

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591562
 研究課題名（和文） 大腸癌特異的発現を示す新規分子を用いた腫瘍マーカー診断と抗体・T細胞療法の開発
 研究課題名（英文） Development of diagnostic method and immunotherapy using a novel molecule specifically expressed in colorectal carcinomas
 研究代表者
 塚本 信夫（TSUKAMOTO NOBUO）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20407117

研究成果の概要：

大腸癌手術検体の DNA チップ解析から我々が同定した KU-CR4 は、高頻度かつ早期から大腸癌特異的に発現亢進がみられ、しかも細胞膜型と分泌型が存在することから、新規早期診断マーカー・治療標的として有望な分子である。本研究では、本遺伝子が大腸癌で発現亢進する機構、診断・治療への適用の可能性を検討した。抗体を複数作成し ELISA 検出系の構築を試みた結果、膜型蛋白質に対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA によって大腸癌患者血清中に KU-CR4 蛋白質を検出できた。この結果は血中の KU-CR4 蛋白質の検出が大腸癌診断に応用できる可能性を示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学、腫瘍抗原

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本人に増加傾向が著しく、現在、癌死亡率では女性で首位、男性で4位を占める。早期発見によりほぼ治癒することが可能であるが、進行癌においては近年著しく進歩した化学療法などを用いた標準治療で効果が得られない症例が多数存在する。早期発見が最も重要であるにも関わらず、現在使用されている大腸癌の腫瘍マーカー CEA や CA19-9 は早期診断に有効でなく、また進行癌でも約半数程度しか異常を示さない。そこ

で、我々は大腸癌の早期発見に用いることができ、しかもより高頻度で陽性を示す新規腫瘍マーカーの同定、および、近年その進歩がめざましい抗体療法や細胞療法の標的抗原の同定を試みてきた。

大腸癌手術検体から癌部、非癌部の RNA を抽出し DNA チップによって遺伝子発現量を解析し、非癌部に比べて癌部で有意に増加し、精巢以外の正常組織ではほとんど発現がみられないという条件で遺伝子を選出した結果、腫瘍抗原・腫瘍マーカーとなりうる複

数の候補遺伝子を得た。これらのうちのひとつで、全く構造・機能解析がなされていない新規遺伝子を KU-CR4 と命名した。RT-PCR で発現解析を進めた結果、正常組織では精巣にのみ弱い発現がみられ、各種癌細胞株では多くの大腸癌細胞株と一種類の肺癌（扁平上皮癌）細胞株に発現していたが、他の様々な癌種ではほとんど発現はみられなかった。大腸癌患者検体の癌部・非癌部での比較では22例中20例で癌部での顕著な発現上昇がみられた。発現上昇は病期の進行に依存するものではなくステージ0の検体においても上昇していた。さらに癌部から KU-CR4 をクローニングしたところ、2つの isoform(A, B) が同定され、いずれも癌部で発現が増加していた。遺伝子配列からは、A型は膜結合型、B型は分泌型であると考えられた。以上のように、大腸癌特異的に発現し、大腸癌患者検体において非常に高頻度かつステージ0の早期癌から発現亢進がみられ、細胞膜型と分泌型が存在することから、本分子が非常に有望な新規早期診断マーカー候補遺伝子になる可能性があり、また、抗体療法あるいはT細胞療法の標的として有望であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌に特異的に早期から発現している KU-CR4 について以下の点を基礎的および臨床的に明らかにすることを目的とした。

(1) 発現亢進の機構の解明：染色体上で隣接した遺伝子に大腸癌での発現亢進が見られないことから、転写レベルでの発現調節に焦点を絞り、大腸癌で知られる既知シグナル異常との関連を明らかにする。

(2) 遺伝子の機能、癌の悪性形質への関与の検討：本分子の機能を、特に、癌の悪性形質（異常増殖、アポトーシス抵抗性、浸潤転移、免疫抑制など）への関与の観点から検討する。また、A型遺伝子産物に対するリガンドあるいはB型遺伝子産物に対するレセプターの同定を試み、細胞間相互作用を介した生体内での機能を明らかにする。

(3) 診断（早期診断、予後診断など）への臨床応用の可能性：様々なステージでの患者血液検体中の分子測定系（ELISA）の構築により、早期診断、予後診断などへの有用性を検討する。

(4) 抗体療法・T細胞療法としての臨床応用の可能性：生細胞上の膜型分子を認識する抗体の作成により、抗体療法の標的としての可能性を検討する。また、T細胞療法の標的

になる可能性を明らかにするため、大腸癌患者における免疫原性をこの遺伝子に対する血清中IgG抗体反応により検討し、さらにT細胞の認識するエピトープを同定する。

以上の解析から、本遺伝子の機能を明らかにするとともに、大腸癌の有望な早期診断マーカーさらには治療標的として臨床に応用するための基礎検討を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現亢進の機構の解明

