

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590571

研究課題名（和文） 新規がん・精巣抗原を基盤としたがんの検査・診断法の開発

研究課題名（英文） Development of tumor diagnosis method using cancer/testis antigens.

研究代表者

小野 俊朗 (ONO TOSHIRO)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：50185641

研究成果の概要（和文）：精度の高いがんの検査・診断のためには標的となるがん抗原、遺伝子の同定が必要となる。このためには種々のがんに発現するが正常組織では精巣に局限しているがん・精巣(CT) 抗原が最も適している。本研究では SEREX 法を用いて新たに数種類の CT 抗原を同定し、がん患者に免疫原性を有することを証明した。作製したこれらの組換えタンパクを用いて広範囲ながん種に対して精度の高い新規の血清診断・検査法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Cancer/testis (CT) antigens are expressed in normal germ cell line tissues and various cancers. They are considered promising target molecules for immunotherapy for patients with various cancers. We performed serological identification of antigens by recombinant expression cloning to identify CT antigens. The humoral immune response of cancer patients against the newly defined CT antigens was confirmed. This study indicated that the newly defined CT antigens facilitates their use as diagnostic reagents and establishes a testing and diagnostic method effective to cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：がん・精巣抗原、SEREX、抗体、抗原、ELISA、腫瘍マーカー、リアルタイム RT-PCR

## 1. 研究開始当初の背景

がんに対する効果的な検査及び診断、あるいは治療法を確立するためには対象となるがんに高頻度で発現し、しか

も抗原性が強いがん抗原を選定する必要がある。これまでに細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) あるいは血清中の抗体が認識するがん抗原が次々と明らかに

なってきた。ヒトへの利用を考えると、種々のがんが発現するが正常組織では精巣に限局しているがん・精巣(CT) 抗原がもっとも適している。この成果をもとに、がん抗原ペプチド等を使用したがん免疫治療が行われているが、効果は限られ対象となるがんも限定されている。現在多くの CT 抗原が同定、報告されている。その数に関しては確定していないが、そのほとんどは欧米で同定されたものである。これらのすべてががん患者に対して免疫原性が強いわけではなく、がんの診断、検査のマーカー、あるいはがん治療に有望な CT 抗原は限られている。NY-ESO-1 が代表的な CT 抗原で、欧米を中心に臨床応用され、悪性黒色腫などで一定の効果が得られた例もある (Jager et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 12198-12203, 2000)。われわれはこれまでに 3 種類の CT 抗原(OY-TES-1、AKAP3、XAGE-1) と今回の予備的実験で得られた GKAP1 及び CCDC62 などを同定している。これらは各種のがんに発現していた。これまでの研究によると代表的な CT 抗原について、人種により発現頻度に大きな違いがあることがわかってきている。抗原の人種による発現頻度の違いはがんの検査・診断あるいはがん治療の標的分子として考える場合に重要な因子となってくる。日本人に高頻度に発現するがん抗原、特に CT 抗原を同定することは重要である。

## 2. 研究の目的

本研究はわれわれが同定した CT 抗原を腫瘍マーカーとして広範囲ながんを対象とした精度の高い検査・診断方法を構築

する。すなわちがんの存在の有無あるいは進行度の解析、患者の予後判定、さらにがん免疫治療のモニタリング法の確立を目標とする。具体的には 1) SEREX 法、DNA マイクロアレイ法などにより、さらに新たな CT 抗原を同定し、これらのがんでの発現解析を行なう。これによりさらに広範囲のがん種に対する抗原のパネルを得ることが出来る。2) 組換えタンパク、モノクローナル抗体の作製、細胞傷害性 T 細胞(CTL)の樹立、CTL エピトープ(HLA 結合ペプチド)の解析を行なう。すなわち、血清診断や組織診断、あるいは免疫モニタリングの材料の開発を行ない、がんの検査・診断方法を構築し、検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) CT 抗原の単離と同定

