

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 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：2170510

研究課題名（和文） 癌/精巣抗原を標的とした新しい癌早期診断システムの構築

研究課題名（英文） The assessment of cancer/testis antigens whether they express the early stage of cancer and use the targets for the diagnosis for early cancer.

研究代表者

福山 隆 (FUKUYAMA TAKASHI)

北里大学・メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：10462251

研究成果の概要（和文）：

癌/精巣抗原はあらゆる癌細胞に発現し、精巣・卵巣を除く正常組織では発現していない癌特異的タンパク質の総称である。報告者は癌/精巣抗原が早期癌診断システムの標的になるか否かを評価するため、発癌物質に暴露直後の癌/精巣抗原の発現の変化について検討した。本研究結果から、癌/精巣抗原は発癌物質に曝されただけでは発現せず、細胞が新たに悪性形質を獲得すると共に発現することがわかった。したがって、癌/精巣抗原は発癌物質によって悪性形質獲得直後に発現することから、早期癌診断システムの標的として適している。

研究成果の概要（英文）：

Cancer/testis antigens (CTAs) are the proteins expressing various types of cancer but not normal tissues except for germline cells. To assess whether CTAs is appropriate for the diagnosis of cancer in early stage, I performed the immediate alteration of CTAs in the various cells exposed a carcinogen. I found that cells were started to express CTAs with not only exposure a carcinogen but also acquiring malignancy. Therefore we know that CTAs are fit for the target for diagnosis of early cancer because of the immediately expression with exposure of a carcinogen in conjunction with acquiring malignancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム、癌/精巣抗原

1. 研究開始当初の背景

本邦において、生涯における癌の罹患率は約 50%であり、また、癌

による死亡は死因の 30%を占める。癌に罹患した場合、外科的手術、化学療法、放射線療法により治療

が行われるが、既存の標準治療法における完治は難しい。しかしながら、早期癌の時点で処理することで予後は改善される。現在の診断システムでは1cm以上の腫瘍塊の検出が限界であり、その的中精度も低い。したがって腫瘍細胞を高感度に特異的に検出するシステムが必要である。癌/精巣抗原(CTAs)はあらゆる種類の癌で発現が認められ、生殖系細胞を除く正常組織では発現していないタンパク質の総称である。癌に限局した発現様式からCTAsは癌細胞を検出するための標的分子として適している。しかしながら、CTAsに関してはどのような機序をもって発現するのか、また、いつ発現し始めるか等解明しなければならない課題がある。特に、CTAsが発現するタイミングに関しては、今後の早期癌診断システムの標的になるか否かの重要なキーポイントであり、早急に解明しなければならない課題である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標はCTAの発癌初期における発現について評価し、CTAを標的とした新規の癌診断システムを構築することである。本研究期間内では、発癌初期における癌細胞がCTAを発現するか否かを見極めることを目的とし、発癌物質の暴露直後における様々な細胞のCTAsの発現について検討し、CTAsが早期癌診断システムの標的としての適合性を評価した。

3. 研究の方法

(1) マウスCTAsの評価

CTAsの研究はヒトで先行しているためマウスの情報が乏しい。はじめに、今までに同定されたマウスCTAsであるMage-A3、Ssxa1、Ssxb1、Ssxb2、Cage-1およびOY-MS-4について定量的RT-PCRにて正常での発現パターンを確認した。

(2) Helicobacter pylori 感染実験

発癌初期状態を作製するために発癌物質暴露モデルを作製した。本研究では、胃癌の発癌物質として認定されているHelicobacter pyloriを用いて、in vitroでの感染実験を実施した。H. pylori感染に

使用した細胞は①正常細胞としてマウス正常胃および脾細胞、②前癌細胞株として、C3H/10T_{1/2}、③癌細胞株としてMeth-A、B16-F1およびMCAを用いた。各細胞に対して時間および感染菌数を変更することによって様々な感染強度のH. pyloriを感作させた際のCTAsの発現変化について定量的RT-PCRにて評価した。

