

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16578
研究課題名（和文）生殖細胞成熟過程における癌/精巣抗原の発現を指標とした新たな癌ステージングの証明

研究課題名（英文）Development of a new stratification for clinical cancer to use cancer/testis antigens expression patterns compared with those in gametogenesis

研究代表者
福山 隆（Fukuyama, Takashi）

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：10462251
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：配偶子形成において、癌/精巣抗原は各ステージにおいて様々な発現パターンが見られることが知られている。一方、癌/精巣抗原は悪性形質獲得時（癌化）にも発現することが知られている。癌/精巣抗原の発現パターンは、生殖細胞成熟過程のみではなく、癌化においても規則性が存在するのではないかと報告者は仮説を立てた。本研究では、マウスにおける悪性形質の増加による癌/精巣抗原の発現を解析し、仮説の立証を行った。さらに、ヒト胃癌において、癌化初期に発現する癌/精巣抗原として、Kita-kyushu lung cancer antigen-1を同定し、その発現はピロリ菌に関連していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ゲノム不安定性を有する生殖細胞の成熟過程と発癌過程において、癌/精巣抗原が発現するという共通点があり、本研究により、それらの過程における発現パターンは逆相関を呈することが明らかとなった。各臨床癌の癌/精巣抗原の発現パターンを生殖細胞成熟過程のそれと照らし合わせることで、その臨床癌がどのステージの癌細胞であるかを層別化できる可能性を示すことができた。癌/精巣抗原による層別化は、効果的な治療方法の選定に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In gametogenesis, it is known that cancer / testis antigens have consistent expression patterns at each stage. On the other hand, cancer / testis antigens are known to be expressed even when malignant traits are acquired (carcinogenesis). We hypothesized that the pattern of cancer / testis antigen expression might have regularity not only in the germ cell maturation process but also in carcinogenesis. In the present study, we analyzed the expression of cancer / testis antigens by increasing malignant traits in mice and verified the hypothesis. Furthermore, Kita-kyushu lung cancer antigen-1 was identified as a cancer / testis antigen expressed in human gastric cancer in the early stage of canceration, and its expression was proved to be related to H. pylori.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：癌/精巣抗原 生殖細胞成熟過程 悪性形質獲得 胃癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<癌/精巣抗原(Cancer/testis antigen, CTA)はがん特異的な免疫療法のターゲット>

CTA とは、あらゆるがん種に 40%以下の割合で発現し、正常組織においては精巣、卵巣等生殖系組織以外では発現を認めないがん特異的なタンパク質である。それらの多くは CD8T 細胞に認識されるペプチドを有しており、がん免疫療法の有望なターゲットとして扱われている。現在、がん免疫療法においては PD-1 阻害薬の奏功が認められており、その効果を増長するためにも、将来 CTA のペプチドワクチン併用療法が期待され、**がん種及びそのサブタイプごとに CTA の発現パターンを把握することは標的抗原の選定の上で極めて重要である。**また、生殖組織以外では腫瘍特異性を有するため、最近ではがん診断の標的としても認められてきている(Shida, Fukuyama et al. Anticancer Res. 2015、福山ほか 特開 2015-128418)。

<Helicobacter pylori(H. pylori)は胃癌の90%の原因菌>

H. pylori は確実に胃癌を誘発する物質として WHO より認定されている。*H. pylori* は発癌因子として Cytotoxin associated gene A (CagA)をタイプ IV 型分泌機構により宿主細胞内へ注入し、がん化を誘発する。特に日本人が保有している *H. pylori* のアミノ酸配列 (EPIYA ドメイン)は ABD 型の東アジア型と呼ばれるもので、他の型よりも発癌誘導能が強い。事実、日本における胃癌の発症率は高く、その 80%以上は *H. pylori* 感染が原因である (Plummer et al. Int. J. Cancer 2015)。

