

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591960

研究課題名(和文)

MSI陽性子宮体癌におけるフレームシフト変異タンパクの検出と免疫療法への応用

研究課題名(英文)

Detection of immunoresponse to flame-shift proteins in MSI positive endometrial cancer patients.

研究代表者

岩田 卓 (IWATA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30296652

研究成果の概要(和文):

MSI 陽性子宮体癌患者の特異的免疫応答を解析するため、既存の MSI 関連タンパクの変異部分のペプチドを合成し、血清中の抗体保有を検討したが抗体を検出できなかった。新たな抗原を同定するため、子宮体癌移植 SCID マウスを用いた SEREX 法を行い、MYEOV を同定した。MYEOV は子宮体癌の浸潤・転移に関連しており、予後因子となることを明らかとした。また、MSI 陽性子宮体癌患者の治療前および治療後の血清を用いて、担癌状態で特異的に認められる抗体の検出を試みたが、条件を満たす抗体を検出できなかった。

研究成果の概要(英文):

To detect specific immune response to flame-shift proteins in MSI positive endometrial cancer patients, we synthesized MSI associated flame-shift peptides, and evaluated antibodies to these peptides in MSI positive patients' sera. But none of MSI positive patients had specific antibodies to MSI associated peptides.

We detected MYEOV protein by SEREX method using SCID mouse sera, these mice was transplanted MSI positive endometrial cancer tissues. MYEOV was associated with invasion and migration in endometrial cancer cells, and was prognostic factor in endometrial cancer.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：子宮体癌 MSI フレームシフト 免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

近年子宮体癌の患者数は急増し、子宮癌全体に占める割合は約 40%に上昇している。子宮体癌は大腸癌や腎癌・膀胱癌などとともに遺伝性非ポリポーシス大腸癌(HNPCC)の関連腫瘍であり、その発癌要因として

hMLH1,hMSH2 などのミスマッチ修復遺伝子(MMR)異常とそれに伴う MSI (マイクロサテライト不安定性)の関与が指摘されている。研究代表者の属するグループは 80 例の子宮体癌患者の解析を行い、MSI 陽性率は 30%で他の MSI 関連腫瘍に比べて格段に高

く、また MSI 陽性症例では hMLH1 の不活性化が約 8 割で生じていることを明らかとし、さらに 1 期の進行癌症例については MSI 陽性例が陰性例に比べて予後が良い傾向があることを我が国ではじめて見いだした(2003 年日本産科婦人科学会総会)。MSI 陽性大腸癌においても同様に予後が良い傾向があるとされるが、この理由は MSI 陽性腫瘍では遺伝子変異が高頻度で生じる結果、さまざまな変異タンパクが産生され、免疫系が認識して腫瘍を攻撃するためと考えられている。しかしながら MSI 陽性腫瘍の生体内での免疫応答を検出したという報告は極めて少ない。申請者は癌特異抗原である CAGE に対する特異抗体が MSI 陽性子宮体癌・大腸癌患者において特異的に高頻度に検出されることを報告した(Clin Cancer Res. 11; 3949-57, 2005.)が、これは MSI 陽性腫瘍患者の特異的免疫応答を報告した画期的な報告である。この結果をうけて、申請者は CAGE タンパク同様に MSI 腫瘍特異的な免疫応答を生じ、かつ癌特異的に発現しているタンパクを検索した。このようなタンパクは免疫療法の標的抗原として使用した場合、癌細胞のみを免疫系に認識させるため最適な標的抗原となる。以前、申請者の所属するグループは、CDX2 遺伝子のフレームシフト変異が MSI 陽性大腸癌患者の免疫系に認識されることを報告していた(Cancer Res. 63:5564-5572, 2003)。このことから申請者は、MSI 標的遺伝子の反復配列のずれによって産生されるフレームシフト異常タンパクが MSI 陽性腫瘍特異的な免疫応答を生じる有力な癌抗原の候補であると考えた。そこで MSI 標的遺伝子のうち反復配列を有する TGF- $\beta$  R、PTEN、BAX、hMLH1、hMSH6、CDX2 について、それぞれのフレームシフトが生じた場合に産生される変異部分の融合タンパクを作成し、MSI 陽性子宮体癌患者血清中の抗体検出を試みた(平成 18 年科学研究費 若手 B)。その結果、TGF- $\beta$  R、PTEN について、実際の遺伝子変異とそれに対応した特異抗体を複数の患者で検出に成功し、当初の研究課題を達成した。この 2 つの変異タンパクに対して免疫応答が生じていることを示した報告はこれまでになく、貴重な結果と考えている。MSI 陽性腫瘍では多くの変異タンパクが産生されていると考えられ、免疫療法を行う上で有利な条件が整っている。免疫療法の臨床応用を考えた場合、実際に腫瘍で発現している変異タンパクを用いるのが理想であるが、これまでに MSI で遺伝子変異が生じることは広く知られているものの、実際にタンパクレベルで変異タンパクが発現していることを示した報告はない。しかしながら、申請者の実験結果は、腫瘍内でフレームシフト遺伝子変異が生じ、変異タンパクが産生され、さらに変異部分のペ

