

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 4 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592206

研究課題名（和文）癌関連抗原 TEX101 の頭頸部癌浸潤制御能及びその臨床応用に関する検討

研究課題名（英文）Expression and clinical analysis of a novel cancer/testis antigen, TEX101 in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

吉武 洋（YOSHITAKE HIROSHI）

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：00396574

研究成果の概要（和文）：生殖細胞マーカー糖タンパク質 TEX101 は、生殖細胞だけでなく頭頸部扁平上皮癌細胞にも高頻度に発現しており、新規の癌・精巣抗原であることが明らかとなった。また癌細胞における TEX101 低発現及び無発現症例では所属リンパ節への転移率が高い傾向があり、癌細胞の転移や浸潤に何らかの役割を果たしていると考えられた。本分子は頭頸部扁平上皮癌の診断マーカーや免疫療法における標的分子となりうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

A germ cell-marker glycoprotein, TEX101 is expressed not only in germ cells but also in cancer cells from patients with head and neck squamous cell carcinoma, demonstrating that this molecule is a novel cancer/testis antigen. The rate of lymph nodes metastasis tends to be low in the TEX101-positive HNSCC patients, compared to the patients with cancer of weak positive and negative expression of TEX101. TEX101 may be useful as a biological marker and a target for cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：TEX101、癌・精巣抗原、頭頸部癌、GPI アンカー型タンパク質

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は他部位における癌と比較し医療情報が少なく、一般の人々の認知度が低い。そのため医療機関初診時、既に進行癌となっている症例が 70 から 80% を占め、予後は悪い。進行癌症例に対しては集学的治療の必要性が広く認識されており、手術、化学療法、放射線照射を組合わせて治療が

行われている。しかし治療により形態や、呼吸・嚥下などの機能に障害を来しやすいという頭頸部特有の問題が存在するため、治療方法の選択において他部位癌にはない制約が存在する。したがって治療成績を維持しながら、かつ「生活の質」を向上させる新規の治療法の確立が求められている。

現在その候補として注目されているのが

腫瘍抗原を標的とした特異的免疫療法、いわゆる「癌ワクチン療法」である。近年の分子生物学及び免疫学の進歩により多数のヒト癌抗原が単離同定され、それらは以下のように分類されている。

1. 癌・精巣抗原 (MAGE ファミリー、NY-ESO-1 等)
2. メラノサイト分化抗原 (チロシンキナーゼ、gp-100 等)
3. 腫瘍変異抗原 (p53、SART-2 等)
4. 癌過剰発現自己抗原 (CEA、MUC-1 等)
5. 発癌ウイルス抗原 (HPV 由来抗原、EBV 由来抗原等)

この中でも癌ワクチン療法の標的分子として最も期待されているのが癌・精巣抗原である。なぜならば癌・精巣抗原は精巣以外の正常組織にはほとんど発現が認められないため、強力な免疫反応を誘導しても生体に対する副作用が最小限に抑えられると考えられるからである。この事実を踏まえて、現在多くの研究グループが治療に有効な癌・精巣抗原の探索を行っている。

もともと申請者の研究グループは、精子形成過程における詳細な分子機構を解明する目的で研究を行ってきたが、その過程で新規の生殖細胞マーカータンパク質である TEX101 を発見した。本分子は雌雄生殖細胞の発生段階で発現パターンが変化すること、生殖細胞以外の正常組織には発現が認められないことなどから、配偶子形成過程に重要な役割を果たしていると考えられている。さらに興味深いことに TEX101 は生殖細胞だけでなく遺伝子レベルでは肺小細胞癌や皮膚基底細胞癌にも発現しており、新規の癌・精巣抗原であることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、TEX101 を標的とした頭頸部癌に対するワクチンの開発であるが、まずその前段階として、頭頸部癌における TEX101 の発現頻度、及び本分子発現と癌進行度との関連について検討した。

3. 研究の方法

大腸菌を用いてヒト TEX101 組み換えタンパク質を作製し、これをウサギに免疫することにより抗ヒト TEX101 多クローン抗体を樹立した。本抗体を使用して、頭頸部癌における TEX101 の発現を免疫学的手法により解析した。