#### ① 新たながん特異抗原の検索

肺癌、大腸癌、卵巣癌、頭頸部癌などについて SEREX 解析を行なう。cDNA ライブラリーとしては自己癌組織を用いるが、これとは別に正常精巣を用いることで効率的に精巣特異遺伝子を単離出来る。また、DNA マイクロアレイを用いてがんを高発現する遺伝子を特定する。

#### ② 遺伝子発現解析

新たに単離したがん抗原候補について、遺伝子の発現を正常組織および各種のがん組織あるいはがん細胞株で解析する。このための解析法としては、RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、ノザンブロット、がんプロファイリングアレイを用いる。

#### ③ 組換えタンパクの作製

これまでに同定した CT 抗原のうち、OY-TES-1、XAGE-1、RFX4 については

すでに組換えタンパクは作製済みである。免疫原性の解析のために残りの AKAP3、GKAP1、CCDC62 についての組換えタンパクを作製する。さらに新たに同定された抗原についても組換えタンパクを作製する。

## (2) 免疫原性と免疫応答の解析

### ① 液性免疫応答の解析

各抗原に対するモノクローナル抗体を作製する。OY-TES-1、XAGE-1、RFX4についてはすでに作製済みである。

作製した組換えタンパクを用いた ELISA 法により、各種のがん患者血清中の抗体の頻度を解析する。さらに臨床パラメータとの関連について解析し、ELISA 測定系を用いての新規腫瘍マーカーとしての臨床的意義について検討する。

### ② 免疫組織化学的解析

モノクローナル抗体を用いて各種がん組織のパラフィン切片上で各抗原タンパクの発現を免疫組織化学的に解析する。抗原タンパクの発現と臨床パラメータとの関連について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 新たながん特異抗原の検索と同定

SEREX 解析を胃癌、肺癌、卵巣癌、大腸癌について行った。胃癌の SEREX 解析から CCDC62-2 及び GKAP1 の 2 種類の CT 抗原候補を同定した。肺癌からは新たに 72 種類の遺伝子を単離した。これらの中には既に肺癌で同定した XAGE-1 の他、機能不明の CT 抗原候補 (CT-1) を単離した。大腸癌からは 38 種類の遺伝子を単離した。これらの中には AKAP3 の他精巣特異抗原 (CT-2) が含まれていた。卵巣癌からは 13 種類の遺伝子を単離したが、すべて自己抗原で

あった。

### (2) 遺伝子発現解析

CT 抗原候補遺伝子の正常組織及び各種癌での発現について、定性的 RT-PCR 及び 定量的リアルタイム RT-PCR で解析した。

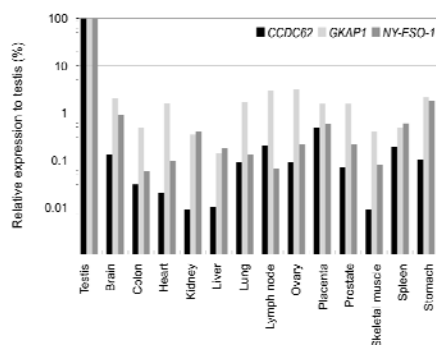


図1 リアルタイムRT-PCR法による正常組織での遺伝子発現解析

CCDC62-2, GKAP-1, CT-1, CT-2はそれぞれ正常組織では精巣にのみ発現し (図 1)、また各種の癌にも発現していた。

CCDC62-2は胃癌で 117 例中 8 例に、肺癌で 19 例中 5 例に、口腔扁平上皮癌で 34 例中 4 例に発現し、GKAP-1は特に口腔扁平上皮癌で高発現 (28 例中 5 例) していた。CT-2は大腸癌で 10 例中 5 例に、胃癌で 10 例中 4 例に、肝臓癌で 10 例中 6 例に、肺癌で 10 例中 1 例に、前立腺癌で 9 例中 1 例に発現していた。これらは CT 抗原の特徴を有していた。