プチドが MHC class II 上に提示されていることを示している。したがって、患者血清中に抗体が検出された変異タンパクは実際に腫瘍で発現していると考えられ、標的抗原として選択可能となる。申請者が抗体検出に用いた手法は、融合タンパクと患者血清を用いたウェスタンブロット法であるが、この方法の感度は現在のところ 20%と低い。実際に免疫療法に用いるにはより感度の高い検出法の開発が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

当研究は研究代表者のこれまでの結果をひきつぎ、MSI 陽性子宮体癌に特異的に発現する変異タンパクの検出と免疫療法への応用について、研究するものである。以前の研究はヒスチジンタグと変異タンパクの融合タンパクを用いたが、今回は変異部分のペプチドを合成し、ELISA 法によって抗体検出を行う。さらに患者血清中の抗体という間接的な方法で癌特異抗原を検出するのではなく、変異タンパクそのものの検出を試みる。変異タンパクを免疫染色によって検出できれば、その抗原を標的抗原として選択し、治療の個別化が可能となる。

さらに MSI 陽性子宮体癌に対する新たな診断マーカーの検索のため、治療後 5 年以上が経過し、完治したと考えられる MSI 陽性子宮体癌患者の血清と、同一患者の治療前に採取・保存しておいた血清を用いて、それぞれが認識する抗原を同定し、治療後に消失する抗体の同定を試みた

## 3. 研究の方法

### (子宮体癌の遺伝子解析による MSI の検索)

MSI マーカーとして D2S123、D5S346、D17S250、BAT26、BAT25、MSH3、MSH6、TGF- $\beta$  RII、PTEN、BAX、MBD4A10、MBD4A6 の 12 種を用い、シーケンスによって変異を検出し、4 個以上の遺伝子で変異を認められた場合 MSI 陽性 (MSI-H) とする。

### (既存の MSI 関連変異タンパクに対する抗体の検出)

- (1) MSI 陽性腫瘍で生じる ICF R、PTEN、BAX、MSH3 の変異部分のペプチドを合成し、変異ペプチドと患者血清を用いた ELISA 法によって、患者血清中の特異抗体の検出をそれぞれのペプチドで行った。それぞれのペプチド配列を以下に示す。

ICF R: GGTLAIRFISAPQSSSTVT  
TAAPSGOYF

PTEN: MILTKQIKTKPTDTFLQILR

BAX: TRAGPGGASGCVHQEAEV  
SQAHRGRTGQ

および

TRHPSWPWTRCLMRPPRS

MSH3:KKRATFLALLWECSLPQARL

CLIVSRITLLLVQS

および

KKGQHFYWHCGSAACHRRGCV

- (2) それぞれのペプチドを DMSO に溶解し PBS で希釈して 1ng/ml とする。これを用いて ELISA plate に 100μl/well で over night で 4 放置し、coating する。
- (3) Blocking は 5% スキムミルク 250μl/well を用いて 1 時間で行う。洗浄した後一次抗体として患者血清を 1% BSA を加えた PBS で 100 倍に希釈し、100μl/well で 4 over night で反応させる。全検体は duplication にて行った。
- (4) 2 次抗体はマウス抗ヒト IgG 抗体 (HP 修飾) を用い、TMB で 1 時間発色させ、0.16M の硫酸で反応を停止し、405nm 波長で吸光度を測定した。

