例の大腸癌患者血清中で抗体が検出されたが、10 例の卵巣癌、20 例の腎癌、18 例の前立腺癌、12 例の膵癌患者からは検出されなかった。

ELISA 法による抗 CAGE 抗体の検出

ウエスタンブロット法で抗体が検出出来たことから、その定量を ELISA 法により行った (図 5)。40 名の健常人ではその平均の吸光度は 0.042 ± 0.008 、32 名の大腸癌で 0.042 ± 0.025 、10 名の卵巣癌で 0.034 ± 0.01 、20 名のメラノーマで 0.072 ± 0.114 、41 名の子宮体癌で 0.066 ± 0.062 であった。図 5 で明らかなように 2 名の大腸癌、2 名のメラノーマ、5 名の子宮癌患者が高値を示しており、これらはいずれもウエスタンブロット法で抗体が検出された患者と一致していた。また子宮体癌だけが高値を示す傾向が認められた。正常値の平均+2SD をカットオフ値とすると、4 名の大腸癌患者、2 名のメラノーマ、12 名の子宮体癌患者が高値域として検出された。

MSI と血清中の抗 CAGEIgG 抗体価の関係

子宮体癌は大腸癌同様 MSI 関連腫瘍として知られていることから、抗体価と MSI の関係について検討した。子宮体癌の MSI は 45 例のうち 33 例について調べられていた。調べられたマーカーの中で 30% 異常に変異が認められた、MSI-H は 13 例 (39%)、1 例が MSI-L (3%)、19 例が MSS であった。MSI-H であった 13 例中 ELISA で高値を示したのは 7 例で (53.8%) であった。しかし、19 例の MSS と 1 例の MSI-L から高値を示した患者はいなかった ($p=0.001$)。

考察

本研究では、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、計 193 個の遺伝子を得る事ができ、それらは 60 種類の遺伝子に由来するクローンである事が明らかになった。このうち、データベース検索や RT-PCR 法を用いた発現検索により、正常各組織での発現が、精巣などごく一部を除いて非常に低く、一方、多くの癌細胞で高い発現が認められる遺伝子を詳細に検討し KU-EM-1 を選択した。しかし KU-EM-1 を検討中、Cho らによりこの遺伝子は新規癌精巣抗原 CAGE として報告されたため本報告では以後 CAGE と呼ぶことにする(9)。

我々は子宮体癌患者血清と子宮癌細胞株のライブラリーを用いた SEREX 法により、正常組織では精巣、そして子宮体癌、メラノーマ、大腸癌で発現する CAGE を同定した。Cho らは胃癌患者血清を用いた SEREX 法により CAGE を同定した。彼らは RT-PCR 法により正常組織では精巣にのみ発現し、胃癌、頸部癌、肺癌組織で発現が認められることを報告しているが、大腸癌、子宮体癌のデータは報告していない。彼らは 4 例のメラノーマ細胞株すべてで発現がなかったが、我々は 7 例のメラノーマ細胞株を調べたところ 4 例で発現を認めている点が彼らと異なる。また彼らは抗 CAGE 抗体が、スクリーニングに用いた血清でしか検出されていない。彼らのデータから考えると CAGE は癌精巣抗原であるが抗原性が弱いことになる。

我々は癌患者血清中に抗 CAGE 抗体が、単離した患者だけでなく複数に存在し、特に子宮体癌で高い傾向が見られることを明らかにした。また子宮体癌には MSI が関連することが知られていることから、MSI と抗 CAGE 抗体価の関係を調べたところ、MSI-H であった 13 例中 ELISA で高値を示したのは 7 例で (53.8%) あった。しかし、19 例の MSS と 1 例の MSI-L から高値を示した患者はいなかった ($p=0.001$)。我々は大腸癌患者で MSI によるフレームシフト変異タンパクが抗原になることを報告している(7)。CAGE でも同様の可能性を考え、CAGE の塩基配列を調べたところ、MSI による変異が予想される反復配列が 1 箇所存在した。そこで MSI-H で抗 CAGE 抗体高値を示した患者癌組織より DNA を調製し塩基配列を決定したところ、全例で変異は認められなかった。このことから MSI-H で抗 CAGE 抗体高値を示すのは、CAGE タンパクの異常により起こるのではなく、MSI による他の原因によるものと考えられた。しかし、子宮体癌の MSI と患者血清中の癌抗原の関係を明らかにしたのは本研究が初めてである。