<発癌物質 H. pylori と CTA の関係>

申請者は、*H. pylori* がマウス腫瘍細胞株 Meth-A 及び C3H/10T_{1/2} に対して、**悪性形質の獲得と共に、特定の癌/精巣抗原 Mage-A3 と Mage-B4 の発現を誘導することを報告した** (Fukuyama et al. Tumor Biology 2012)。さらに、Methylcholanthrene でも同様に CTA が誘導されることを明らかにしている(unpublished, 図1)。当該結果から、**CTA の発現には序列が存在しており、悪性形質の獲得・蓄積が CTA の発現誘導の序列に関与していることが証明された。**なお臨床がんにおいて、

H. pylori 感染を起因としている胃がんでは、MAGE-A3 および KK-LC-1 が高頻度に発現していることも報告した(Shida, Fukuyama et al. Anticancer Res. 2015)。当該報告の中で申請者は、**MAGE-A3 と NY-ESO-1 の間に序列が存在していることも経験している。**発癌物質と CTA の関連性を示した報告は、申請者以外では Sharma らのみである (Sharma et al. PLoS One 2011)。

<生殖系細胞の成熟過程における CTA の発現順序>

生殖系組織内の各ステージにおける CTA の発現は複数報告があるが、その方法は、成人精巣を用いて、精原細胞以降の成熟過程を見たものである(Simpson et al. Nat. Rev.Can.2005, Cheng et al. Spermatogenesis 2011)。事実、精原細胞においては、多くの CTA が発現しており、**CTA の発現序列を見極めるには、精原細胞に分化する前、つまりは、胎児(仔)における始原生殖細胞(Primordial germ cell, PGC)の細分化したステージごとの発現を検討し、発現序列を見極める必要がある。**

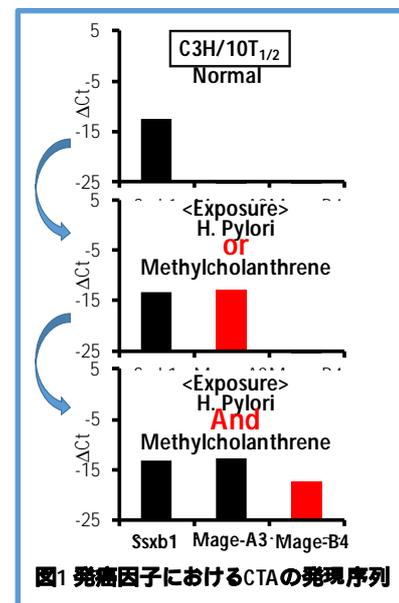


図1 発癌因子におけるCTAの発現序列

2. 研究の目的

i). PGCの成熟過程におけるCTAの発現

本研究では、マウス胎仔中のPGCについて、細分化したステージごとのCTAの発現パターンを精査する。その精査によって、PGCの成熟過程とがんの悪性形質獲得過程では、CTAの発現序列は逆相関していることを証明する(図2参照)。

ii). 臨床胃癌症例におけるCTAの発現と臨床病理学的背景との相関性解析

上述 i) の結果を踏まえて、臨床胃癌についてもCTAの発現パターンを解析し、臨床病理学的背景との相関性を精査し、CTAの発現序列に関連する因子を同定する。さらにその因子に連動するCTAについても選択する。この関連性を明らかにすることで、既存の分類方法に加え、CTAを指標とした新たながんの分類基準を提唱する(図3参照)。

