

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792343

研究課題名(和文) がん・精巣抗原を基盤とした、日本人に適用性の高い血清診断法の開発

研究課題名(英文) The development of serum diagnostic method applicable for the Japanese using cancer/testis antigens

研究代表者

銅前 昇平 (DOMAE, SHOHEI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70397892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する効果的な検査および診断、あるいは治療法を確立するには、特異的で、抗原性が強いがん抗原が必要である。ヒトへの利用を考えると、がん・精巣(CT)抗原がもっとも適している。SEREXスクリーニングによりTEKT5を新たに同定、TEKT5がCT抗原性を有し、さらにはがん患者に免疫原性を有することを明らかにした。SEREX同定抗原CCDC62-2、GKAP1、TEKT5の抗体陽性率は頭頸部癌患者で比較的高く、これらを腫瘍マーカーとして組み合わせ用いることにより、全く新しい血清診断に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer/testis (CT) antigens are considered promising target molecules for immunotherapy for patients with various cancers. To identify CT antigens, we performed serological identification of antigens by recombinant expression cloning analysis. We isolated 2 genes with testis specific profiles in the database, including Tektin5 (TEKT5). The humoral immune response of cancer patients against TEKT5 was confirmed. This study indicated that SEREX-defined CCDC62-2, GKAP1 and TEKT5 is immunogenic especially in squamous cell carcinoma of head and neck and demonstrated its potential as a newly diagnostic marker for cancer patients in combination with CT antigens.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：CT抗原 SEREX 腫瘍マーカー 抗体

1. 研究開始当初の背景

がんに対する効果的な検査および診断、あるいは治療法を確立するためには対象となるがんを高頻度で発現し、しかも抗原性が強いがん抗原を選択する必要がある。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巢に局限して発現するがん・精巢(CT)抗原がもっとも適している。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。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。CT抗原は現在まで約40種類が知られているが、そのほとんどが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、がんの検査および診断のマーカー、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抗原であり(Chen et al., PNAS, 1997) 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ている(Jäger, E et al., PNAS, 2000.)。CT抗原はがん種によってその発現頻度が異なるが、これまでの研究で人種間においても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。日本人に高頻度で発現するがん抗原、特にCT抗原を同定し選定することは重要である。われわれは胃癌のSEREXスクリーニングにより新規にCT抗原CCDC62-2を同定した(Domae et al., Int J. Cancer, 2009) これまでにもわれわれの研究グループでは3種類のCT抗原を独自に同定しており(OY-TES-1, AKAP3, XAGE-1) これらのCT抗原ががん患者に免疫原性を有

することを明らかにしてきた。本研究ではこれらのCT抗原に加え、さらに検索を抗原と抗体、両方向からのアプローチで行ない解析する。最終的にこれらを組み合わせて用いることで、日本人に適用性の高いがんの検査および診断方法、特に血清診断法の開発を行なう。

2. 研究の目的

頭頸部癌を含む広範囲ながんを対象とした精度の高い検査および診断方法の確立を目指す。すなわちがんの存在の有無、進行度、患者の予後解析が可能な血清診断システムの構築を目標とする。遺伝子およびタンパク発現も検証していく必要があるため、具体的には1)SEREX法、DNAマイクロアレイ法でがん抗原の同定、発現解析を行う。2)組換えタンパク、モノクローナル抗体を作製する。3)抗原の発現、抗体の産生と臨床パラメータとの関連を明らかにしていく。本研究では既知のCT抗原に加え、さらに検索を抗原と抗体、両方向からのアプローチで行ない解析する。最終的にこれらを組み合わせて用いることで、日本人に適用性の高いがんの検査および診断方法、特に血清診断法の開発を行なう。

3. 研究の方法

(1) がん抗原の検索と遺伝子発現解析

複数のCT抗原を発現しているがん患者血清を用いてSEREXスクリーニングを行なう。正常精巢由来のcDNAライブラリーを用いることで効率的に精巢特異遺伝子を単離できる。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。データベースより検索した精巢特異的遺伝子について、正常組織および種々のがんでの遺伝子発現を解析する。このための解析法としては、RT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法で定性

的、定量的に解析する。

(2) 組換えタンパク、モノクローナル抗体の作製

これまでに同定した CT 抗原のうち、CCDC62-2、GKAP1、XAGE-1 についてはすでに組換えタンパクは作製済みである。AKAP3 および新たに同定された免疫原性を持った抗原についても組換えタンパクを作製する。CCDC62-2、XAGE-1 についてはすでにモノクローナル抗体は作製済みである。

