

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592609

研究課題名(和文) 癌・精巣抗原TEX101を分子標的とした頭頸部癌ミサイル療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer/testis antigen, TEX101-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

吉武 洋(YOSHITAKE, HIROSHI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：00396574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規の癌・精巣抗原TEX101は、精子の子宮から卵管への移行と卵細胞との結合に必須の分子であり、この過程にはADAM3というエフェクター分子が関係していることが示唆された。従って本分子は細胞接着・遊走制御能を有している可能性が高いと考えられた。またTEX101は精細胞膜上でLy6k分子と共役しており、両分子は互いに細胞膜上での分子安定性に寄与していることが判明した。癌細胞におけるTEX101のエフェクター分子や共役分子は同定されていないが、これらのTEX101関連分子も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 novel cancer/testis antigen, TEX101 is required for migration of spermatozoa from the uterus into the oviduct. This molecule plays a role in this biological process as an effector molecule, presumably with ADAM3. Accordingly, these experimental results suggest that TEX101 may be a regulator of cell adhesion and migration. In addition, TEX101 was associated with Ly6k on the surface of germ cells, and these molecules were co-factors that contribute to the molecular stability of TEX101/Ly6k complex. Although associate molecule(s) of TEX101 in cancer cells still remain to be unidentified, TEX101-related molecules would be potential biological markers as targets for cancer therapy.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：TEX101 Ly6k 癌・精巣抗原 頭頸部癌 GPIアンカー型タンパク質

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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 70-80% 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、放射線照射を組合せた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「分子療法」である。これは癌細胞の特性を規定する分子に対し、特異抗体や阻害剤を用いてその生物学的作用経路を遮断し、癌の増殖や浸潤の抑制を図る治療法である。その分子標的として細胞増殖因子、シグナル伝達分子、血管新生因子、細胞接着因子、アポトーシス調節因子、転写因子、テロメラーゼなどが候補となっている。既に頭頸部癌に対しても分子標的療法の臨床研究が始まっており、特に上皮増殖因子受容体抗体や血管増殖因子阻害剤の治験が進んでいる。しかしこれら薬剤の単独投与の奏功率は低く、満足のいく結果が得られていないのが現状である。この原因の 1 つとして癌細胞の heterogeneity、即ち細胞それぞれの標的分子発現パターンの相違がある。従って効果的な治療を行うには、個々の癌細胞の生物学的特性を把握した上で、複数の分子標的薬を併用する必要がある。そのためには、より多くの、標的分子として利用可能な癌関連抗原の同定が必須である。

これまで我々は、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糖タンパク質である TEX101 を発見した(Kurita *et al.* *Biol Reprod* 2001)。本分子は生化学的解析により Ly-6/urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) ファミリーに属する glycosylphosphatidyl inositol (GPI) アンカー型膜タンパク質であることが明らかとなっている(Jin *et al.* *Zygote* 2006)。本分子は正常細胞においては雄性及び雌性生殖細胞と初期胚にのみ発現しており(Takayama *et al.* *Biol Reprod* 2005、

Shirai *et al.* *J Reprod Dev* 2009)、受精や発生過程に何らかの役割を果たしていると推測されるが、その生物学的機能の詳細はいまだ不明である。一方我々は本分子が頭頸部扁平上皮癌に高率に発現し、新規の癌関連抗原(癌・精巣抗原)であることを明らかにしている(Yoshitake *et al.* *Cancer Biomark* 2012)。TEX101 は生殖細胞以外の正常細胞には発現せず、また疫学上、本分子の発現と所属リンパ節転移との間に関係性が認められたことから(Yoshitake *et al.* *Cancer Biomark* 2012)、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。

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新規ミサイル療法の開発である。まずその前段階として、本分子が、前述したような癌治療における標的分子候補となりうる細胞生物学的機能を有するかについて、*Tex101* 遺伝子欠損マウス及び *Tex101* 遺伝子導入細胞株を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 正常細胞における TEX101 の生物学的機能解析：大阪大学と共同して *Tex101* 遺伝子欠損マウスを作製し、まず正常組織(生殖細胞)における本分子の生物学的機能を、受精・発生過程を中心に解析した。