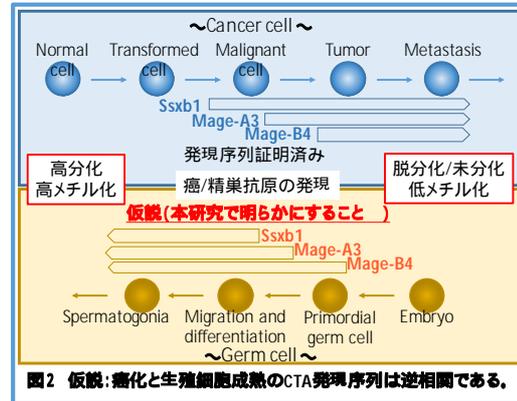


図2 仮説:癌化と生殖細胞成熟のCTA発現序列は逆相関である。

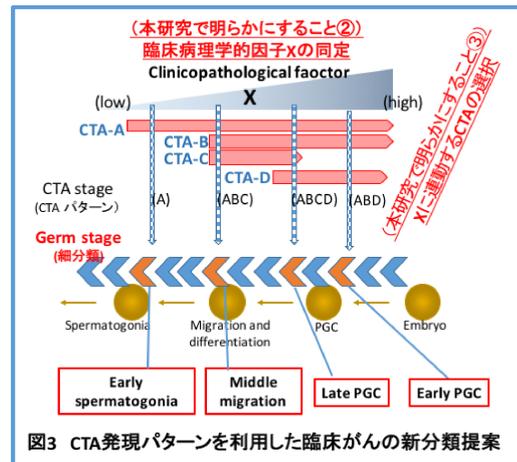


図3 CTA発現パターンを利用した臨床がんの新分類提案

3. 研究の方法

I. 悪性形質の獲得過程とPGCの成熟過程ではCTAの発現順序が逆相関であることの証明

(i) 胎児PGCにおけるCTAの発現解析

PGCが混入されていると考えられる生殖隆起および中腎を回収した。各交尾後日数(day post coitum, dpc)のPGCについて、RNAのクオリティを維持するために、当研究室に設置済みの核酸自動抽出装置QIACUBEを用いてRNAを抽出した。SuperScript III Reverse TransferaseにてcDNAを合成し、リアルタイムPCRにて、各CTAの遺伝子発現を測定した。各CTA遺伝子を測定するためのプライマー及びプローブはすでにデザイン済みのものを使用した(Fukuyama et al. Tumor Biol. 2012)。

II. 臨床胃癌におけるCTA発現の序列についての解析(福山、高橋)

胃癌の90%以上はH. pylori感染が原因である(Uemura et al. N. Eng. J. Med. 2001)。つまり、**日本における胃癌は単一の発がん物質から成立した臨床癌である。**そのため、発がんの原因が単一であるという仮説の下、臨床病理学的因子とCTAの発現序列を検討することが可能である。本研究は胃癌患者の腫瘍組織、非腫瘍組織(比較対照)及び術前血清を回収し、以下の解析を実施した。

(i) 各CTAの発現解析

外科切除術後の新鮮腫瘍組織および新鮮非腫瘍組織を回収し、QIACUBEを用いてRNAを抽出した。SuperScript III Reverse TranscriptaseにてcDNAを合成し、リアルタイムPCRにて各CTA遺伝子発現を測定した。なお、CTAの一つであるKita-kyushu lung cancer antigen-1 (KK-LC-1)については、適当なリアルタイムPCR用のプローブ、プライマーセットが存在しないため、40 cycle endpoint-PCRにて、評価した。

(ii) 臨床病理学的因子の解析

術前血清を用いてH. pylori抗体価をELISAにて測定した。抗体価が20以上の症例をH. pylori感染陽性とした。

(iii) CTAの発現解析パターンに連動する臨床病理学的因子の同定

各 CTA の発現パターンと H. pylori 感染との関連性について統計解析を行った。

4 . 研究成果

11.5dpc における PGC は Mage-B4 の発現が認められた。12.5dpc では、新たに Mage-A3 の発現が認められた。Mage-B4 の発現は維持されていた。13.5dpc では新たに Ssxb1 の発現が認められた。ほかの 2 遺伝子についても発現は維持されていた。14.5dpc でも 3 遺伝子で発現が維持されていた。本結果から、CTA は PGC から生殖細胞へ成熟する過程で CTA を Mage-B4、Mage-A3、Ssxb1 の順に発現することが明らかになった(図 4)。本結果は、図 1 および図 2 で示した癌細胞の悪性形質獲得過程における CTA の発現順序と逆であることが明らかとなった(図 5)。