(3) 誘導されたCTAの発現様式の検討

H. pylori感染により新たに発現したCTAについて、その発現がH. pylori刺激による一過性の発現か永続的な発現かを検討するため、H. pylori感染細胞からCTAを発現しているクローンを選択し、クローンからH. pyloriを排除するために抗生物質含有培地で培養した。培養後、そのクローン細胞株からさらにクローンを作製し、それらでもCTAの発現が認められるか否かを定量的RT-PCRにて確認した。

(4) H. pylori感染により作製されたCTA発現細胞株の悪性度の検討

H. pylori感染によって新たにCTAの発現を呈した細胞の細胞密度、増殖速度および生存率について、感染前の細胞株と比較した。

(5) 特定の発癌因子により特定のCTAが発現する可能性についての予備的検討

マウスの細胞において、H. pyloriが特定のCTAの発現を誘導することが明らかになった。H. pyloriは胃癌の原因物質として知られている。したがって、胃癌において、特定のCTAの発現頻度が高い可能性があげられた。そこで、本研究では予備的検討として、胃癌組織の一部よりCTAであるMAGE-A1、MAGE-A3、NY-ESO-1およびKK-LC-1遺伝子の発現を定量的RT-PCRにて評価した。

4. 研究成果

(1) マウスCTA

定量的RT-PCRの結果から、CTAの条件に該当するものはMage-A3、Ssxa1、Ssxb1およびSsxb2であることがわかった。したがって、以下の実験では以上の4抗原における検討を実施した。

(2) H. pylori 感染による CTA の発現変化について

様々な感染強度で H.pylori を感浅くさせた結果、①正常胃および脾細胞では CTA の発現は認められなかった。②前癌細胞 C3H10T_{1/2} では新たに Mage-A3 の発現が認められた。③癌細胞株では、Meth-A において Mage-A3 の発現が新たに認められ、他の CTAs の発現に変化は認められなかった。なお、B16-F1 および MCA ではいずれの CTAs の発現変化も認められなかった。なお、いずれの細胞においても、Mage-A3 の新たな発現は H. pylori 感染後 24 時間以内であった。

本研究結果は、特定の発癌物質が特定の CTA を発現するという新たな報告となった。さらに、H. pylori 感染した正常細胞では Mage-A3 の発現は認められないことから、CTA を早期癌診断システムの標的としても、正常感染細胞を陽性として検出しないということが明らかになり、早期癌診断システムの標的として適していると考えられた。また、感染初期から Mage-A3 の発現が認められることから早期癌の検出として CTAs は有用であると考えられた。

(3) 発現誘導された Mage-A3 の性質について

H. pylori 感染した Meth-A 細胞より Mage-A3 の発現が認められるクローンを作製した。抗生物質の添加により H. pylori を排除し、そのクローンよりさらにク 2 世代目のクローンを作製したところ、いずれの 2 世代目クローンからも Mage-A3 が発現していた。なお、Mage-A3 を永続的には発現する Meth-A クローンを Meth-A/pylori/3C3 として樹立した。

本研究結果から、H. pylori により発現誘導された Mage-A3 は一過性の発現ではなく、原因物質である H. pylori の非存在下でも永続的に発現することがわかった。当該研究は癌診断の標的として評価する研究である。本研究結果から、癌化に伴って発現した CTAs は永続的に発現すると推察され、その発現性は癌診断の標的分子として適していると考えられた。

(4) CTA 発現細胞株の悪性度について

上記 (3) にて樹立した Meth-A/pylori/3C3 とその起源株である Meth-A について、細胞密度(a)、増殖速度(b)および生存率(c)の比較をおこなった。増殖速度に関して差は認められなかったが、細胞が過密になった状態での細胞密度および生存率は Meth-A/pylori/3C3 の方が高値を示した (図 1)。

