

緒言

子宮体癌の治療法としては現在外科的摘除が有効な方法とされるが、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。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、新しい療法の開発が期待されている。子宮体癌患者血清を用いて癌特異抗原を探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 CTL を誘導できるとの報告(1)があることから、子宮体癌に対する免疫療法が有用であると考えられる。Melanoma に於いて、1991年 Boon らが癌特異的抗原遺伝子である MAGE を同定し(2)、1994年、主任研究者の河上らが MART-1 を同定し(3)、癌細胞特異的免疫療法が理論的に可能になった。これらは、癌細胞反応性 T 細胞と自己癌細胞株を用いて単離されたものであるが、Melanoma 以外の癌腫においては、このような癌細胞反応性 T 細胞や自己癌細胞株を樹立することは困難であった。1995年、ドイツの Pfreundschuh と米国の Old のグループは、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(4)、癌細胞に発現していて自己の IgG 抗体で認識される抗原を単離した。そのうちメラノーマから得た MAGE-1、tyrosinase、食道癌から得た ESO-1 は主任研究者河上らとベルギーの Boon らのグループが CD8⁺T 細胞で認識されるメラノーマ抗原として同定したものと同一分子であることが判明した(5, 6)。すなわち IgG 抗体で認識される分子はその抗体産生を助ける CD4⁺T 細胞で認識されることが予想されるだけでなく CD8⁺T 細胞にも認識されることが証明された。そのような CD8⁺T および CD4⁺T に共通に認識される抗原として他にも TRP1、変異 RAS、E6/E7 が知られている。

SEREX 法による癌抗原の探索は、多くの癌で行われているが、しかし、SEREX 法は元来自己抗原を同定する方法であるから、単離された抗原には自己抗原も多く含まれる。単離抗原から癌抗原であることを検討するのは手間がかかることから、より効率的な癌抗原の単離が望まれる。我々は、昨年度腫瘍に浸潤しているあるいは近傍に存在している B 細胞はより腫瘍に特異的ではないかと考

え、SCID マウスに子宮体癌組織を移植した。そして SCID マウスでヒト IgG 抗体の産生を確認し、マウス血清を用いて SEREX 法で MCM2 を同定し、マウス血清を用いる改良 SEREX により、患者血清を用いるより効率的にスクリーニングできる可能性を示した。本年度は昨年度に引き続き子宮体癌組織を移植し、改良 SEREX による癌抗原の単離を行い、その有効性を確認した。

研究対象とする検体、細胞株および研究方法

細胞株

子宮体癌細胞株 SNG II 株は慶應義塾大学医学部の野澤らにより樹立された(7)。Heck Ib 株は北里大学医学部蔵元らによって(8)、また Ishikawa 株は筑波大学医学部西田らによって樹立された(9)。

正常組織 RNA

正常各組織（脳・心臓・腎・膵・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。Fibroblast の全 RNA は cell line を培養後、guanidine isothiocyanate 溶液中で塩化セシウム密度勾配遠心法により抽出した。1362-TIL1 および 1362-TIL2 は DMEM+10%FCS、EBvirus 感染 B 細胞株は RPMI+10%SCF で培養した。

癌細胞 RNA

Melanoma 細胞株である 888mel、A375mel、586mel、301Amel、Glioblastoma 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。膵癌細胞株 PK1 は RPMI+ 10%FCS + 2mM L-glutamine, +10mM hepes+ 6 μ g/l egf+ 150units/l insulin+ 0.5mg/l hydrocortisone+ 10mg/l transferin にて培養した。子宮体癌細胞株 Ishikawa、SNGII、HeckIb、卵巣癌細胞株 RMGI、RMGII は F-12+10%FCS にて培養した。

血清

子宮体癌患者血清 KKS1~45、健常人ボランティア血清 NC1~NC24、Melanoma 患者血清 Me1S1-24、大腸癌患者血清 RKS1-24 を用いた。