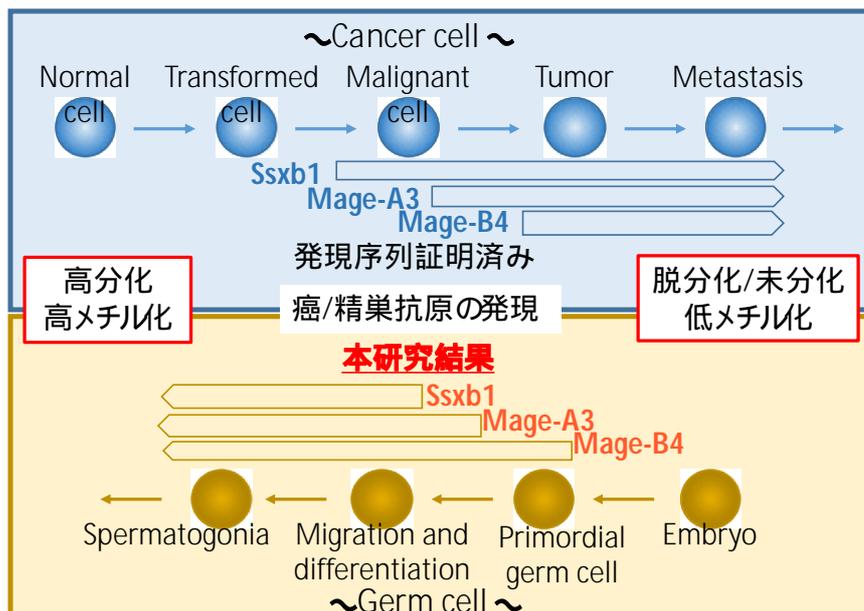
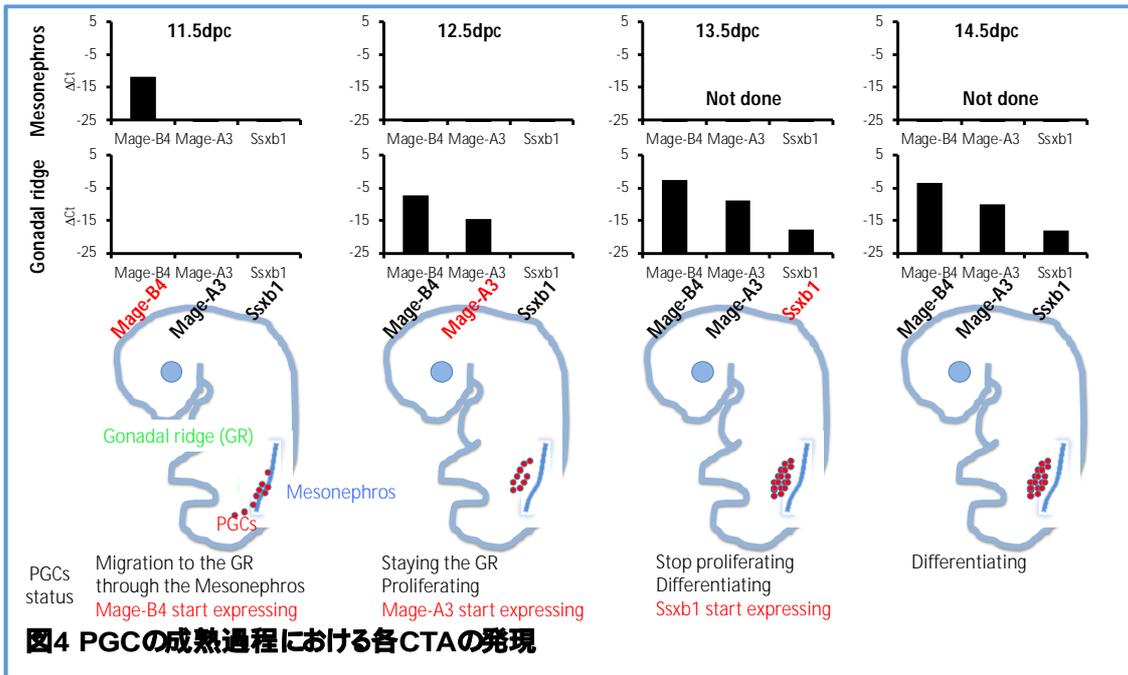