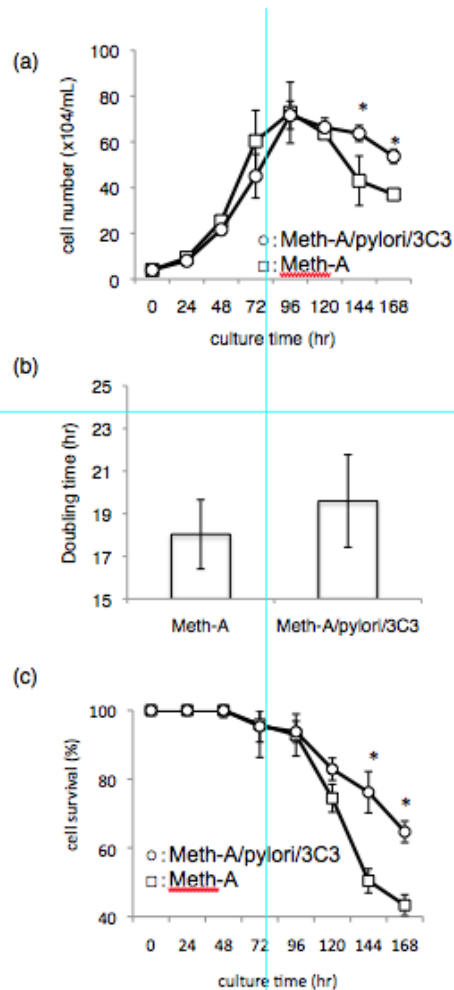


図1. Meth-A/pylori/3C3の悪性度の検討

本研究結果より癌/精巢抗原は悪性形質獲得に伴って発現することが推察された。

(5) 胃癌における CTAs の発現について

H. pylori がマウスの細胞に対して特定の CTA を誘導することが明らかになったため、ヒトの胃癌について特定の CTA の発現が認められるか予備的検討をしたところ、CTA の一つと考えられる KK-LC-1 で 79% の発現頻度を認めた。

KK-LC-1 の発現頻度は胃癌における H. pylori 感染頻度と近似値を示している。今後、症例数の増加により、胃癌における H. pylori 感染と KK-LC-1 の発現の関連性について調査する。なお、発癌物質と癌/精巢抗原の発現との関連性について言及するのは本研究が初めてのことである。

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1件)

① Fukuyama T., Yamazaki T., Fujita T., Uematsu T., Ichiki Y., Kaneko H., Suzuki T., Kobayashi N. Helicobacter pylori, a carcinogen, induces the expression of melanoma antigen-coding gene (MAGE)-A3, a cancer/testis antigen. Tumor Biology (2012) 33:1881-1887 DOI10.1007/s13277-012-0448-6

[学会発表] (計6件)

① 福山隆, 小林憲忠, 山崎大賀, 清水智子, 植松崇之, 金子博司, 鈴木達夫 As for Cancer/Testis antigens whether it can use for the early diagnosis? 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪) 2009. 12. 3

② 福山隆、山崎大賀、藤田智子、植松崇之、市来嘉伸、金子博司、鈴木達夫、小林憲忠 癌/精巣抗原は早期癌診断の標的物質になり得るか? -腫瘍細胞を用いた基礎的解析- 第15回日本がん免疫学会総会(大阪) 2011. 6. 30

③ Fukuyama T., Yamazaki T., Fujita T., Uematsu T., Ichiki Y., Kaneko H., Suzuki T., Kobayashi N. Helicobacter pylori is one carcinogenic factor and makes the MAGE-A3, one Cancer/Testis-antigen expressed The INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES 2011 Congress (Sapporo) 2011. 9. 10

④ Fukuyama T., Yamazaki T., Fujita T., Uematsu T., Ichiki Y., Kaneko H., Suzuki T., Kobayashi N. Malignantly Transformation makes C3H/10T1/2 cells express Cancer/Testis antigen MAGE-A3. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo) 2011. 10. 3

⑤ 福山隆、二渡信江、山崎大賀、藤田智子、植松崇之、高橋禎人、西八嗣、山崎等、市来嘉伸、小林憲忠 一発癌物質 Helicobacter pylori による

特定の癌/精巣抗原の発現誘導の可能性 第16回日本がん免疫学会総会(札幌) 2012. 7. 26

⑥ Takashi Fukuyama, Nobue Futawatari, Hitoshi Yamazaki, Taiga Yamazaki, Tomoko Fujita, Takayuki Uematsu, Mariko Ogi, Yoshihito Takahashi, Yatsushi Nishi, Yohei Yasogawa, Yoshinobu Ichiki, Noritada Kobayashi The induction of specific Cancer/Testis antigens expression by one carcinogen. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Sapporo) 2012. 9. 21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山隆 (FUKUYAMA TAKASHI)

北里大学・メディカルセンター・上級研究員

研究者番号: 10462251