これらの結果から子宮体癌患者血清中の抗 CAGE 抗体を測定することにより子宮体癌における MSI のマーカーとなる可能性が示され、新しい診断法の開発につながる事が明らかになった。

文献

1. Parazzini, F., La Vecchia, C., Bocciolone, L., and Franceschi, S. The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 41: 1-16, 1991.
2. Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H., and Hayashi, K. [Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 37: 1103-1111, 1985.
3. Nozawa, S., Sakayori, M., Ohta, K., Iizuka, R., Mochizuki, H., Soma, M., Fujimoto, J., Hata, J., Iwamori, M., and Nagai, Y. A monoclonal antibody (MSN-1) against a newly established uterine endometrial cancer cell line (SNG-II) and its application to immunohistochemistry and flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol*, 161: 1079-1086, 1989.
4. Kurarmoto, H., Hamano, M., and Imai, M. HEC-1 cells. *Hum Cell*, 15: 81-95, 2002.
5. Nozawa, S., Tsukazaki, K., Sakayori, M., Jeng, C. H., and Iizuka, R. Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-I) and its single cell cloning—with special reference to the stem cell of the tumor. *Hum Cell*, 1: 426-435, 1988.
6. Nozawa, S., Udagawa, Y., Sasaki, H., Ito, K., Akiya, K., Terashima, Y., Takamizawa, H., Ohkura, H., Fujimoto, S., Hashimoto, M., and et al. [Studies of clinical usefulness of new tumor markers of ovarian cancer, CA 54/61 and CA 602—CA 602 assay reagent kit, performance its normal value and correlations with other tumor markers]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 19: 2085-2093, 1992.
7. 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.
8. Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58: 5248-5257, 1998.
9. Cho, B., Lim, Y., Lee, D. Y., Park, S. Y., Lee, H., Kim, W. H., Yang, H., Bang, Y. J., and Jeoung, D. I. Identification and characterization

of a novel cancer/testis antigen gene CAGE. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 715-726, 2002.

表1 Positive Clones and the associated genes

Patient No.	Age (Years)	Endometrial cancer Stage	Clones Screened	Positive Clones	cDNA Fragments
EC1+2+3	70+58+65	IIIc+IVb+IVb	1.0x10 ⁶	24	10
EC4	58	IIIc	1.0x10 ⁶	16	6
EC5	61	IIb	1.5x10 ⁶	0	0
EC6	58	IVb	7.5x10 ⁵	21	12
EC7	56	IIIc	7.5x10 ⁵	132	34
total			5.0x 10 ⁶	193	60*

* There were two clones identified from 2 patients. Therefore, the number of different cDNA fragments was 60.

表2 Clones identified by SEREX and their homologous sequences

clone	No. of isolated clones	Unigene number	Identity	Chromosome
EC6-1	5	281680	PECR	2q35
EC6-2	3	232108	KIAA1473	19p13
EC6-3	3	7838	Makorin	7q34
EC6-4	2	63525	Poly(rC) binding protein 2	12q13
EC6-5	1	434416	CAGE	Xp22
EC6-6	1	75682	RCD-8 Autoantigen	16q22
EC6-7	1	23978	Scaffold attachment factor B	19p13
EC6-8	1	105656	small inducible cytokine subfamily E	4q25
EC6-9	1	257266	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	3p25
EC6-10	1	8597	Zink finger protein 91	19p13
EC6-11	1	170195	Zinkfinger protein 148	20q13
EC6-12	1	419763	Zinkfinger protein43	19p13