4. 研究成果

まず作製した抗ヒト TEX101 抗体の特異性を検討するために、正常ヒト組織切片の免疫組織化学的解析を行ったところ、精巣の精細管内にある細胞にのみ陽性反応を示し、その他の臓器には反応しなかった (図 1)。

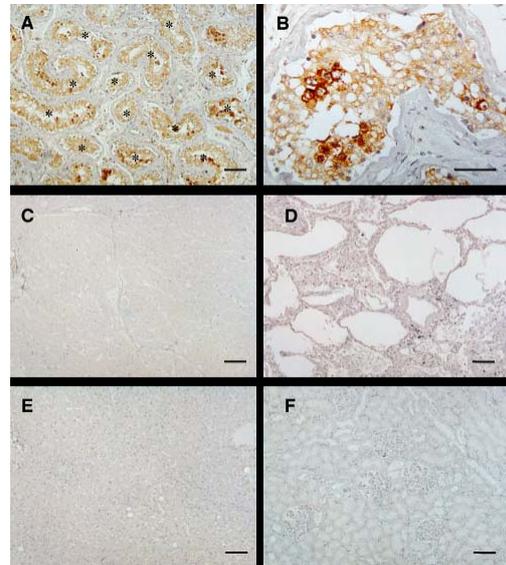


図 1 : 正常組織における TEX101 の局在。A, B : 精巣、C : 心、D : 肺、E : 肝、F : 腎。* : 精細管。スケール:50 μ m (A, C-F), 25 μ m (B)。

さらに本抗体を用いたウェスタンブロット解析では、精巣抽出液中でのみ特異的なバンドが観察され、多組織からの抽出液中ではバンドが観察されなかった (図 2)。



図 2 : 各種組織を用いたウェスタンブロット解析。上 : TEX101、下 : β -アクチン。1 : 脳, 2 : 喉頭, 3 : 肺, 4 : 胃, 5 : 小腸, 6 : 肝, 7 : 脾, 8 : 膵, 9 : 腎, 10 : 子宮, 11 : 卵巣, 12 : 前立腺, 13 : 精巣。

この結果、特異性、感度とも高い抗体が得られたと考えられたため、次に本抗体を用いて頭頸部扁平上皮癌を免疫染色した。その結果、64 症例中 54 症例で癌細胞にのみ陽性反応が認められた (図 3)。

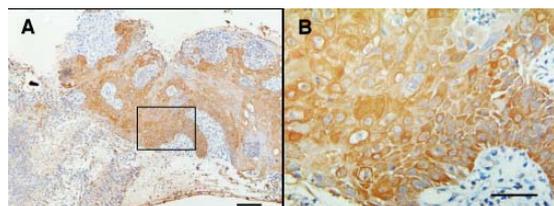


図 3. 頭頸部扁平上皮癌における TEX101 の

発現。BはAの拡大画像。スケール：50 μ m (A), 25 μ m (B)。

さらに癌細胞における TEX101 の発現と各種臨床所見との関連性を統計学的に調べたところ、性別、年齢、原発部位、腫瘍サイズ、進行度とは関係がなかったが、TEX101 発現陰性症例で所属リンパ節転移が多い傾向が認められた。

以上の結果より、TEX101 はタンパク質レベルでも頭頸部扁平上皮癌に発現する癌・精巢抗原であり、本分子は頭頸部扁平上皮癌に対する免疫療法の有力な標的分子となる可能性があると考えられた。

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 30 件)
(全て査読有)

