

平成23年5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791997

研究課題名 (和文) 頭頸部癌SEREX抗原の同定と、理想的ながん抗原の選択

研究課題名 (英文) Identification of tumor antigens in squamous cell carcinoma of head and neck by SEREX to determine immunogenically ideal targets for patients.

研究代表者

銅前 昇平 (DOUMAE SHOUHEI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70397892

研究成果の概要 (和文) : CCDC62-2 は CT 抗原性を有しており、各種がん患者での液性免疫応答が認められているが、新たに頭頸部癌患者でもこのことが確認され、頭頸部癌に対する腫瘍マーカーとなりうる可能性が示唆された。また CCDC62-2 特異的モノクローナル抗体を作製、免疫組織化学染色を行い、頭頸部癌で CCDC62-2 タンパクが核あるいは細胞質に不均一に発現していることを明らかにした。さらに SEREX 同定抗原である GKAP1 についても頭頸部癌を含む各種がん患者で液性免疫応答を認めており、GKAP1 は腫瘍マーカーの候補である。

研究成果の概要 (英文) : SEREX-defined CCDC62-2 is a CT antigen that is immunogenic in a variety of cancer patients. We showed that CCDC62-2 is immunogenic in squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN) patients and its potential target for diagnostic reagent for SCCHN. To analyze CCDC62-2 protein expression in SCCHN, we produced a CCDC62-2 mAb. Immunohistochemical staining using a CCDC62-2 mAb showed that positive staining was observed heterogeneously in nuclei or cytoplasm of tumor cells. Humoral immune response of another SEREX-defined antigen, GKAP1, to a variety of cancer patients including SCCHN was examined. SCCHN patients produced antibody to GKAP1 protein, showing an additional candidate of the tumor marker for SCCHN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			0
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：CT 抗原、SEREX、頭頸部癌、CCDC62-2、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法には、特異的で、免疫原性が

強いがん抗原が必要である。特異性については種々のがんが発現するが正常組織では精巣にしか発現しない CT 抗原が標的分子として適していると考えられる。約 50 種類の CT 抗原が同定、報告されており、MAGE、SSX、SYCP-1、NY-ESO-1 などが代表的な CT 抗原である。SSX、SYCP-1、および NY-ESO-1 は SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法により初めて同定されたものである。NY-ESO-1 は食道の扁平上皮癌から同定された SEREX 抗原であるが、頭頸部癌では 2002 年に Monji らが 19 の SEREX 抗原、また 2004 年に Vaughan らが 37 の SEREX 抗原を報告しているのみである。さらに CT 抗原のうちで頭頸部癌に発現を有するものは少なく、また頭頸部癌の診断、治療に有用な CT 抗原の報告もほとんどない。またわれわれは本研究の予備的実験にて、新規 CT 抗原 CCDC62-2 (coiled-coil domain containing 62 variant2) を独自に同定している。

2. 研究の目的

頭頸部癌の SEREX スクリーニングを行う。同定遺伝子よりがん・精巣 (Cancer/Testis; CT) 抗原、腫瘍マーカーの候補を選択し、それらの免疫原性を解析する。われわれがすでに同定している新規 CT 抗原 CCDC62-2 を含めた SEREX 同定抗原の臨床応用に向けた基礎的データを得る。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析

NY-ESO-1、MAGE などの代表的な既知の CT 抗原、および新たに同定したがん抗原についてヒト正常組織および頭頸部癌組織での遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析する。

(2) モノクローナル抗体の作製とタンパク質の発現解析

CCDC62-2 モノクローナル抗体を作製する。全長 cDNA を筋肉内に電氣的にパルスし遺伝子導入することで免疫した BALB/c マウスに、組み換えタンパク質を腹腔内に一回注射しブーストする。単離した脾臓細胞を用い、常法によりモノクローナル抗体を作製する。CCDC62-2 モノクローナル抗体を用いて精巣を含む正常組織および頭頸部癌組織パラフィン包埋切片の免疫組織化学的検索を行い、タンパク質の発現解析を行う。また代表的な CT 抗原タンパク質の頭頸部癌での発現解析を行なう。CCDC62-2 については、タンパク質発現と頭頸部癌の腫瘍径、転移の有無、臨床病期などの臨床病理学的分類および予後との関連を統計的に解析する。

(3) 液性免疫応答解析

CCDC62-2 および新たに同定したがん抗原について組み換えタンパク質を作製する。ELISA 法によりがん患者血清中の抗体産生を詳しく解析する。組み換えタンパク質を固相化した 96 穴プレートに希釈抗体 (血清) を加えて反応させる。モノクローナル抗体は陽性コントロールとして用いる。