### (3) 液性免疫応答の解析

SEREX 同定抗原の免疫原性の解析を行なった。CCDC62-2、GKAP1、CT-2 について組換えタンパクを作成し ELISA 法

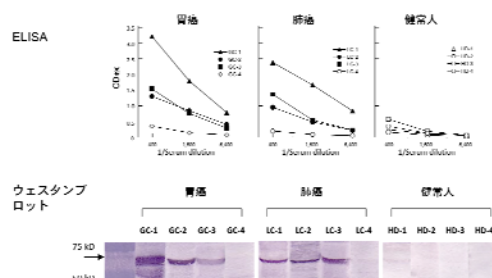


図2 癌患者のCCDC62-2タンパクに対する液性免疫応答

で、CCDC62-2 についてはさらにウェス

タンブロットで各種癌患者の抗体産生能を解析した(図2)。CCDC62-2は191例中13例の癌患者血清に、GKAP1は204例中15例の癌患者血清に、CT-2は101例中13例の癌患者血清に抗体が認められた。健康人血清には全く認められなかった(表1)。

表1 癌患者血清のCCDC62-2及びCT2タンパクに対する反応性

血清	CCDC62-2	CT-2
大腸癌	2/11 (18%)	4/44 (9.1%)
胃癌	6/104 (5.8%)	—
肺癌	5/76 (6.6%)	0/23 (0%)
肝癌	—	6/15 (40%)
頭頸部癌	—	3/19 (15.8%)
健康人	0/41 (0%)	0/16 (0%)

#### (4) 免疫組織化学的解析

CCDC62-2 特異的マウスモノクローナル抗体を作製し、CCDC62-2 タンパクの発現を免疫組織化学的に解析した。

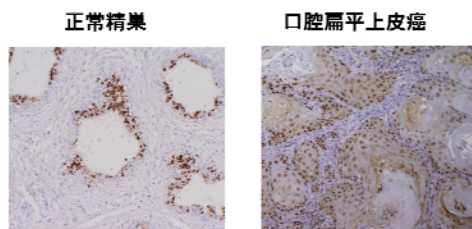


図3 CCDC62-2タンパクの発現

CCDC62-2 強制発現 HT0180 細胞では細胞質内に顆粒状に認められた。口腔扁平上皮癌組織では癌細胞の核、あるいは細胞質にCCDC62-2タンパク陽性であった(図3)。

#### (5) 結論

表2 これまでに同定した抗原

抗原	機能	同定方法
CT抗原		
OY- <u>TES-1</u>	プロアロシン結合タンパクsp32前駆体	クローニング
AKAP3	A-キナーゼアンカータンパク	データベース
XAGE-1	未知	SEREX
GKAP1	G-キナーゼアンカータンパク	SEREX
CCDC62-2	未知	SEREX
CT-1	未知	SEREX
CT-2	精子形成	SEREX
CT様抗原		
RFX4	制御因子	データベース

胃癌、肺癌、大腸癌などのSEREX解析により、新たながん抗原候補を同定した。CT抗原性を有するCCDC62-2、GKAP1、CT-2についてその免疫原性を解析し、これまでに同定したOY-TES-1、AKAP3、XAGE-1などと組み合わせた血清診断法による癌の検査・診断法を可能にした(図4)。