1. Yoshitake H., Yanagida M. Maruyama M. Takamori K. Hasegawa A. Araki Y. Molecular characterization and expression of Dipeptidase 3, a testis-specific membrane-bound dipeptidase: Complex formation with TEX101, a germ cell-specific antigen in the mouse testis. *J Reprod Immunol* 2011;90:202-13.
2. Araki Y., Nonaka D. Tajima A. Maruyama M. Nitto T. Ishikawa H. Yoshitake H. Yoshida E. Kuronaka N. Asada K. Yanagida M. Nojima M. Yoshida K. Takamori K. Hashiguchi T. Maruyama I. Lee LJ. Tanaka K. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: Its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. *Proteomics* 2011;11:2727-37.
3. Ohta N. Fukase S. Suzuki Y. Ito T. Yoshitake H. Aoyagi M. Increase of Th2 and Tc1 cells in patients with Kimura's disease. *Auris Nasus Larynx* 2011;38:77-82.
4. Fujiwara H. Sato Y. Ideta A. Aoyagi Y. Araki Y. Imakawa K. Immune regulation of human embryo implantation by circulating blood cells. In: *The Human Embryo*. InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 2011 (in press).
5. Honda M. Asai T. Umemoto T. Araki Y. Oku N. Tanaka M. Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 317-21.
6. Sato D. Suzuki Y. Kano T. Suzuki H. Matsuoka J. Yokoi H. Horikoshi S. Ikeda K. Tomino Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011 (in press).
7. Yokoi H. Arakawa A. Saito T. Matsumoto F. Haruyama T. Yokoi N. Ikeda K. Organized hematoma of the maxillary sinus: A clinicopathologic study of five cases. *Journal of ENT* 2011 (in press)
8. Yokoi H. Yoshikawa H. Matsumoto T. Kawano K. Ikeda K. An inflammatory calcified nodule in the buccal subcutis-A case report. *B-ENT* 2011 (in press).
9. Yokoi H. Arakawa A. Kuribayashi K. Inoshita A. Haruyama T. Ikeda K. An immunohistochemical study of sinonasal hemangiopericytoma. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38: 743-6.
10. Ikeda K. Yokoi H. Kusunoki T. Saitoh T. Yao T. Kase K. Minekawa A. Inoshita A. Kawano K. Bacteriology of recurrent exacerbation of postoperative course in chronic rhinosinusitis in relation to asthma. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38: 469-73.
11. Maruyama M. Yoshitake H. Tsukamoto H. Takamori K. Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a putative glycosylphosphatidyl-inositol-anchored membrane protein on the mouse testicular germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:75-81.
12. Lei Z. Lin J. Li X. Li S. Zhou H. Araki Y. Lan ZJ. Postnatal male germ-cell expression of cre recombinase in Tex101-iCre transgenic mice. *Genesis* 2010; 48:717-22.
13. Fujiwara H. Ideta A. Araki Y. Takao Y. Sato Y. Horie A. Tsunoda N. Aoyagi Y. Konishi I. Possible contribution of circulating blood cells to embryo implantation. *Indian J Physiol Pharmacol* 2010; 50, suppl 1:51-60.

14. Wakabayashi I. Araki Y. Influences of gender and age on relationships between alcohol drinking and atherosclerotic risk factors. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34:S54-60.
15. Ikeda K. Yokoi H. Kusunoki T. Saito T. Yao T. Kase K. Minekawa A. Inoshita A. Kawano K. Relationship between olfactory acuity and peak expiratory flow during postoperative follow-up in chronic rhinosinusitis associated with asthma. *Ann Oto Rhinol Laryngol* 2010; 119:749-54.
16. Niyonsaba F. Ushio H. Hara M. Yokoi H. Tominaga M. Takamori K. Kajiwara N. Saito H. Nagaoka I. Ogawa H. Okumura K. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* 2010; 184: 3526-34.
17. Saitoh T. Kusunoki T. Yao T. Kawano K. Kojima Y. Miyahara K. Onoda J. Yokoi H. Ikeda K. Role of interleukin-17A in the eosinophil accumulation and mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151: 8-16
18. Shirai Y.* Yoshitake H. * Maruyama M. Takamori K. Ogawa H. Hasegawa A. Araki Y. Distribution of molecular epitope for Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody in the fertilization process. *J Reprod Dev* 2009;55:240-6. (*These authors contributed equally in this work)
19. Yoshitake H. Maruyama M. Yanagida M. Takamori K. Ogawa H. Hasegawa A. Araki Y. Effects of Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody on fertilization in the mouse. *Biol Reprod* 2009; S122.
20. Yamatoya K. Yoshida K. Ito C. Maekawa M. Yanagida M. Takamori K. Ogawa H. Araki Y. Miyado K. Toyama Y. Toshimori K. Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse. *Biol Reprod* 2009; 81: 889-97.
21. Fujiwara H. Araki Y. Toshimori K. Is the zona pellucida an intrinsic source of signals activating maternal recognition of the developing mammalian embryo? *J Reprod Immunol* 2009; 81: 1-8.
22. Fujiwara H. Ideta A. Araki Y. Takao Y. Sato Y. Tsunoda N. Aoyagi Y. Konishi I. Immune system cooperatively supports endocrine system-primed embryo implantation. *J Mammal Ova Res.* 2009; 26: 122-8.
23. Wakabayashi I. Araki Y. Associations of alcohol drinking with blood pressure and serum lipids in female smokers and nonsmokers. *Gender Med* 2009; 6: 290-9.
24. Inoshita A. Yokoi H. Matsumoto F. Yao T. Kawano K. Furukawa M. Ikeda K. A randomized prospective study of oral levofloxacin vs intravenous flomoxef prophylaxis in postoperative infection after endoscopic sinus surgery. *Am J Otolaryngol* 2009; 31: 360-3.
25. Ikeda K. Sakai Y. Haruyama T. Misawa N. Misawa N. Hori S. Kusunoki T. Furukawa M. Yokoi H. Yokoi N. Ichihari Y. Kawano K. Matsumoto F. Hayashi C. Narui Y. Iizuka T. Ito S. Inoshita A. Kasai M. Saito T. Minekawa A. Oba S. Cho Y. Bacterial contamination of Multiple-use atomizers commonly used in Japan. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 61: 193-6.
26. Saitoh T. Kusunoki T. Yao T. Kawano K. Kojima Y. Miyahara K. Onoda J. Yokoi H. Ikeda K. Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2009; 47: 275-9.
27. Ikeda K. Yokoi H. Saito T. Kawano K. Yao T. Furukawa M. Kusunoki T. Prevention of ultrasonic coagulator-mediated mucoperiosteal flap injury and defects by using a clip manipulation in the resection of the posterior nasal nerve. *Rhinology* 2009; 47: 45-7.
28. Yao T. Kojima Y. Koyanagi A. Yokoi H. Saito T. Kawano K. Furukawa M. Kusunoki T. Ikeda K. Eotaxin-1, -2 and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope* 2009; 119: 1053-9.
29. Kase K. Hua J. Yokoi H. Ikeda K. Nagaoka