子宮体癌細胞発現ライブラリーの作製

子宮癌細胞株 Heck1b, SNG II, Ishikawa を各々DMEM (含有 10%FCS) 中で培養し、細胞数約 10^8 まで増殖させた。guanidine isothiocyanate 溶液中で塩化セシウム密度勾配遠心を行い全 RNA を抽出した後、電気泳動により RNA の分解がない事を確認し、ライブラリー作製に用いた。各々1mg 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 回繰り返して mRNA とし 5 μ g をライブラリーの作製に用いた。 λ フェージ発現ライブラリーの作製は 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った。 λ フェージライブラリーのプライマリーサイズは 2.5×10^6 pfu で、挿入 cDNA のサイズは 700bp から 5kbp 程度であった。

SCID マウス血清の調製

移植に用いた腫瘍組織は 54 歳女性の症例で、準広汎子宮全摘術および骨盤リンパ節・傍大動脈リンパ節郭清を施行時に組織を採取した。術後診断は子宮体癌 IIIa 期で、筋層浸潤は全層にわたっており、リンパ節転移が 58 個中 16 個、右側の卵巣転移も認めた (pT3aN1M0)。組織型は腺扁平上皮癌であった。

患者腫瘍組織を RPMI 1640 メディウムの中で 3mm 立方に細断し、4 匹の CB17/Icr-SCID マウス (日本クレア、川崎) の左右背面に 1 つずつ計 2 個を皮下移植した。一週毎に眼採血を行い遠心分離により血清を調製した。このマウス血清は 0.1% BSA-PBS にて 1000、5000、10000、50000 倍希釈液を作製した。希釈したマウス血清は、ヤギ抗ヒト Ig (G, A, M) 抗体 (Cappel, Ohio) あるいは

ヤギ抗マウス IgG(H+L) 抗体 (Jackson immuno research laboratories Inc. Pennsylvania) を $5\mu\text{g/ml}$ 濃度溶液 $100\mu\text{l}$ でコートした plate (Nalge nunc, Denmark) へ加えて室温で 2 時間反応し、洗浄後 4000 倍希釈したヤギ抗ヒト IgG-HRPO 標識抗体 (Cappel, Ohio) あるいはヤギ抗マウス IgG-HRPO 標識抗体 (Cappel, Ohio) を加え室温で 1 時間反応し、再度洗浄後 TMB 発色法によりヒト型 IgG 抗体価を測定した。

移植後 6 週目に開胸して全採血を行い、遠心して血清を採取した。それぞれの血清を $400\mu\text{l}$ ずつ混合して計 1.6ml とし、 28.4ml の TBS-SM 溶液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5% skim milk, 0.1% azide) を加えて一次抗体溶液とした。

ヒト血清の調製

健常人および担癌患者での標的タンパクに対する抗体保有の有無を検討するため、SCID マウスに腫瘍を移植した子宮体癌患者 1 人を含めて、子宮体癌患者 24 人、健常人 24 人、大腸癌患者 20 人、メラノーマ患者 20 人の血清を調製した。血清から大腸菌に対する抗体を除くために、血清と大腸菌抽出液を混合して室温で 4 時間静置し、遠心した上清液へ TBST-SM を最終的に 100 倍希釈になるように加えた。さらにファージに対する抗体を除くために cDNA の入っていないファージベクターのみを、上記のように宿主大腸菌 (XL1-Blue MRF') と共に直径 15cm のシャーレに調製した NZY 寒天培地上に重層した。プレート培地を 42°C で約 4 時間、プラークのサイズが 1mm 程度になるまで培養し、予め 20mM の Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, SIGMA, USA) に浸して乾燥させておいたニトロセルロース膜 (Hybond-C extra, Amersham Biosciences KK, USA) を上にのせ、 37°C で 4 時間培養した。プロットしたニトロセルロース膜を TBST で 2 回洗浄し、さらに TBST-SM でブロッキングを行った。このニトロセルロース膜に大腸菌抽出液で処理した血清を加え、室温で 4 時間静置した後、血清を回収し以下の血清反応に用いた。

組換え体タンパクの発現

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 λファージライブラリーを軟寒天培地中で混合し、直径 15cm のシャーレに調製した NZY 寒天培地上に重層した。プレート培地を 42°C で約 4 時間、プラークのサイズが 1mm 程度になるまで培養し、予め 20mM 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 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM 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発現させたニトロセルロース膜に SM 希釈 SCID マウス血清を室温で 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 (Cappel, Ohio) 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 (Sigma, USA) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Sigma, USA) で発色させた。