(3) 液性免疫応答の解析

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、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。

(4) 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発現を免疫組織化学的に解析する。抗原タンパク発現と臨床パラメータとの関連について検討する。

(5) 統計的解析と血清診断システムの構築

CCDC62-2 などわれわれ独自の CT 抗原と、特異性と抗原性を有する抗原を選択、それらをもとに作製した組換えタンパク、モノクローナル抗体をパネルとして組み合わせたシステムを構築し、検証する。抗原のタンパク質レベルと抗体レベルの両方を測定できる ELISA システムが理想的である。

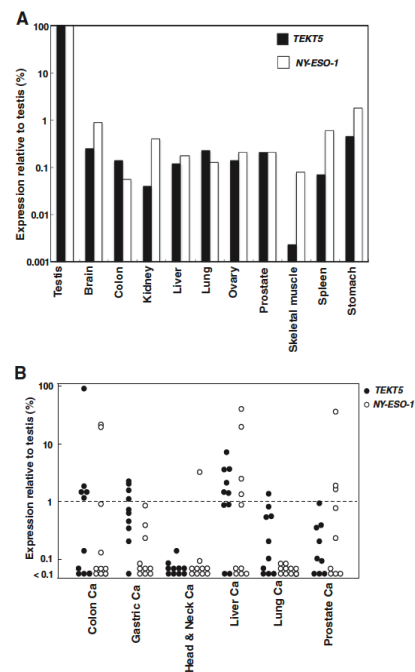
4. 研究成果

(1) SEREX スクリーニング (Tektin5 の同定)

SEREX 解析には大腸癌患者血清を用いた。2 種類の大腸癌患者血清を用いて同一患者の癌組織および正常ヒト精巢 mRNA より作製した cDNA ライブラリーの SEREX スクリーニングを行った。約 4 万クローンの SEREX スクリーニングの結果、60 個の陽性クローン

を単離、ホモロジー検索にて 38 種類の遺伝子を同定した。データベースによる正常組織発現検索を行ったところ、Tektin5 (TEKT5) およびわれわれが同定した既知の CT 抗原 AKAP3 が含まれていた。TEKT5 について、正常組織あるいは癌組織での遺伝子発現を RT-PCR 法あるいはタックマンプロブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各種の癌患者の TEKT5 に対する液性免疫応答は組換えタンパクを作成し、ELISA 法により解析した。

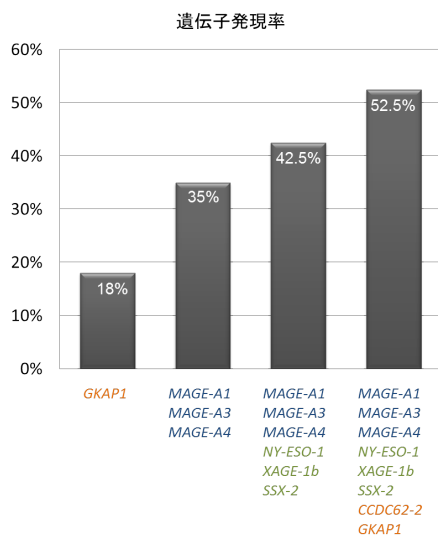
TEKT5 特異的タックマンプロブを用いたリアルタイム RT-PCR 法による正常組織の定量解析において、TEKT5 の発現は精巢に限局しており、その発現レベルは代表的な CT 抗原である NY-ESO-1 と同等であった。リアルタイム RT-PCR による癌組織における TEKT5 の定量解析において、大腸癌、肝臓癌、肺癌、胃癌などの癌組織では正常精巢に比し 1% 以上の発現を認めた。特に、大腸癌 10 例中 1 例では 10% 以上の発現を認めた。



さらに、各種がん患者について組換え TEKT5 タンパクを用いて ELISA 法により抗体の有無を解析したところ、調べた 101 人の

癌患者のうち 13 人に抗体が認められた。16 人の健常人血清には抗体は認められなかった。代表的な CT 抗原である NY-ESO-1 とほぼ同等な免疫原性を有することが示された。TEKT5 は各種がん患者に免疫原性を有し、我々がすでに同定した OY-TES-1、AKAP3、XAGE-1、CCDC62-2、GKAP1 などと組み合わせることにより、各種のがんに対して効果的な治療標的、あるいは腫瘍マーカーとなると考えられた。