I. Inhibitory action of roxithromycin on histamine release and prostaglandin D2 production from beta-defensin 2-stimulated mast cells. *Int J Mol Med* 2009; 23: 337-40.

30. Matsumoto F. Itoh S. Ohba S. Yokoi H. Furukawa M. Ikeda K. Biopsy of cervical lymph node. *Auris Nasus Larynx* 2009; 36: 71-4.

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshitake H. Yanagida M. Maruyama M. Takamori K. Hasegawa A. Araki Y. Molecular characterization and expression of alpha-N-acetylglucosaminidase, a potential target molecule recognized with an anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4. 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July, 2010. Milwaukee, WI, USA.

2. Maruyama M. Yoshitake H. Tsukamoto H. Takamori K. Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein on the testicular germ cells. 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July, 2010. Milwaukee, WI, USA.

3. Yoshitake H. Maruyama M. Yanagida M. Takamori K. Ogawa H. Hasegawa A. Araki Y. Effects of Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody on fertilization in the mouse. 42th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July, 2009. Pittsburgh, PA, USA.

4. 吉武洋・柳田光昭・遠藤周一郎・高森建二・長谷川昭子・藤原浩・荒木慶彦:抗精子自己抗体 Ts4 標的分子の受精における作用及び対応抗原の分子性状解析。第 26 回日本生殖免疫学会、2011 年 12 月。名古屋。

5. 横井秀格・吉武洋・甲能直幸:花粉アレルギー検査における花粉アレルギーおよび CCD 検出頻度に関する検討。第 61 回日本

アレルギー学会秋季学術大会、2011 年 11 月。東京。

6. 吉武洋・丸山真由子・柳田光昭・高森建二・長谷川昭子・荒木慶彦:抗精子抗体 Ts4 関連分子 Dipeptidase 3 のマウス精巣における分子性状と発現に関する検討。第 24 回日本生殖免疫学会、2009 年 11 月。東京。

7. 丸山真由子・吉武洋・高森建二・小川秀興・荒木慶彦:マウス Ly6k の分子性状:臓器分布及び個体発生における精巣内発現の解析。第 102 回日本繁殖生物学会、2009 年 9 月。奈良。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉武 洋 (YOSHITAKE HIROSHI)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号: 00396574

(2) 研究分担者

荒木 慶彦 (ARAKI YOSHIHIKO)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70250933

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号: 80317487