表3 Western Blotting analysis of anti-CAGE antibodies in the sera of cancer patients and healthy individuals

Healthy donor	Endometrial cancer	Ovarian cancer	Melanoma	Colon cancer	Renal cell cancer	Prostate cancer	Pancreas cancer
0/40	5/45	0/10	2/24	2/32	0/20	0/18	0/12

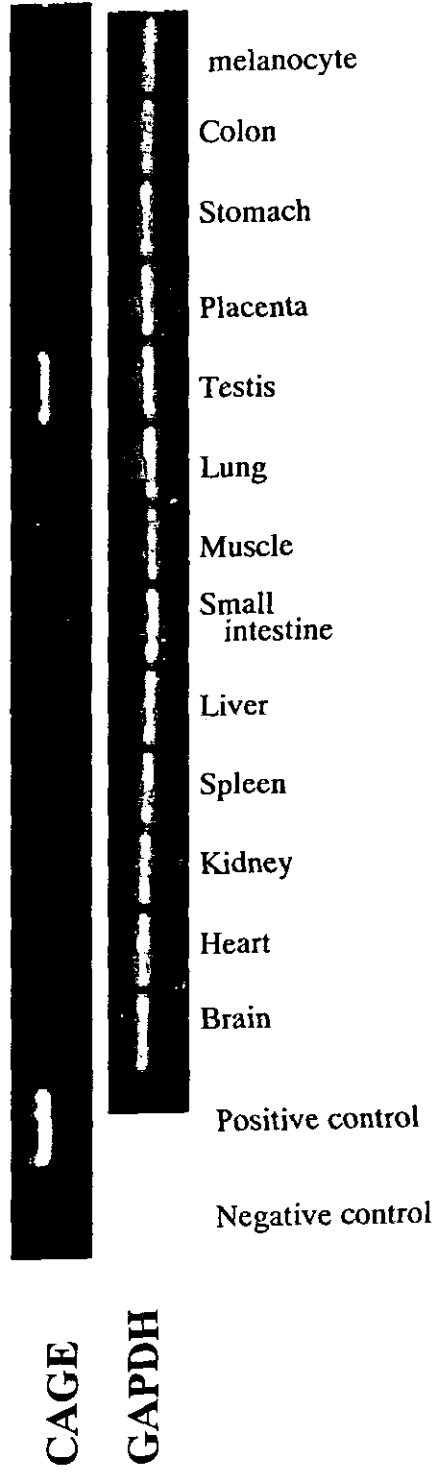


図1 CAGEは正常組織では精巢に発現している

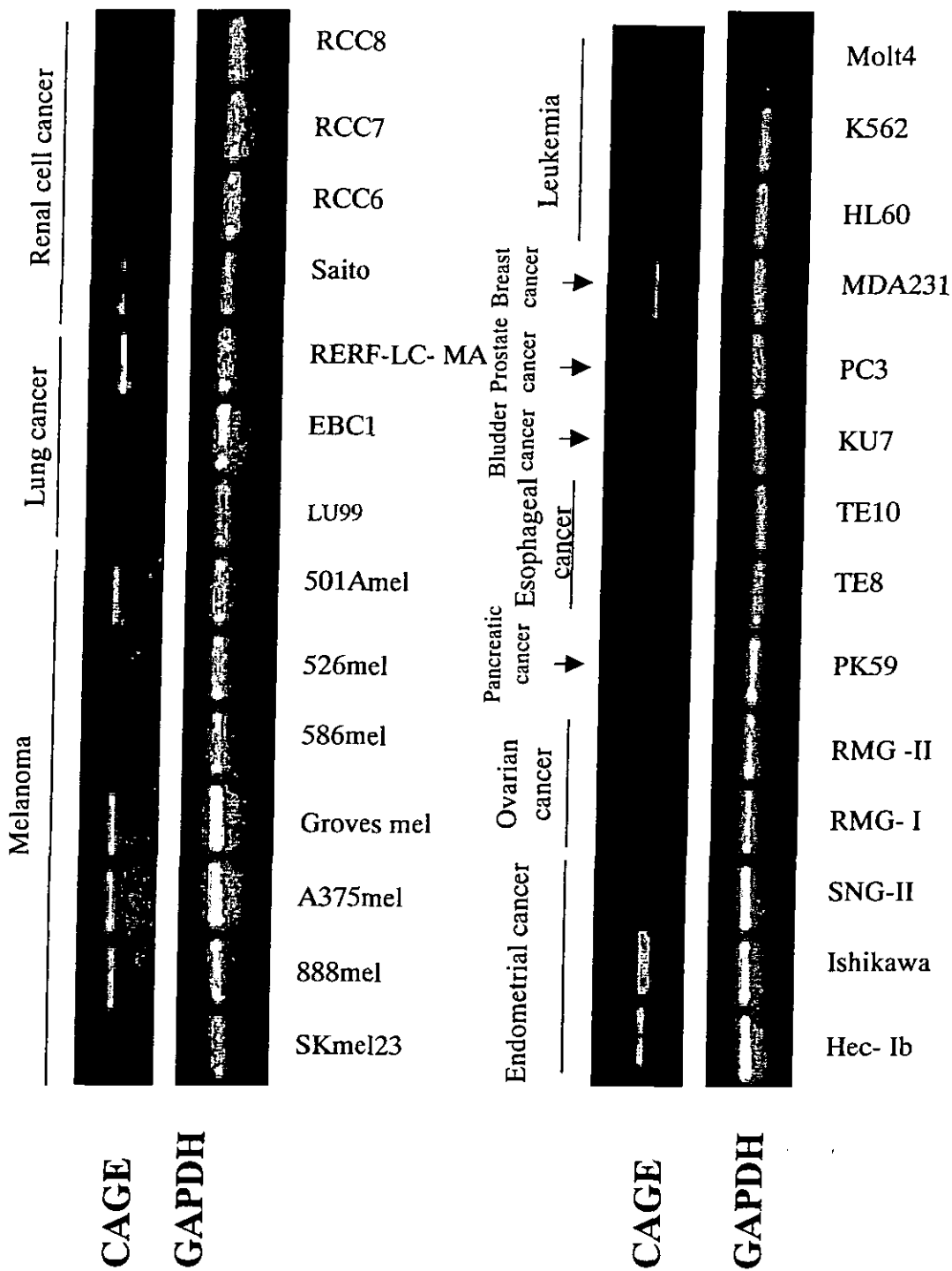


図2. CAGEは種々の癌細胞株で発現が認められる。

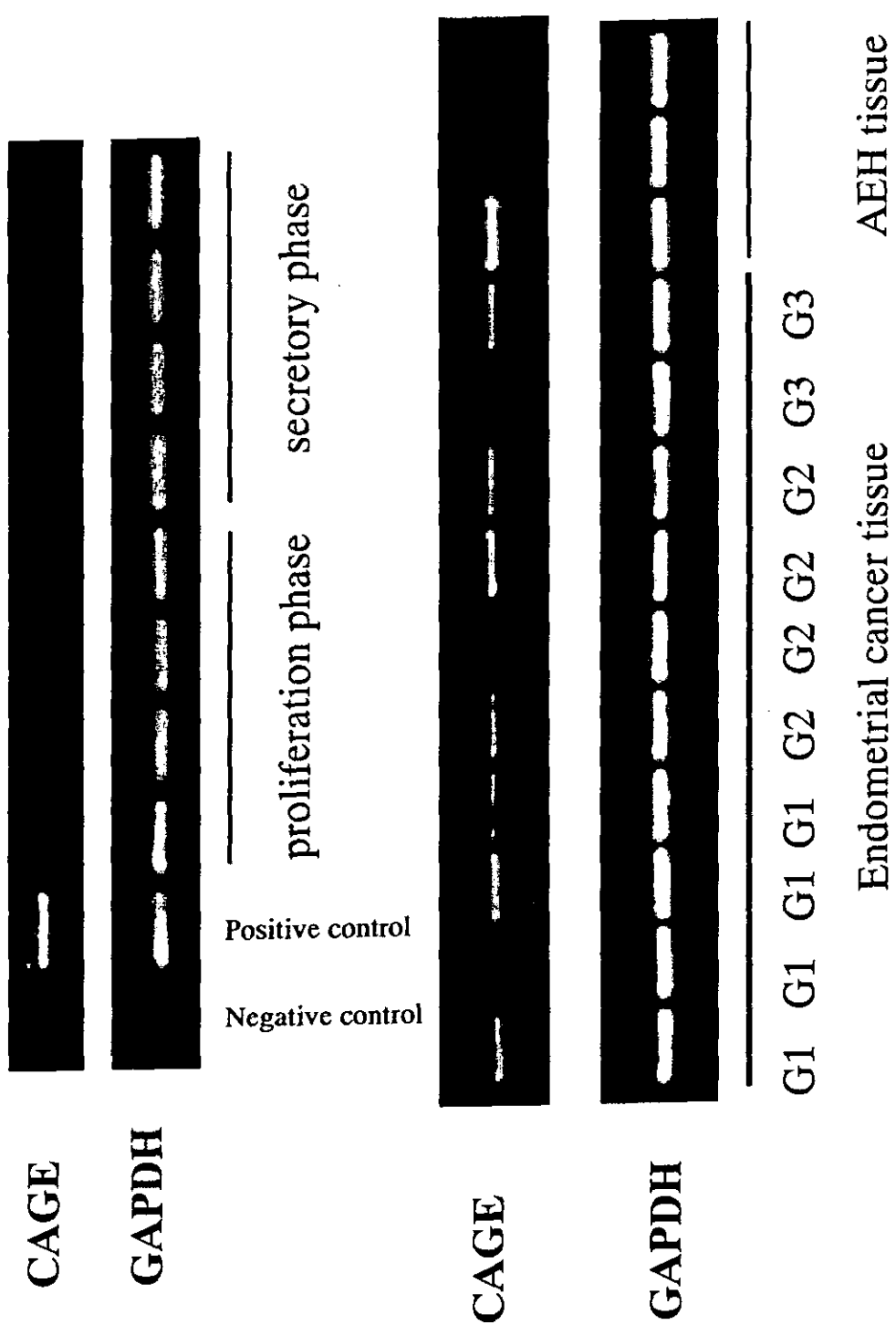


図3. CAGEは正常の子宮内膜では発現せず癌で発現している

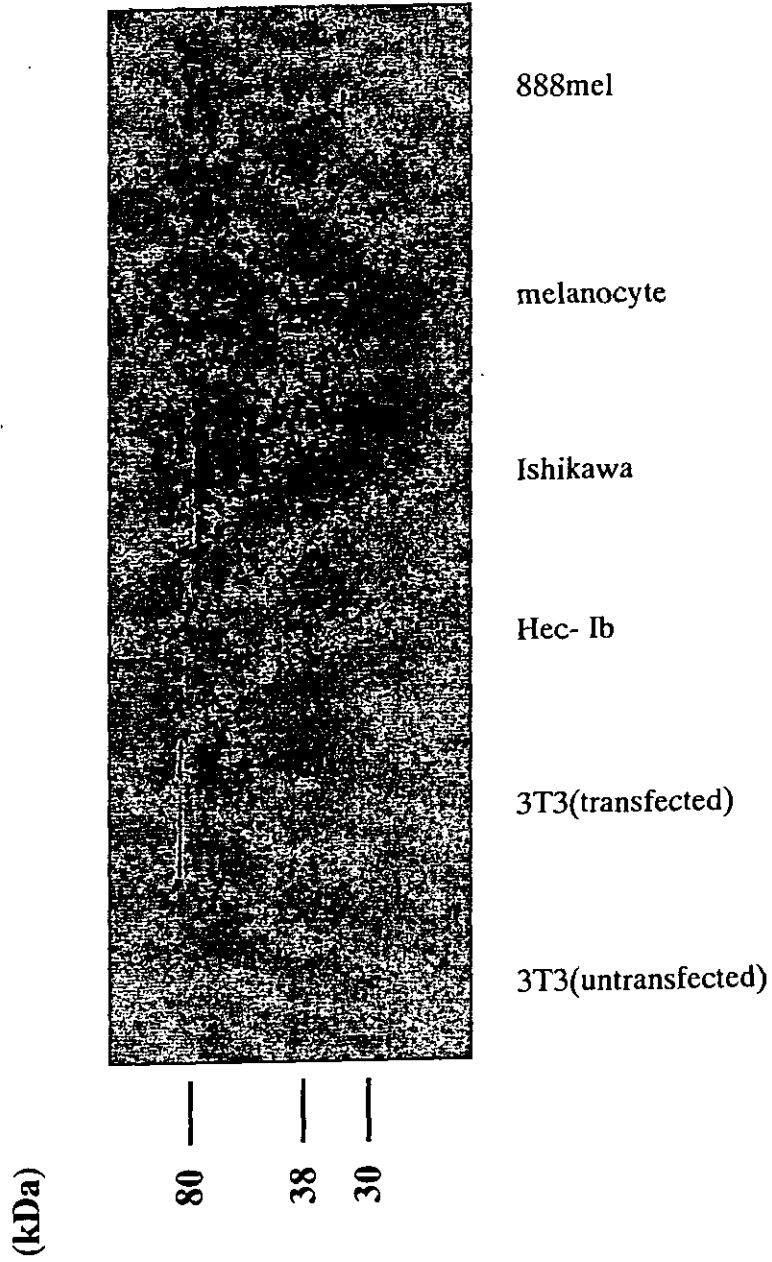


図4. 癌細胞株でCAGEタンパクは発現している

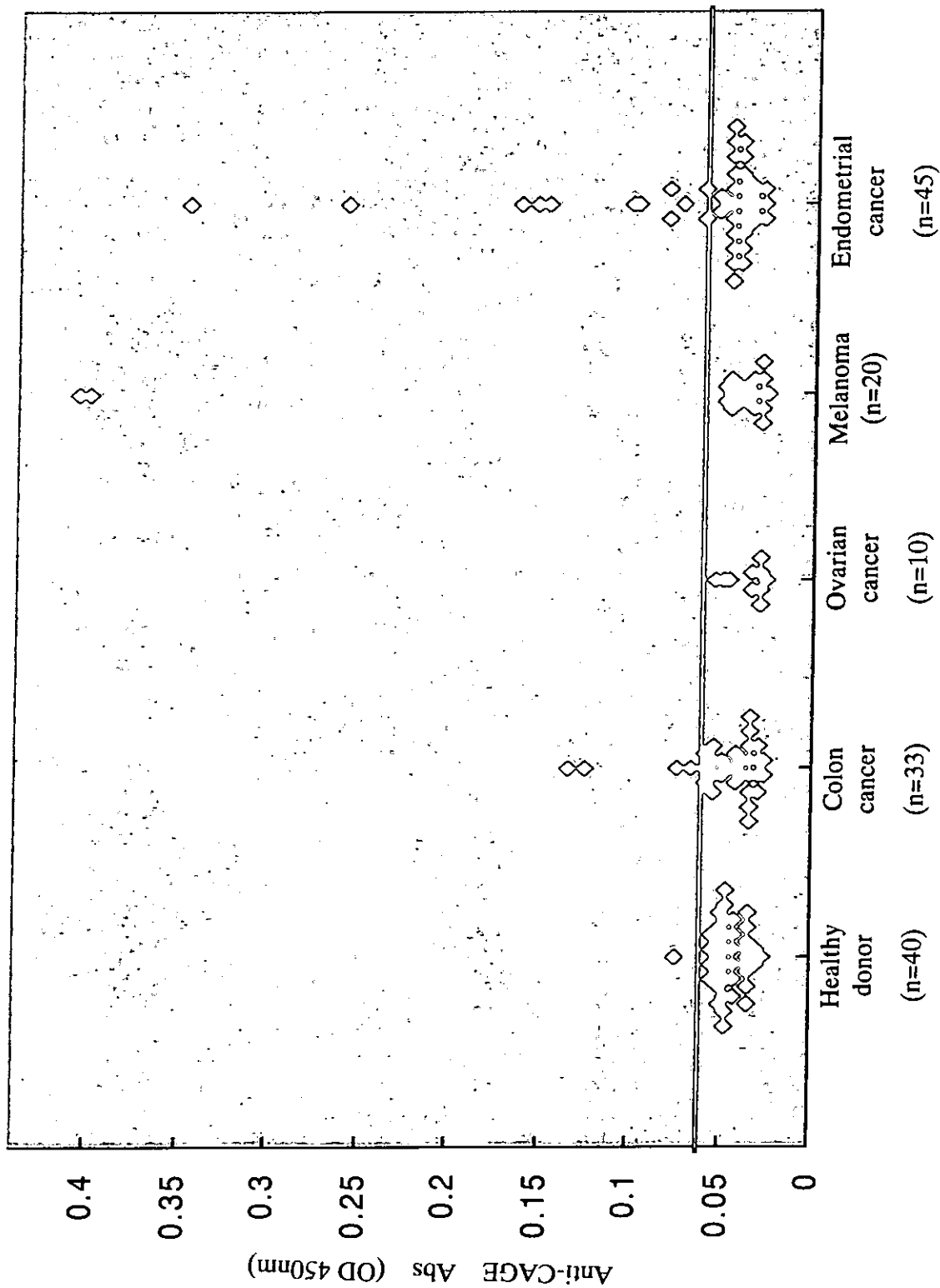