(2) 遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析
約 50%の頭頸部癌において、調べた 8 種類の抗原のうち少なくとも 1 種類の抗原が発現していた。また 23%の頭頸部癌において 2 つ以上の CT 抗原が発現していた。

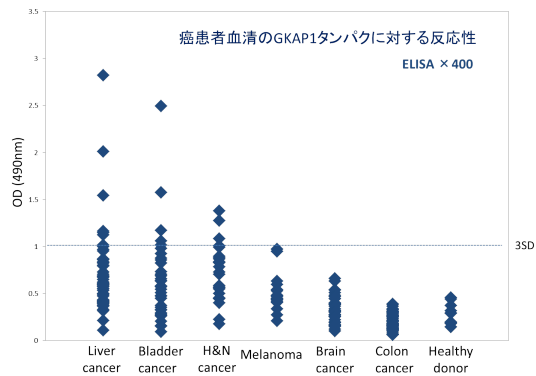


頭頸部癌で比較的発現頻度が高い既知の CT 抗原 MAGE-A、および CCDC62-2 のタンパク発現と、各種臨床病理学的因子との関連性を統計学的に解析した。MAGE-A タンパクは 13/45 例 (28.9%) で発現陽性であった。MAGE-A タンパク発現陽性群は MAGE-A タンパク発現陰性群に比べ、腫瘍径 (P=0.408)、進行病期 (P=0.542)、リンパ節転移 (P=0.215) においては両群に有意差を認めなかったが、低分化型 (P=0.0181) の比率が有意に高かった。一方、CCDC62-2

タンパクは 34/66 例 (51.5%) で発現陽性であったが、腫瘍径、進行病期、リンパ節転、低分化型においていずれも両群に有意差を認めなかった。

(3) 液性免疫応答解析

CCDC62-2 では調べた 309 人の癌患者のうち 25 人、8.1%に抗体が認められた。GKAP1 では 238 人の癌患者うち 14 人、5.8%に抗体が認められた。



TEKT5 では 101 人の癌患者うち 13 人、12.9%に抗体が認められた。内訳は、頭頸部癌患者で CCDC62-2 が 3/18 (17%)、GKAP1 が 3/25 (12%)、TEKT5 が 3/19 (16%) で抗体が認められた。その他各臓器別では肝臓癌で 9~40%、大腸癌で 9~18%、肺癌では 0~7%の患者血清において、それぞれの頻度でこれら抗原に対する抗体陽性反応が認められた。健常人血清とは全く反応しなかった。CCDC62-2 および GKAP1 の ELISA 陽性患者血清中の抗体は各タンパクに特異的であることをウェスタンブロット法により確認した。

(4) 結論

臓器を問わず複数の抗原あるいは抗体が、独立して陽性反応を示すことによって、陽性率の高い癌のスクリーニング検査、あるいは診断に応用できる。特に頭頸部癌における CCDC62-2、GKAP1、TEKT5 の抗体陽性率は比較的高く、これらを新規腫瘍マーカーとして組み合わせ、癌細胞由来のタンパク反応

性に産生される抗体を検出する、全く新しい血清診断に応用できる可能性を示した。

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2件)

Hanafusa T, Mohamed AE, Domae S, Nakayama E, Ono T. Serological identification of Tektin5 as a cancer/testis antigen and its immunogenicity. *BMC Cancer*. 2012, 14;12(1):520. 査読あり
DOI: 10.1186/1471-2407-12-520.

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 日本口腔外科学会雑誌 2011年 57巻 10号 542-547 査読あり

[学会発表](計3件)

Domae S, Ono T, Hanafusa T, Yoshida S, Kishimoto K, Nakayama E, Sasaki A. Identification of GKAP1 as a novel cancer antigen and its immunogenicity in oral squamous cell carcinoma. 21 Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Dubrovnik, Croatia, September 2012.

花房直志、銅前昇平、小野俊朗. Serological identification of Tektin5 as a cancer/testis antigen and its immunogenicity. 第71回日本癌学会学術集会 札幌 2012年9月

銅前昇平、花房直志、大塚正人、村岡美佳、佐々木 朗、中山睿一、小野俊朗. SEREX同定抗原GKAP1に対する癌患者の液性免疫応答. 第70回日本癌学会学術集会 名古屋 2011年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

銅前 昇平 (DOMAE SHOHEI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70397892

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

小野 俊朗 (ONO TOSHRO)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・教授

研究者番号：50185641

花房 直志 (HANAFUSA TADASHI)

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：00228511