転写レベルでの発現調節に焦点を絞り、大腸癌で知られる Wnt/ β -catenin シグナル異常との関連を検討した。まず、KU-CR4 を高発現している大腸癌細胞株に、 β -catenin に対する siRNA を導入し、KU-CR4 の発現への影響を解析した。大腸癌細胞株のゲノム DNA から KU-CR4 のプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼによるレポーター系を構築した。このレポーターを導入した細胞に恒常的に活性化した β -catenin (Ser37Phe 変異体) を発現させ、レポーターの反応を解析した。KU-CR4 プロモーター領域に β -catenin の下流ではたらく転写因子 TCF の結合コンセンサス配列が複数存在したため、それらに変異を導入して転写への影響を解析した。

(2) 遺伝子の機能、癌の悪性形質への関与の検討

まず、増殖や転移能等の癌悪性形質への寄与を解析した。KU-CR4 を高発現する大腸癌細胞株に対して KU-CR4 特異的 siRNA により発現を抑制したときの癌悪性形質の変化を解析した。siRNA は A 型、B 型を同時に抑制するものと単独で抑制するものを用い、*in vitro* 培養系での増殖、転移能を解析した。

また、A型およびB型遺伝子産物と IgG Fc との融合蛋白質を作成し、A型、B型それぞれに結合するリガンドあるいはレセプターの探索を試みた。まず、KU-CR4 が発現している大腸癌細胞株と精巣から作成された cDNA をファージライブラリーとして大腸菌に発現させ、IgG Fc 融合蛋白質の結合する分子をスクリーニングした。

(3) 診断（早期診断、予後診断など）への臨床応用の可能性

まず、A型、B型共通配列、あるいは各型の特異的領域に存在するペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作成した。また、A型のリコンビナント蛋白質を抗原としたポリクローナル抗体も作成した。これらの抗体により ELISA 検出系の構築を試み、各病期の大腸癌の患者末梢血中に KU-CR4 遺伝子産物が検出できるかを検討した。

(4) 抗体療法・T 細胞療法としての臨床応用の可能性

抗体治療の標的としての可能性を検討するため、上記(3)で作成した各種抗体が大腸癌細胞株表面の KU-CR4 蛋白質を生細胞の状態認識するかについて検討した。

KU-CR4 の大腸癌患者における抗原性を検討するため、KU-CR4 蛋白質に対する IgG 抗体反応が大腸癌患者血清に存在するか検討した。また、HLA-A02、-A24 に結合する可能性のあるペプチドが存在するか検討した。

4 . 研究成果

(1) 発現亢進の機構の解明 :

本遺伝子が大腸癌で発現亢進する機構について解析するため、プロモーター領域で転写因子結合配列を検索した結果、大腸癌で恒常的活性化がしばしばみられるβ-catenin と転写に関わる TCF の結合配列が複数存在することが示唆された。そこで、この領域をクローニングし、ルシフェラーゼによる転写レポーターアッセイを行ったところ、3カ所の TCF 結合配列が活性化型β-catenin に反応した。3カ所の TCF 結合配列を同時に変異させたレポーターでは活性化型β-catenin に対する反応がほとんど失われた。これと一致する結果として、本遺伝子を高発現する大腸癌細胞株で siRNA によるβ-catenin の発現阻害を試みたところ、本遺伝子の mRNA 発現が抑制された。従って、大腸癌での本遺伝子の発現亢進にβ-catenin が寄与していると考えられたが、同様にβ-catenin の活性が高い悪性黒色腫では本遺伝子の発現は認められなかったため、β-catenin 活性化単独ではなく他の分子機構も本遺伝子の発現亢進に関与していることが考えられる。

(2) 遺伝子の機能、癌の悪性形質への関与の検討 :

KU-CR4 を高発現する大腸癌細胞株において、A 型、B 型それぞれに特異的な siRNA、あるいは両方に共通な配列に対する siRNA を用いて KU-CR4 の mRNA 発現を抑制し、増殖、運動能に対する影響を解析したが、有意な影響は認められなかった。

KU-CR4 に結合する分子を大腸癌細胞株と精巢由来のライブラリーでスクリーニングした結果、複数の遺伝子クローンが得られたが、これらが KU-CR4 に結合するかの生化学的な検証はこれからの課題である。

(3) 診断 (早期診断、予後診断など) への臨床応用の可能性 :

この遺伝子に対するポリクローナルなペ

プチド抗体をまず作成した結果、強制発現させた遺伝子産物や患者血清中の蛋白質をウエスタンブロット法で検出でき、固定した大腸癌細胞株の免疫染色で細胞表面に A 型を検出できたが、B 型の分泌は検出できなかった。一方、これらの抗体は固定しない大腸癌細胞株表面の蛋白質をフローサイトメトリーにより検出することはできなかった。そこで、A 型遺伝子産物を大腸菌で作成し、新たに 2 ロットのポリクローナル抗体を作成したところ、これらのうち一方が固定しない大腸癌細胞表面の蛋白質をフローサイトメトリーによって検出することができた。