図5. ELISA法による血清中の抗CAGE抗体価の測定

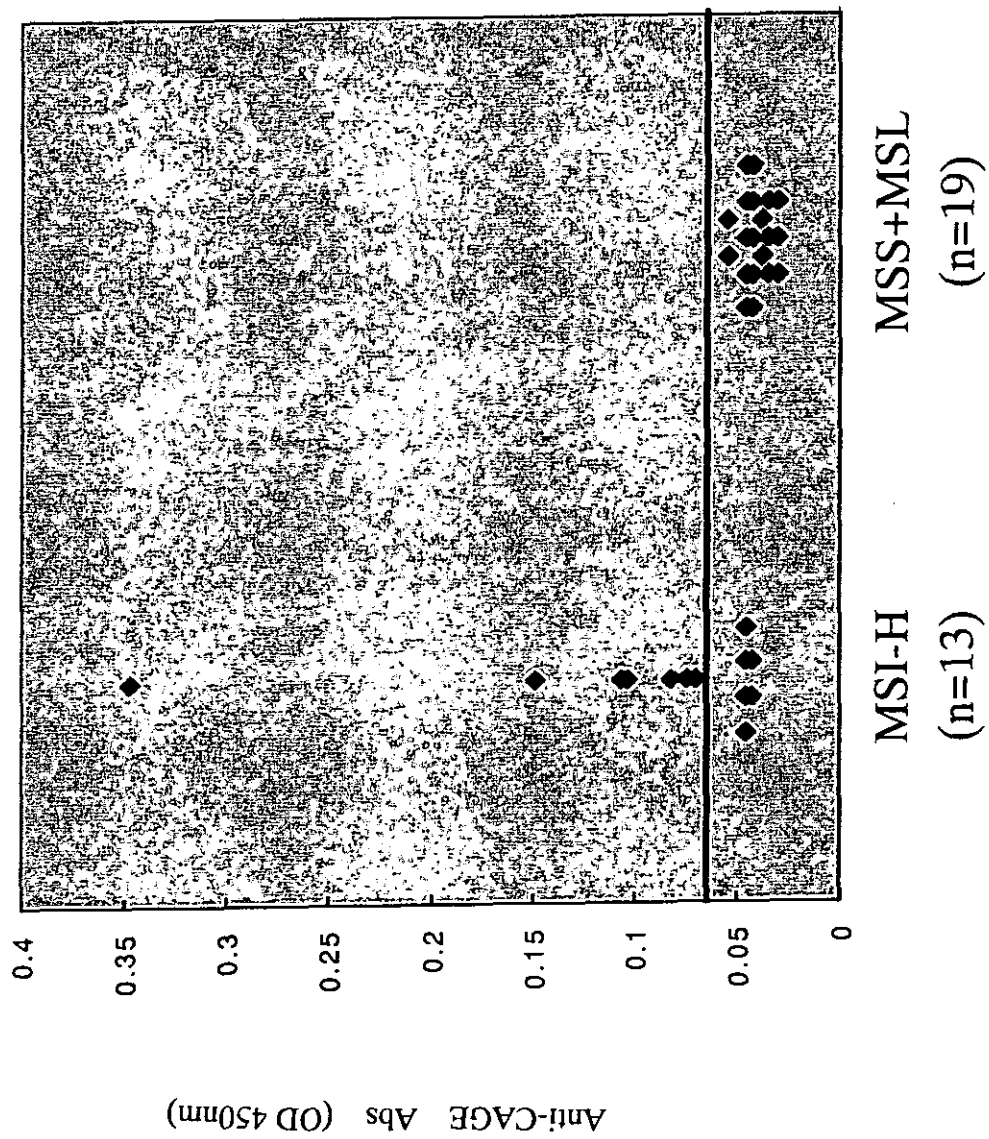


図6. MSIと子宮体癌患者血清中の抗CAGE抗体

2-5 子宮体癌移植 SCID マウス血清を用いた SEREX

要旨

従来より患者血清中の抗体が認識する抗原を同定する有力な方法として SEREX 法 (Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries) が用いられてきたが、自己抗原も同定されることから、