(2) 遺伝子導入法による TEX101 発現細胞株を用いた細胞生物学的機能解析：遺伝子導入法を用いて TEX101 安定発現細胞株を作製し、細胞における本分子の生化学的および細胞生物学的特性について検討した。

4. 研究成果

(1) *Tex101* 遺伝子欠損マウスの解析
Tex101 遺伝子欠損マウスでは、雄性・雌性いずれの生殖細胞にも形態学的な異常は認められなかった。また精子の運動能に関しても野生型マウスと差はなかった。しかし本遺伝子欠損マウスの精子は、生体内では子宮から卵管への移行ができず、さらに生体外では卵細胞への結合率の低下を示した。この表現型はマウスの受精過程に必須な分子である a disintegrin and metalloproteinase domain 3 (ADAM3) の遺伝子欠損マウスで認められた表現型と同様であった。そこで TEX101 と ADAM3 との関係免疫沈降法により解析したところ、両分子は精細胞膜上で共役していることが判明した。従って本分子は

ADAM3の機能制御を介して精子の接着・遊走に参与していると考えられた。

以上の結果より、TEX101は細胞接着制御因子として、癌治療における標的候補分子となりうると推測された。

(2) TEX101発現細胞株を用いた解析

本分子の細胞生物学的な分子機能を明らかにする目的で、HEK293細胞株に*Tex101*遺伝子を導入し、TEX101安定発現細胞株を樹立した。フローサイトメトリーを用いた解析により、TEX101は本細胞株の細胞膜上で膜タンパク質として発現していることが確認された。さらにGPIアンカー部を特異的に切断する酵素であるphosphatidyl inositol-phospholipase Cで細胞をあらかじめ処理すると、細胞膜表面上のTEX101の発現が減少したことから、本細胞株においてもTEX101は細胞膜上でGPIアンカー型タンパク質として発現していることが判明した。

次に本遺伝子導入細胞株の増殖能や接着能を検討したが、非遺伝子導入細胞株との間に差は認められなかった。

以上の結果よりTEX101単独では細胞接着・遊走制御能を有しないと考えられた。

以前我々は、TEX101が、本分子と同様にLy-6/uPARファミリーに属する分子であるLy6kとマウス精細胞膜上で共役していることを明らかにしている(Yoshitake *et al. Biochem Biophys Res Commun* 2008)。前述の*Tex101*遺伝子欠損マウス精巢でLy6kの発現を調べたところ、極めて興味深いことに、本遺伝子欠損マウスではTEX101だけでなく、Ly6k分子の発現量も減弱していた(図1)。

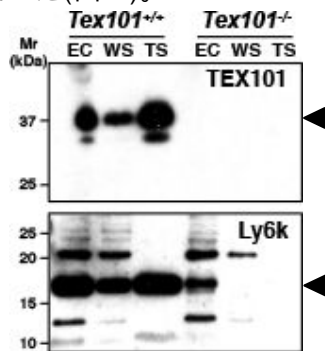


図1：マウス精巢におけるTEX101及びLy6k分子の発現。*Tex101^{+/+}*;野生型、*Tex101^{-/-}*; *Tex101*遺伝子欠損マウス。EC;細胞外分画、WS;細胞質分画、TS;細胞膜分画。矢印;特異バンド。

次に*Tex101*遺伝子欠損マウスにおいてLy6k分子の発現が減弱するメカニズムについて検討した。まず遺伝子発現量につい

てリアルタイムRT-PCR法で解析したところ、dipeptidase 3 (DPEP3)やADAM3などの他のTEX101関連精巣特異的遺伝子と同様に、*Ly6k*遺伝子の発現量に変化は認めなかった(図2)。

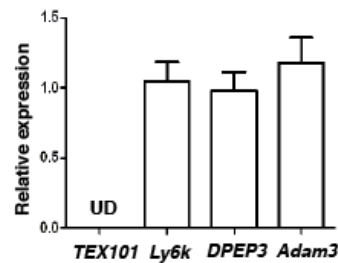


図2：*Tex101*遺伝子欠損マウス精巢におけるTEX101関連遺伝子の発現。UD;検出限界以下。

次に*Ly6k*遺伝子の転写の有無をポリソーム解析法で検討した。*Tex101*遺伝子欠損マウスの精巢ポリソーム分画における*Ly6k*の遺伝子発現量は野生型と同程度であり、*Ly6k*遺伝子の転写は*Tex101*遺伝子欠損マウスにおいても正常マウスと同等に行われていると考えられた(図3)。