#### (CAGE の遺伝子変異の検討)

MSI 陽性子宮体癌の患者では、抗 CAGE 抗体が特異的に検出される。CAGE の ORF 中には AAAAAA の繰り返し配列がある。この部位を含めて、CAGE 遺伝子の全配列について、シーケンスを行い、変異のホットスポットがないか検討した。

#### (新たな MSI 陽性子宮体癌抗原の同定)

新たな抗原を同定するため、SCID マウスに手術で採取した MSI 陽性子宮体癌組織を移植し、マウス血清中に増加してきたヒト型 IgG 抗体が認識する抗原の同定を以下の方法で試みた。

- (1) 3 種の体癌由来の細胞株 (SNG-II/Ishikawa/HEC-IB) から作成した cDNA ライブラリーを体癌組織移植 SCID マウス血清によってスクリーニングし、移植腫瘍内 B 細胞により産生されたヒト抗体が認識する抗原を同定した。
- (2) RT-PCR 法と Gene Chip を用いて各種癌細胞株における発現解析を行い、同定した抗原の中から癌特異的に高発現する遺伝子を選択した。
- (3) 選択した遺伝子の発現を子宮体癌細胞株で siRNA により抑制し、増殖能と運動能に与える影響を検討した。
- (4) 類内膜腺癌 46 症例 (G1:23 例, G3:23 例) での遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて評価し、無病再発期間および臨床病理学的因子との相関を調査した。

#### (新たな MSI 陽性子宮体癌の診断マーカーとなる抗体の検出)

治療後 5 年以上が経過し、完治したと考えられる MSI 陽性子宮体癌患者の血清と、同一患者の治療前に採取・保存しておいた血清を用いて、それぞれが認識する抗原を同定し、治

療後に消失する抗体の同定を試みた。

- (1) 治療前の血清を 5 症例選択して混合し、SEREX 法にて精巢由来ファージライブラリーをスクリーニングし、認識抗原を同定した
- (2) 次にこの抗原が治療 5 年後に、患者血清中から消失するか検討し、消失しているものを診断マーカーの候補として選択した。

#### 4. 研究成果

##### (子宮体癌の遺伝子解析による MSI の検索)

MSI を検討した症例は計 85 例となった。これらのうち、MSI 陽性症例は 26 例となった。

##### (既存の MSI 関連変異タンパクに対する抗体の検出)

MSI 陽性腫瘍で生じる ICF R PTEN, BAX, MSH3 の変異部分のペプチドを合成し、変異ペプチドと患者血清を用いた ELISA 法によって、85 例の患者血清中の特異抗体の検出をそれぞれのペプチドで行った。しかしながら、いずれも特異抗体を検出することはできなかった。

##### (CAGE の遺伝子変異の検討)

15 例の MSI-H 症例で CAGE 遺伝子の全配列について、シーケンスを行い、変異のホットスポットがないか検討したが、アミノ酸配列の変化を伴う変異は 1 例も認めなかった。