発色した陽性クローンは二次スクリーニングを行って擬陽性を除き、プラークに含まれる抗原候補ファージを SM バッファー中に保存した。塩基配列を決定するため、ベクター中のプライマー配列である T3 (5' AATTAACCCTCACT AAAGGG 3') と T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 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、ABI3100 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。

候補遺伝子の選別

血清を含む SM を等量混合した検体で 50 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、陽性クローンが 45 得られ、2 次スクリーニングの後、DNA 塩基配列を確認し、重複しているクローンを除くと、最終的に 15 種の遺伝

子であることが判明した。

得られた遺伝子の情報を NCBI BLAST search、UniGene、SAGE data 等を参考として検討し、癌化との関連が疑われる遺伝子か、あるいはデータベース上では報告されていない未知遺伝子であるものを選別した。対象とする遺伝子のデータベース上の発現パターンは、癌特異的であることを示唆しているか、あるいは癌関連遺伝子の可能性があるかを検討し解析候補として選択した。

PCR プライマー

KU-EM-2 の RNA 発現を確認するため、次の PCR プライマーとして次の配列を作製した。

KU-EM-2-sense (5`TTGGTGGGATCTGAGCAGAGT 3`)

KU-EM-2-antisense (5`AAGGGGGACAGACTGGTGGGA 3`)

発現確認 PCR は 94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒、30 サイクル、で行なった。

抗体の検出

他の子宮体癌患者や他臓器癌患者の、これらの遺伝子が規定するタンパクに対する抗体保有の有無をファージ法・WESTERN BLOT 法を用いて検討した。KU-EM-2 遺伝子の全長を大腸菌で発現させることが困難であったため 3 つの部分 (S1, S2, S3) に分けて大腸菌に発現させることとした。3 つに分割した KU-EM-2 遺伝子を pET16K の vector に挿入し BL21(DE3)pLysS Competent cells に transfection した後 37 度で 8 時間培養後 1mM の IPTG を加えさらに 90 分培養を続けた後に回収、ニッケルカラムにて HIS 結合タンパクを精製した。さらに 10%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 後 Western Blot を行い、子宮体癌患者血清を用いて検出した。

結果

移植 SCID マウス血清中のヒト IgG 濃度

4 匹の SCID マウスに移植後、2 週毎に眼採血を行い遠心分離により血清を調製し、SCID マウス血清中のヒト型 IgG 抗体を調べたところ、4 週目に高値を示し(527.8ug/ml, 137.4ug/ml, 225.8ug/ml, 46.8ug/ml)、6 週目では減少していることが示された(図.1)。そこで6 週目の測定後、直ちに全採血を行いスクリーニングに使用した。

スクリーニングの結果

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、癌化との関連が疑われる遺伝子を選別し、このうち Chromosome11q13 に位置する既知遺伝子を KU-EM-2 と名付け、さらに検討を行った。

各種細胞株での発現量の検討

KU-EM-2 遺伝子について、RT-PCR法にて各組織正常細胞および各種癌細胞における mRNA レベルでの発現を調べたところ、正常組織では精巣組織に高発現しており、5 例中全てのメラノーマ細胞株をはじめ各種癌細胞株 26 例中 24 例に発現を認めたことから新規癌精巣抗原であることが示された(図.2)。また 3 例の正常子宮内膜では発現を認めなかったが、癌組織では 6 例中全てで発現が認められた。

健常人および各種癌患者における抗体保有の解析

KU-EM-2 の遺伝子産物であるタンパクに対する抗体保有の有無をフージ法・WESTERN BLOT 法を用いて、健常人および他の子宮体癌患者や他臓器癌患者で検討した。今回 SCID マウスに腫瘍を移植した、健常人 24 人、子宮体癌患者 20 人、大腸癌患者 20 人、メラノーマ患者 20 人で抗体の保有率を検討した。KU-EM-2 に対する抗体は健常人 3/24、子宮体癌患者 8/20、大腸癌患者 6/20、メラノーマ患者 6/20 に検出した(表 1)。また、今回 SCID マウスに移植した癌の患者血清中には KU-EM-2 に対する抗体を検出できなかった。大腸菌による組換えタンパクを作製したところ全長は得られなかったことから、タンパクの構造を予想し 3 つの部分(S1/S2/S3)に分けて組換えタンパクの作製を行った。現時点で S1/S2 が精製され Western blot を行ったところ、S1 Segment では子宮体癌患者 45 例中 2 例、S2 Segment では子宮体癌患者 45 例中 6 例に検出した。図 3 にその一部を示した。