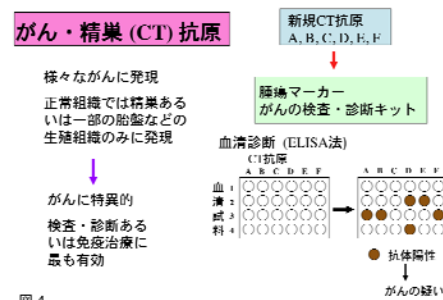


図4

#### 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5件)

- ① 銅前昇平、小野俊朗、佐々木朗、新規がん抗原 GKAP1 の同定と口腔扁平上皮癌での発現解析、日本口腔外科学雑誌、57、542-547、2011、査読あり
- ② T. Hanafusa, A. M. Ali Eldib, K. Kitaoka, Y. Ohue, E. Nakayama and T. Ono, Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies. Cancer Letters, 301, 57-62, 2011、査読あり
- ③ T. Fukazawa, Y. Maeda, J. Matsuoka, T. Ono (12名、4番目) Targeting KRAS mutation-bearing lung cancer in vivo by pulmonary surfactant-adenovirus-mediated gene transfer. Anticancer Research, 30, 4925-4935, 2010、査読あり
- ④ S. Domae, Y. Nakamura, (17名、17番目) Identification of CCDC62-2 as a novel cancer/testis antigen and its immunogenicity. International Journal of Cancer, 124, 2347-2352, 2009、査読あり
- ⑤ S. Kaya, A. Uenaka, S. Sto, T. Ono, T. Aji and E. Nakayama, Identification of a CD4 T-cell epitope in the rejection antigen from BALB/c radiation-induced leukemia RL $\sigma$ 1. Cancer Science, 99, 1141-1147, 2008、査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① S. Domae, T. Hanafusa, M. Otsuka, M. Muraoka, A. Sasaki, E. Nakayama and T. Ono, Humoral immune response of cancer patients against newly SEREX-defined antigen, GKAP1. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋市
- ② T. Hanafusa, S. Domae and T. Ono, Construction of phage scFv antibody against Protocadherin 11, a new tumor antigen candidate of prostate cancer, 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋市
- ③ T. Hanafusa, K. Kitaoka, Y. Ohue, E. Nakayama and T. Ono, Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪市
- ④ T. Fukazawa, J. Matsuoka, T. Ono (9 名、3 番目) Targeting KRAS lung cancer in vivo by pulmonary surfactant-mediated gene transfer. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪市
- ⑤ 花房直志、北岡賢太、大植祥弘、中山睿一、小野俊朗、SEREX 法による肺腺癌抗原の同定と発現解析、第 14 回日本がん免疫学会総会、2010 年 7 月 22 日、熊本市
- ⑥ T. Hanafusa, T. Ono and E. Nakayama, Simultaneous expression of multiple splice variants of *PCDH11X/Y* in tumor cells. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、横浜市
- ⑦ S. Domae, T. Ono (8 名、2 番目) Humoral immune response of cancer patients against new SEREX-defined antigen, CCDC62-2. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋市
- ⑧ 銅前昇平、小野俊朗 (7 名、2 番目) SEREX 法により同定した CCDC62-2 に対する癌患者の液性免疫応答、第 12 回基盤的癌免疫研究会総会、2008 年 7 月 2 日、さいたま市
- ⑨ K. Savas、上中明子 (6 名、4 番目) Identification of a CD4 T-cell epitope on tumor rejection antigen RLakt in BALB/c radiation-leukemia RL male 1. 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会、2008 年 7 月 2 日、さいたま市

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：癌診断キットおよび癌診断方法  
発明者：小野俊朗、中山睿一  
権利者：国立大学法人岡山大学  
種類：特許

番号：特願 2009-532105  
取得年月日：平成 22 年 3 月 10 日  
国内外の別：国内

名称：Cancer Diagnostic Kit and Cancer Diagnostic Method  
発明者：Toshiro Ono, Eiichi Nakayama  
権利者：National University Corporation Okayama University

種類：Patent  
番号：08791311.7 (EU)  
200880106505.9 (CN)  
取得年月日：Mar. 10, 2010 (EU),  
Mar. 11, 2010 (CN)  
国内外の別：国外

○取得状況 (計 2 件)

名称：癌診断方法および癌診断キット  
発明者：小野俊朗、中山睿一  
権利者：国立大学法人岡山大学  
種類：特許  
番号：第 4923252 号  
取得年月日：平成 24 年 2 月 17 日  
国内外の別：国内

名称：Cancer Diagnostic Kit and Cancer Diagnostic Method  
発明者：Toshiro Ono, Eiichi Nakayama  
権利者：National University Corporation Okayama University  
種類：US Patent  
番号：No. 8,158,369  
取得年月日：Apr. 17, 2012  
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 俊朗 (ONO TOSHIRO)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授  
研究者番号：50185641

(2) 研究分担者

花房 直志 (HANAFUSA TADASHI)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教  
研究者番号：00228511  
(H21~H23→連携研究者)

(3) 連携研究者

上中 明子 (UENAKA AKIKO)  
岡山大学・医学部・客員研究員、川崎医療福祉大学・研究員  
研究者番号：50273967  
(H20~H21)