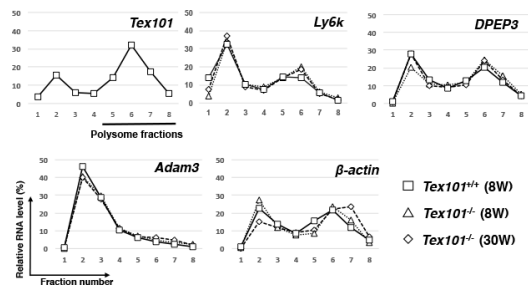


図3：ポリソーム解析法による*Tex101*欠損マウス精巢内の遺伝子発現。

以上の結果より、Ly6kは*Tex101*遺伝子欠損マウスにおいても、タンパク質の生成までは正常のマウスと同様であると考えられた。従って、本遺伝子欠損マウスにおけるLy6k分子の発現減少は、タンパク質生成以降の過程に異常があると考えられ、Ly6k分子の安定発現のためには、TEX101分子が細胞膜上で本分子と共局在することが必須であると推測された。

そこでこの仮定を確かめるために、細胞株を用いて検討した。

まずTEX101発現細胞株に*Ly6k*遺伝子を導入し、TEX101/Ly6k安定発現細胞株を作製した。次にTEX101 siRNAを導入して、本分子の発現を抑制した。その結果、siRNAが強く作用している細胞群においてTEX101分子だけではなく相補的分子であるLy6kの発現も減弱していた(図4)。しかし本細胞株にお

ける *Ly6k* 遺伝子の発現には変化は認められなかった。逆に本細胞株に *Ly6k* siRNA を導入したところ、*Tex101* 遺伝子の発現量は減少していなかったにもかかわらず、*Ly6k* 分子とともに *TEX101* 分子の発現量も減少していた (図 4)。

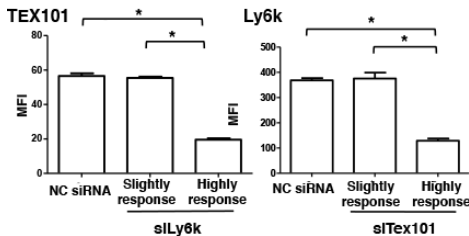


図 4 : siRNA を用いた *Tex101/Ly6k* 遺伝子導入細胞株における両分子の発現量の変化。

以上の結果は、*TEX101* 非存在下では *Ly6k* が細胞膜表面上で安定に存在できないことを示唆しており、*TEX101* がその生物学的機能を発揮するためには、*Ly6k* の共発現を必要とする可能性がある。しかし *TEX101/Ly6k* 共発現細胞株の細胞増殖能や接着能は、非発現細胞株と差がなかった。従って *TEX101* が細胞生物学的機能を発揮するためには、マウス精巢における *ADAM3* のようなエフェクター分子が必要であると考えられた。

今後、癌細胞における *TEX101* と *Ly6k* に共通のエフェクター分子の同定を試みる予定である。このエフェクター分子の遺伝子を *TEX101/Ly6k* 共発現細胞株に導入することにより、これらの分子群の生物学的機能が判明し、さらにこの細胞が癌治療用の抗体を作製する有力なツールになる可能性がある。

< 引用文献 >

- Kurita A. *et al.* (2001) Identification, cloning, and initial characterization of a novel mouse testicular germ cell-specific antigen. *Biol. Reprod.* **64**, 935-945
- Jin H. *et al.* (2006) Molecular characterization of a germ-cell-specific antigen, *TEX101*, from mouse testis. *Zygote.* **14**, 201-208
- Takayama T. *et al.* (2005) Sexually dimorphic expression of the novel germ cell antigen *TEX101* during mouse gonad development. *Biol. Reprod.* **72**, 1315-1323
- Shirai Y. *et al.* (2009) Distribution of molecular epitope for Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody in the fertilization process. *J. Reprod. Dev.* **55**, 240-246

Yoshitake H. *et al.* (2012-2013) Overexpression of *TEX101*, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark.* **12**, 141-148

Yoshitake H. *et al.* (2008) *TEX101*, a germ cell-marker glycoprotein, is associated with lymphocyte antigen 6 complex locus k within the mouse testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 277-282.