##### (新たな MSI 陽性子宮体癌抗原の同定)

(1) 50 万クローンの子宮体癌細胞株由来ファージライブラリーをスクリーニングし、15 種の抗原を同定した。

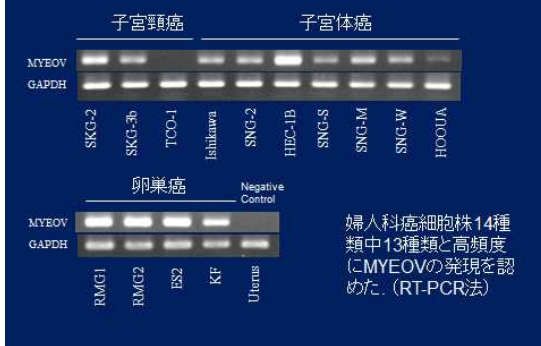
表1 SEREX法で同定された抗原

UniGene No.	Gene name	Number of Clones
Hs. 144011	Cytohesin2	6
Hs. 515094	TRIP10	2
Hs. 21912	FBXO21	2
Hs. 150107	BIRC6	2
Hs. 249718	EIF4E	1
Hs. 655288	MSL3L1	1
Hs. 3069	MSPA9B	1
Hs. 44402	CSTF3	1
Hs. 643780	SMARCE1	1
Hs. 250655	PTMA	1
Hs. 444024	SNX19	1
Hs. 51039	KIAA16989	1
Hs. 643864	SPON1	1
Hs. 62578	ARFGEF2	1
Hs. 523848	MYEOV	1

50万クローンの本ファージをスクリーニングし、15種の抗原を同定した。

(2) このうち MYEOV は RT-PCR 法で 14 種類中 13 の婦人科癌細胞株に発現し、Gene Chip 解析では多くの癌細胞株で発現が高く、正常組織で低かった。

図2:MYEOVの婦人科癌細胞株での発現



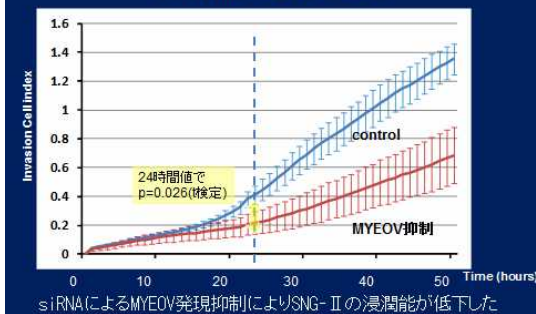
婦人科癌細胞株14種類中13種類と高頻度にMYEOVの発現を認めた。(RT-PCR法)

(3) siRNAによるMYEOVの発現抑制では有意な運動能の低下を認めたが増殖能に変化はなかった。

図3:MYEOVが子宮体癌細胞株の運動能に与える影響

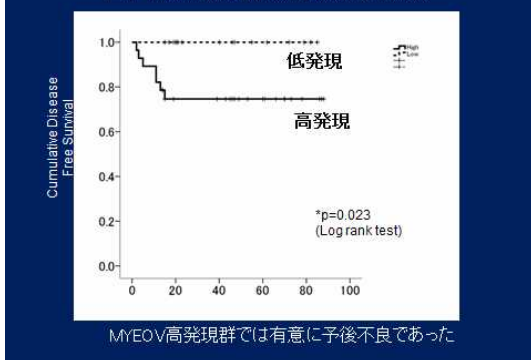


図3:MYEOVが子宮体癌細胞株の浸潤能に与える影響



(3) MYEOV 高発現群では無病再発期間が有意に短かった。

図4: MYEOVの発現と無病再発期間との相関



(新たな MSI 陽性子宮体癌の診断マーカーとなる抗体の検出)

治療前の血清を5症例選択して混合し、SEREX法にて認識抗原を同定したところ、HDLBP、ACBD5、C10orf28、KIF20B、PAPBC1の5種の抗原が同定された。

表2 治療前血清中の抗体が認識する抗原

遺伝子名	クローン数
HDLBP	12
ACBD5	3
C10orf28	1
KIF20B	1
PAPBC1	1

この抗原が治療5年後に、患者血清中から消失するかを検討したところ、いずれも同一患者で検出され、子宮体癌のバイオマーカーとの結果は得られなかった。

#### 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0件)

[学会発表](計1件)

平尾薫丸、岩田卓ほか

SEREX法により同定された癌抗原MYEOV(myeloma overexpressed gene)の発現は子宮体癌において予後と相関する。第64回日本産科婦人科学会総会、平成23年8月24日 大阪(発表予定、抄録掲載済)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩田 卓 (IWATA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30296652

##### (2) 研究分担者

藤田 知信 (FUJITA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20199334

##### (4) 連携研究者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 50161287