次に、大腸癌患者血中に KU-CR4 が存在するかを明らかにするために、これらペプチドあるいはリコンビナント蛋白質に対する抗体を組み合わせる ELISA 検出系の構築を試みた結果、A 型リコンビナント蛋白質に対するポリクローナル抗体を捕獲抗体、検出抗体両方に用いるサンドイッチ ELISA によって患者血清中に KU-CR4 蛋白質を検出できた。大腸癌のステージ別では、0 期で 9 人中 1 人、1 期で 16 人中 3 人、2 期で 16 人中 5 人、3 期で 16 人中 3 人、4 期で 15 人中 4 人に検出されたが、健常人 15 人中の 1 人にも検出された。この結果は大腸癌患者血中に A 型 KU-CR4 蛋白質が存在し、診断に応用できる可能性を示唆する。しかし、手術検体での mRNA 発現亢進の頻度に比べて血中蛋白質の検出頻度はかなり低く、検出の高感度化が今後の課題である。

(4) 抗体療法・T 細胞療法としての臨床応用の可能性

大腸癌細胞株表面の KU-CR4 分子を固定せずに認識できる抗体が得られたことから、抗体療法の可能性が期待されるが、より強く特異的に KU-CR4 分子を認識するモノクローナル抗体の開発が不可欠であり、今後の課題である。また、ファージで大腸菌に発現させた KU-CR4 蛋白質を大腸癌患者血清が認識する例が認められ、T 細胞療法の標的になる可能性が考えられたが、T 細胞の認識するエピートペプチドを HLA-A02、-A24 を対象として検索したところ、強い結合が期待されるペプチドが得られず、これに関しても今後の検討課題である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Mochimaru H., Takahashi E., Tsukamoto N., Miyazaki J., Yaguchi T., Koto T., Kurihara T., Noda K., Ozawa Y., Ishimoto T., Kawakami Y.,

Tanihara H., Saya H., Ishida S., Tsubota K. Involvement of Hyaluronan and Its Receptor CD44 with Choroidal Neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009, in press. 査読有

Kawakami Y, Fujita T, Kudo C, Sakurai T, Udagawa M, Hasegawa G, Ishida A, Kitagawa Y, Tanabe M, Saito M, Izumi Y, Kawamura M, Yaguchi T, Ueda Y, Hayashi E, Wang Q, Okada S, Tsukamoto N, Matsuzaki Y, Sumimoto H, Takeuchi H, Tanikawa A, Handa M, Amagai M, Kobayashi K, Ikeda Y, Azuma I, Kitajima M. Dendritic cell based personalized immunotherapy based on cancer antigen research. Frontier in Bioscience. 13:1952-1958. 2008. 査読無

Kawakami Y, Fujita T, Kudo C, Sakurai T, Udagawa M, Hasegawa G, Ishida A, Kitagawa Y, Tanabe M, Saito M, Izumi Y, Kawamura M, Yaguchi T, Ueda Y, Hayashi E, Wang Q, Tsukamoto N, Matsuzaki Y, Sumimoto H, Takeuchi H, Tanikawa A, Handa M, Amagai M, Kobayashi K, Ikeda Y, Azuma I, and Kitajima M. Development of individualized immunotherapy based on the analysis on anti-tumor immune responses to the human tumor antigens identified using immunological and genetic methods. Gene Therapy 2007: 240-248, 2007. 査読無

[学会発表](計6件)

塚本信夫、長谷川豪、永濱康晴、大浪陽子、河上裕、ヒト悪性黒色腫瘍細胞株 side population 分画の癌幹細胞様性質と免疫抵抗性、第8回日本再生医療学会総会、2009年3月6日、東京国際フォーラム

Nobuo Tsukamoto, and Yutaka Kawakami, Possible immunosuppression by pDC impairment through expression of immunoglobulin-like transcript 7 ligand (ILT7L) on lung cancer cells. The 13th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2008年12月13日、韓国

Nobuo Tsukamoto, Go Hasegawa, Yasuharu Nagahama, Yoko Onami, Yutaka Kawakami, Possible mechanisms for immune-resistance of side population of human cancer cell lines with cancer stem like characteristics. 第38回日本免疫学会総会、2008年12月2日、京都国際会議場

Nobuo Tsukamoto, Kana Teramoto, Tsutomu Okada, Yoko Onami, Yosuke Ida, Yuko Kitagawa, Yutaka Kawakami, Identification of KU-CR4 as a Potential Diagnostic Marker for Colorectal Carcinomas. 第67回日本癌学会総会 2008年

10月29日、名古屋国際会議場

Yutaka Kawakami, Hidetoshi Sumimoto, Chie Kudo, Nobuo Tsukamoto, Tomonobu Fujita, Toshiharu Sakurai, Tomonori Yaguchi, Tomoko Iwata, Naoshi Kawamura, Use of cultured dendritic cells for immunotherapy of cancer. 第67回日本癌学会総会、2008年10月28日、名古屋国際会議場

Nobuo Tsukamoto, Starlyn Okada, Yusuke Sasaki, Yutaka Kawakami, Possible immunosuppression by ligands for immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7) expressed on cancer cells. 第37回日本免疫学会総会、2007年11月22日、グランドプリンスホテル新高輪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 信夫 (TSUKAMOTO NOBUO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20407117

(2) 研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50161287

(3) 連携研究者