考察

我々は子宮体癌腫瘍組織移植マウス血清を用いた SEREX 法を行い、Chromosome11q13 に位置する KU-EM-2 遺伝子についてさらに検討を行った。今回、我々が同定した陽性クローン 15 個のうち 1 個が KU-EM-2 であった。塩基配列分析によると 313 のアミノ酸タンパク質からなり、膜貫通領域ドメインを 4 カ所に有することから、膜タンパクと考えられる。RNA-結合蛋白質を代表する RNP1 のモチーフと C 末端の膜アンカーを伴う細胞質内に露出した膜蛋白質と同様のロイシン・イソロイシン anchor を除いて既知の機能性モチーフを含まないと予測されている。文献的にもノーザンブロット分析でさまざまな腫瘍の癌細胞株で検出されている。KU-EM-2 過剰発現は、KU-EM-2 遺伝子に対するエンハンサーが染色体転座などの新たな整列により生じることが関連しているといわれている。

KU-EM-2 遺伝子の mRNA レベルでの発現を RT-PCR 法にて検討したところ、正常組織では精巣のみに発現し、ほとんどの癌細胞株において (26 例中 24 例) に発現を認め、いわゆる Cancer-Testis 抗原 (CT 抗原) の発現パターンであった。CT 抗原はその発現が正常組織では HLA の発現していない精巣のみに、また種々の癌細胞で発現が認められることから CTL のターゲットとして期待されておりその探索が行われている。SEREX 法を用いて CT 抗原も単離されており、我々も膀胱癌患者血清を用いて KU-CT-1、子宮体癌患者血清を用いて KU-CT-2 (CAGE)、食道癌患者血清を用いて KU-CT-3 (BORIS) を同定している。これらの CT 抗原と比較して KU-EM-2 は非常に多くの癌種で発現が認められることから広範囲な腫瘍で適応可能と考えられる。

KU-EM-2 が高い免疫原性を持つことが免疫療法のターゲットとして重要である。血清中の抗体保有の有無をフェージ法だけでなく WESTERN BLOT 法を用いて子宮体癌、大腸癌、メラノーマおよび健常人について検討したところ、前法では健常人で 24 例中 3 例に、子宮体癌患者で 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 例に検出した。後法の大腸菌による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 例に検出した。以上から、KU-EM-2 は、癌抗原として免疫系に高頻度

に認識されることが示唆された。

腫瘍移植 SCID マウス血清を用いた SEREX 法により子宮体癌から昨年度は MCM2 を、本年度は KU-EM-2 を単離することが出来た。しかし、スクリーニングに用いた患者血清からはこれら抗原に対する抗体は検出できなかった。その理由として腫瘍特異的な抗体を産生する B 細胞が腫瘍に浸潤しており、SCID 血清中に抗体を産生することにより、患者血清中より IgG 抗体が濃縮されたために、SCID マウス血清を用いて同定できたと考えられる。昨年度報告した MCM2 も癌との関連が報告されていること、本年度単離した KU-EM-2 は新しい CT 抗原であること、これら抗原に対する抗体が患者血清では検出できないことから、SCID マウスに腫瘍を移植しその血清を用いてスクリーニングを行う改良 SEREX 法により効率的な癌抗原の単離が可能であることを示している。

今回、腫瘍移植 SCID マウス血清を用いた SEREX 法によって、効率的に新しい CT 抗原で高い抗原性を持つ KU-EM-2 を単離することが出来た。この抗原は発現と免疫原性から免疫療法の抗原として十分に応用可能と考えられる。今後この方法を用いて移植癌種を拡大することによって、数多くの癌抗原の単離を行い臨床応用の可能性を検討すると同時に、個別化免疫療法の可能性も検討する。

文献

1. Tanaka, S., Tsuda, N., Kawano, K., Sakamoto, M., Nishida, T., Hashimoto, T., Shichijo, S., Kamura, T., and Itoh, K. Expression of tumor-rejection antigens in gynecologic cancers. *Jpn J Cancer Res*, *91*:1177-1184, 2000.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Wang, R. F., Johnston, S. L., Zeng, G., Topalian, S. L., Schwartzenuber, D. J., and Rosenberg, S. A. A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames. *J Immunol*, *161*: 3598-3606, 1998.