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 13 件)

Ishida Y. Zhao D. Ohkuchi A. Kuwata T. Yoshitake H. Yuge K. Takizawa T. Matsubara S. Suzuki M. Saito S. Takizawa T. Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNA during pregnancy. *Int J Mol Med* 2015; in press. (査読あり)

Kambe S. Yoshitake H. Yuge K. Ishida Y. Ali MM. Takizawa T. Kuwata T. Ohkuchi A. Matsubara S. Suzuki M. Takeshita T. Saito S. Takizawa T. Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p is transferred from BeWo cells into Jurkat cells via exosomes and modulates its target *PRKG1* gene expression in the recipient cells. *Biol Reprod* 2014; in press (査読あり) .

Kantake M. Yoshitake H. Ishikawa H. Araki Y. Shimizu T. Postnatal epigenetic modification of glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a prospective study. *BMJ Open* 2014;4:e005318. (査読あり)

Kurashina R. Kikuchi K. Iwaki J. Yoshitake H. Takeshita T. Takizawa T. Placenta-specific miRNA (miR-512-3p) targets *PPP3R1* encoding the calcineurin B regulatory subunit in BeWo cells. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:650-60. (査読あり)

Jikuzono T. Kawamoto M. Yoshitake H. Kikuchi K. Akasu H. Ishikawa H. Hirokawa M. Miyauchi A. Tsuchiya S. Shimizu K. Takizawa T. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2013;42:1858-68. (査読あり)

Fujihara Y. Tokuhiko K. Muro Y. Kondoh G. Araki Y. Ikawa M. Okabe M. Expression TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:8111-6. (査読あり)

Yoshitake H. Yokoi H. Ishikawa H. Maruyama M. Endo S. Nojima M. Yoshida K. Yoshikawa H. Suzuki F. Takamori K. Fujiwara H. Araki Y. Overexpression of TEX101, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* 2012-2013;12:141-8. (査読あり)

[学会発表](計7件)

Yoshitake H. Endo S. Hasegawa A. Hashii N. Kawasaki N. Takamori K. Fujiwara H. Araki Y. Structure of the oligosaccharide chain in the molecular epitope for an anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4.46th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 22-26, 2013, Montreal, QC, Canada

Yokoi H. Matsumoto Y. Watanabe I. Kawada M. Kohno N. A case of rhinogenic optic neuropathy associated with abducens nerve paralysis caused by mixed viral and bacterial infection. 16th Asian Research Symposium in Rhinology, August 29-31, 2013, Tokyo, Japan.

Yokoi H. Kodama S. Kohno N. Endoscopic endonasal approach for the treatment of extracranial huge schwannoma. 24th Congress of the European Rhinologic Society, in conjunction with the 31st International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, June 17-21, 2012, Toulouse, France.

吉武洋・弓削主哉・岩城隼・稲田貢三子・島友子・竹下俊行・齋藤滋・瀧澤俊広：妊娠初期の脱落膜および末梢血NK細胞におけるマイクロRNAの発現比較解析。第21回日本胎盤学会、2013年10月。ウインクあいち、愛知県名古屋市。

吉武洋・荒木慶彦・瀧澤俊広：抗精子自己抗体Ts4の受精における免疫学的作用及び対応抗原の分子性状解析。第118回日本解剖学会、2013年3月、かがわ国際

会議場、香川県高松市。

瀧澤俊広・吉武洋・菊池邦生・瀧澤敬美・岩城隼・軸園智雄・倉品隆平・竹下俊行：laser microdissection法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋標本のmicroRNA定量的解析。第118回日本解剖学会、2013年3月、かがわ国際会議場、香川県高松市。

横井秀格・甲能直幸：内視鏡下鼻内副鼻腔手術(ESS)にて摘出した鼻腔早期癌2症例。第113回日本耳鼻咽喉科学会総会、2012年5月、朱鷺メッセ、新潟県新潟市。

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・非常勤講師
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