図5 検証結果:癌化と生殖細胞成熟のCTA発現順序は逆相関である。

臨床胃癌症例 245 例のうち、腫瘍組織の RNA の品質が担保され、かつ、血清の確保が可能であった 152 例で解析を行った。MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4, KK-LC-1 の腫瘍における遺伝子発現率は、26.8%, 41.5%, 20.7%, 17.1%, 22.0%, 80.5%であった。KK-LC-1 発現については *H. pylori* 感染との相関が認められた ($p=0.0026$)。なお、非腫瘍部においても KK-LC-1 の発現が認められ、その高発現頻度領域は胃体下部幽門腺領域であった。胃体下部幽門腺領域は、*H. pylori* の棲息領域であることから、KK-LC-1 は *H. pylori* 感染により発現誘導が起こり、その後その一部が癌化することが示唆された。今後は、非腫瘍領域における KK-LC-1 の発現率について焦点を当て、発癌との関連性について検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ichiki Yoshinobu, Matsumiya Hiroki, Mori Masataka, Kanayama Masatoshi, Nabe Yusuke, Taira Akihiro, Shinohara Shinji, Goto Hidenori, Kuwata Taiji, Takenaka Masaru, Oka Soichi, Chikaishi Yasuhiro, Fukuyama Takashi, Imanishi Naoko, Yoneda Kazue, Kuroda Koji, Kobayashi Noritada, Nakanishi Kozo, Tanaka Fumihito	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent topics of lung neuroendocrine tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 E133 ~ E134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.08.40	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TAKAHASHI YOSHIHITO, FUKUYAMA TAKASHI, FUTAWATARI NOBUE, ICHIKI YOSHINOBU, OHMIYA HARUKI, CHUMAN MOTOHIRO, YAMASHITA TETSURO, HIKI NAOKI, KUMAMOTO YUSUKE, YAMAZAKI HITOSHI, NONOGUCHI HIROSHI, NISHI YATSUSHI, KOBAYASHI NORITADA	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression of Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1 as Detected by a Novel Monoclonal Antibody in Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6259 ~ 6263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shida Akiko, Fukuyama Takashi, Futawatari Nobue, Omiya Haruki, Ichiki Yoshinobu, Yamashita Tetsuro, Nishi Yatsushi, Kobayash Noritada, Yamazaki Hitoshi, Watanabe Masahiko, Takahashi Yoshihito	4. 巻 26
2. 論文標題 Cancer/testis antigen, Kita-Kyushu lung cancer antigen-1 and ABCD stratification for diagnosing gastric cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 424 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v26.i4.424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuoka Yukiko, Izumi Yuichiro, Nagai Takanori, Fukuyama Takashi, Nakayama Yushi, Inoue Hideki, Horikawa Kahori, Kimura Miho, Nanami Masayoshi, Yanagita Kengo, Oshima Tomomi, Yamazaki Taiga, Uematsu Takayuki, Yamamura Rui, Kobayashi Noritada, Shimada Yoshitaka, Nagaba Yasushi, Nakanishi Takeshi, Yamashita Tetsuro, ほか	4. 巻 503
2. 論文標題 Fludrocortisone stimulates erythropoietin production in the intercalated cells of the collecting ducts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 3121 ~ 3127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KONDO YASUSHI, FUKUYAMA TAKASHI, YAMAMURA RUI, FUTAWATARI NOBUE, ICHIKI YOSHINOBU, TANAKA YOICHI, NISHI YATSUSHI, TAKAHASHI YOSHIHITO, YAMAZAKI HITOSHI, KOBAYASHI NORITADA, WATANABE MASAHIKO	4. 巻 38