7. 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.
8. Kuramoto, H., Hamano, M., and Imai, M. HEC-1 cells. *Hum Cell*, 15: 81-95, 2002.
9. 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.

表1 癌患者血清中に抗KU-EM-2抗体が高頻度に存在する

	Healthy (24)	Em.ca (20)	Co. ca. (20)	Melanoma (20)
KU-EM-2	3	8	6	6

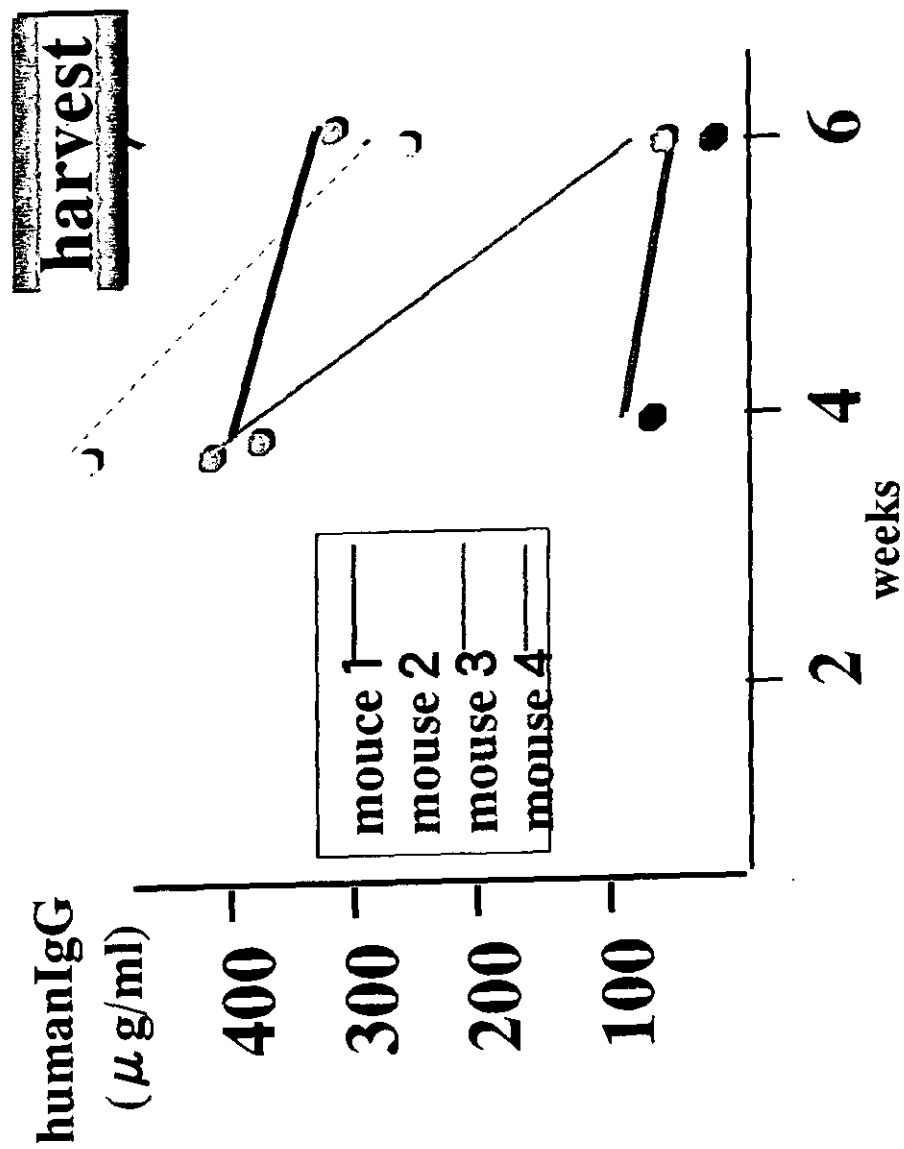


図1 子宮体癌移植SCIDマウス血清中のヒトIgG濃度

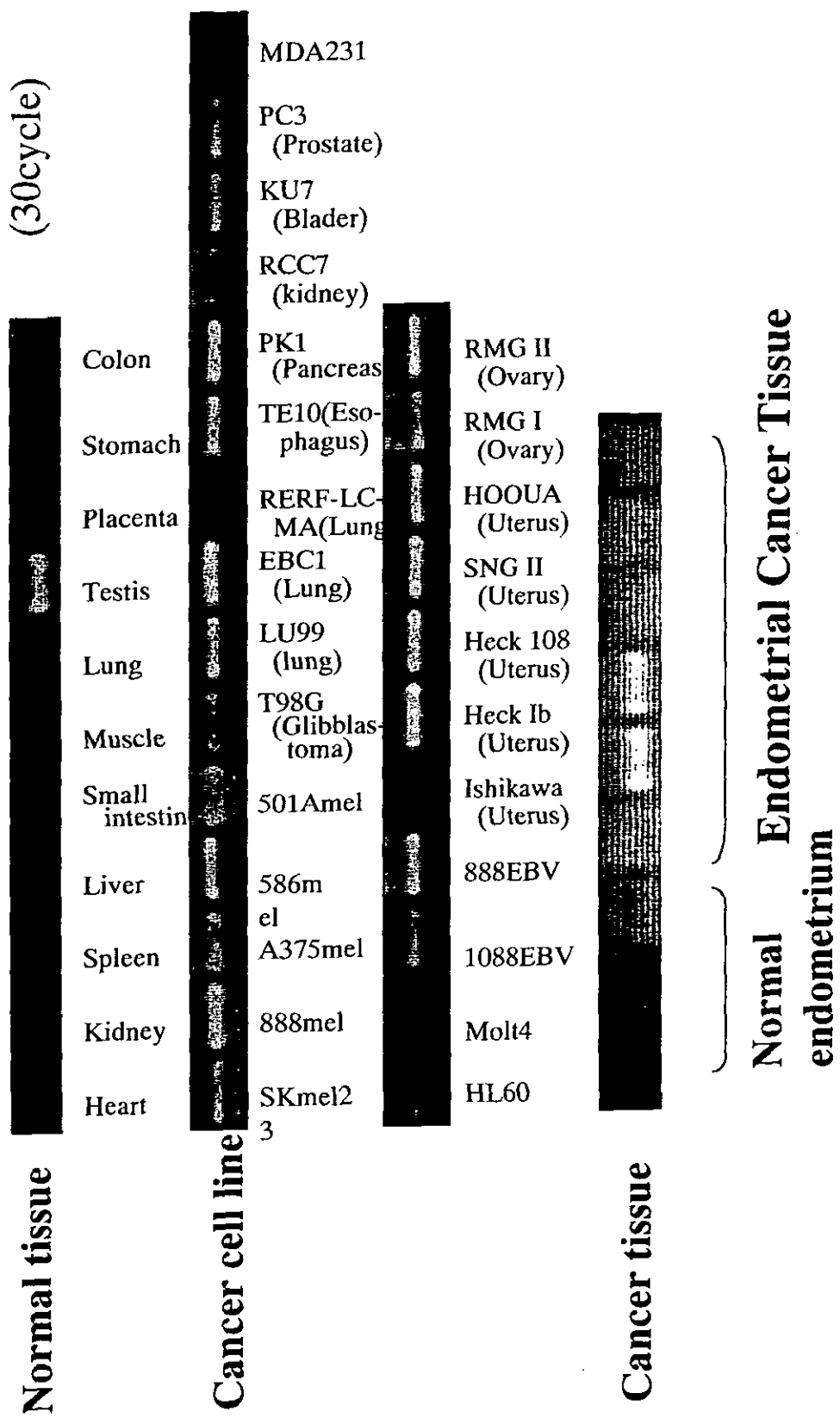
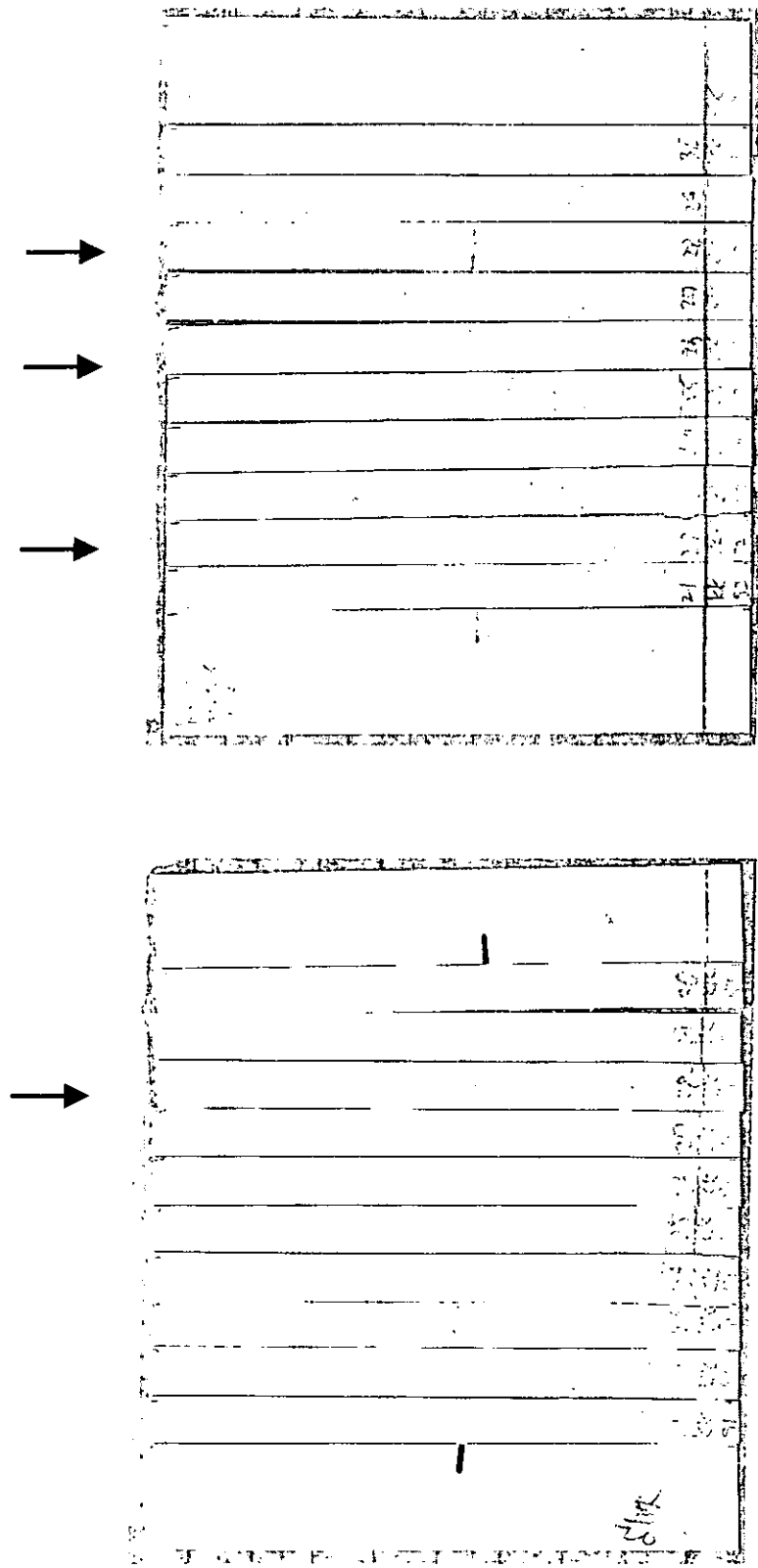


図2 KU-EM-2はRT-PCR法によりCT抗原であることが示された



S1 segment (endometrial cancer) S2 segment (endometrial cancer)

図 3 KU-EM-2部分タンパクに対する子宮体癌患者血清の反応

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	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	2004
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	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	呼吸	22 (12)	1207-1212	2003

20030156

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。