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。【方法】(1) 子宮体部原発癌肉腫組織を SCID マウスに皮下移植し 6 週目にヒト型 IgG 抗体価を測定した後、全採血を行い、この血清を用い SEREX 法によりヒト子宮体癌細胞株由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。(2) 癌抗原候補と推定された遺伝子の発現を正常組織および癌細胞株で検討した。(3) 得られた抗原に対する抗体の保有率を子宮体癌患者および健常人血清で検討した。【成績】(1) 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。遺伝子の情報を NCBI BLAST search および UniGene 等を用いて検討し、癌との関連が疑われる遺伝子を選別し、このうち Chromosome11q13 に位置する KU-EM-2 遺伝子に注目した。(2) 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。(3) 子宮体癌患者や他臓器癌患者で、抗体保有の有無をファージ法・WESTERN BLOT 法を用いて検討した。前者では健常人では 24 例中 3 例に、子宮体癌患者 20 例中 8 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。以上から、KU-EM-2 タンパクは、癌抗原として免疫系に認識されることが示唆された。【結論】腫瘍移植 SCID マウス血清を用いることにより、患者

血清を用いた従来法では検出できない抗原が同定された。腫瘍移植 SCID マウスでは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ている可能性が高く、この血清を用いた SEREX 法は腫瘍抗原の同定に有用であることが確認された。