2. 論文標題 Detection of KK-LC-1 Protein, a Cancer/Testis Antigen, in Patients with Breast Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5923 ~ 5928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.12937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuyama Takashi, Futawatari Nobue, Yamamura Rui, Yamazaki Taiga, Ichiki Yoshinobu, Ema Akira, Ushiku Hideki, Nishi Yatsushi, Takahashi Yoshihito, Otsuka Toshikazu, Yamazaki Hitoshi, Koizumi Wasaburo, Yasumoto Kosei, Kobayashi Noritada	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of KK-LC-1, a cancer/testis antigen, at non-tumour sites of the stomach carrying a tumour	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24514-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Taiga, Hatano Yu, Handa Tetsuya, Kato Sakiko, Hoida Kensuke, Yamamura Rui, Fukuyama Takashi, Uematsu Takayuki, Kobayashi Noritada, Kimura Hiroshi, Yamagata Kazuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0177764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Futawatari Nobue, Fukuyama Takashi, Yamamura Rui, Kobayash Noritada	4. 巻 5
2. 論文標題 Helicobacter Pylori Infection Induces Gastric Cancer and the Cancer/Testis Antigens Expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Infectious Diseases & Therapy	6. 最初と最後の頁 1000345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2332-0877.1000345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Futawatari Nobue, Fukuyama Takashi, Yamamura Rui, Shida Akiko, Takahashi Yoshihito, Nishi Yatsushi, Ichiki Yoshinobu, Kobayashi Noritada, Yamazaki Hitoshi, Watanabe Masahiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Early gastric cancer frequently has high expression of KK-LC-1, a cancer-testis antigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 8200 ~ 8206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v23.i46.8200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 FUKUYAMA TAKASHI, FUTAWATARI NOBUE, ICHIKI YOSHINOBU, SHIDA AKIKO, YAMAZAKI TAIGA, NISHI YATSUSHI, NONOGUCHI HIROSHI, TAKAHASHI YOSHIHITO, YAMAZAKI HITOSHI, KOBAYASHI NORITADA	4. 巻 31
2. 論文標題 Correlation Between Expression of the Cancer/Testis Antigen KK-LC-1 and Helicobacter pylori Infection in Gastric Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 403 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山縣一夫, 波多野裕, 半田哲也, 加藤佐樹子, 穂井田謙介, 山村瑠衣, 福山隆, 植松崇之, 小林憲忠, 木村宏, 山崎大賀
2. 発表標題 受精卵におけるエピゲノム編集(ゲノム編集技術を応用したペリセントロメアへの人為的・配列特異的DNAメチル化誘導)
3. 学会等名 受精着床学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二渡信江, 福山 隆 , 信太昭子, 高橋禎人, 西 八嗣, 小林憲忠, 山崎 等, 渡邊昌彦
2. 発表標題 胃癌における癌精巢抗原の発現と臨床病理学的検討について
3. 学会等名 第55回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福山 隆
2. 発表標題 癌/精巢抗原KK-LC-1の特性 診断治療のターゲットになりうるか
3. 学会等名 第28回新薬創製談話会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牛久 秀樹, 福山 隆, 二渡 信江, 江間 玲, 千野 慎一郎, 和田 治, 久保 任史, 近藤 康史, 高橋 禎人, 池永 誠, 小林 憲忠, 山崎 等, 西 八嗣, 渡邊 昌彦
2. 発表標題 胃癌におけるHelicobacter pylori感染と癌/精巢抗原の発現との関連性
3. 学会等名 第117回日本外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 モノクローナル抗体及びその使用	発明者 福山隆	権利者 学校法人北里研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2017-218872	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 EARLY STOMOCH CANCER DETECTION KIT AND USE THEREFORE	発明者 福山隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02017/188315	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 前癌状態の胃がん検出キット及び前癌状態の胃癌細胞の検出方法	発明者 福山隆	権利者 学校法人北里研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、2016-088	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----