(4) SEREX スクリーニング

頭頸部癌患者血清を用いて正常精巣由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングする SEREX 解析を行い、新たながん抗原を同定する。正常精巣由来の cDNA ライブラリーを用いることにより、CT 抗原を効率よく同定することが可能である。

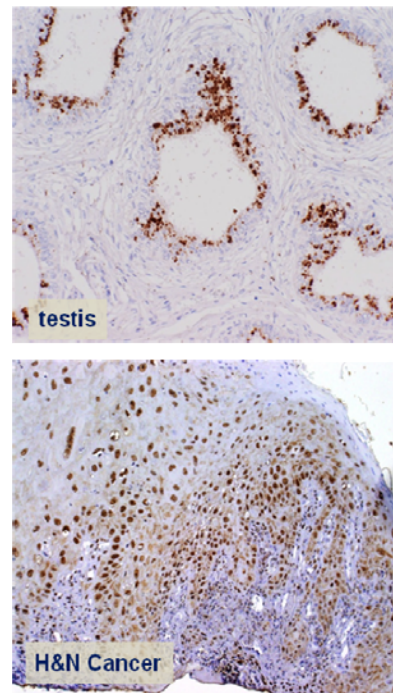
4. 研究成果

(1) 代表的な CT 抗原の遺伝子発現解析
まず代表的な CT 抗原遺伝子の頭頸部癌での発現解析を行なった。*MAGE-A4* が 12/38 (32%)、*MAGE-A3* が 8/34 (24%)、*MAGE-A1* が 5/39 (13%)、*CCDC62-2* が 4/34 (12%)、*SSX-2* が 2/19 (11%)、*XAGE-1b* が 2/30 (7%)、*NY-ESO-1* が 1/39 (3%) で発現が認められた。またわれわれは、*CCDC62-2* と同じ胃癌の SEREX スクリーニングで G kinase anchoring protein 1 (GKAP1) を同定している。遺伝子発現解析を行ったところ CT 抗原性を有しており、頭頸部癌では 5/28 例 (18%) に発現していた。個別の症例では *MAGE* ファミリー、*NY-ESO-1* など複数の CT 抗原が同時に発現している頭頸部癌がみられた。また 52.5% 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。

(2) *CCDC62-2* モノクローナル抗体の作製と
CCDC62-2 タンパクおよび代表的な CT 抗原タンパクの頭頸部癌での発現解析
CCDC62-2 は遺伝子レベルにおいて頭頸部癌を含む各種がんで発現がみられ CT 抗原性を有していたこと、さらに各種がん患者での液性免疫応答が証明されたことから、がん免疫療法の標的分子、腫瘍マーカーとして有望であることを報告してきた (Domae et al., Int J. Cancer, 2009)。*CCDC62-2* 特異的モノクローナル抗体 (C6212) を作製し、*CCDC62-2* タンパクの発現を免疫組織化学的に解析した。*CCDC62-2* 遺伝子を導入した HT1080 細胞では、*CCDC62-2* タンパクが細胞質に顆粒状に発現していることを明らかにした。正常精巣では精細間上皮の精母細胞に陽性反応がみられ、支持細胞、間細胞は染色されなかった。頭頸部癌組織 24/40 例 (60%) で *CCDC62-2* タンパクが核あるいは細

胞質に不均一に発現していることを明らかにした (右写真)。*CCDC62-2* のタンパク発現と臨床病理学的因子との相関は認められなかった。代表的な CT 抗原タンパク発現を免疫組織化学的に解析したところ *MAGE-A* (6C1) が 12/40 例 (30%)、*XAGE-1b* (USO9-13) が 6/40 例 (15%)、*NY-ESO-1* (E978) が 1/40 例 (2%) の頭頸部癌組織で発現が認められた。

CCDC62-2 protein expression by IHC



(3) 頭頸部癌患者および各種癌患者での液性免疫応答

CCDC62-2 組換えタンパクを用いた ELISA 法により頭頸部癌患者の液性免疫応答を解析した結果、3/18 例 (17%) が抗体陽性であった。ウェスタンブロット法にて、ELISA 陽性患者血清中の抗体は *CCDC62-2* タンパクに特異的であることを確認した。GKAP1 組換えタンパクを用いた ELISA 法により頭頸部癌患者の液性免疫応答を解析したところ、2/15 例 (13%) が抗体陽性であった。その他の癌種では悪性黒色腫で 3/20 例 (15%) で

GKAP1 に対する抗体産生が認められた。

(4) SEREX スクリーニング

頭頸部癌由来の新規がん抗原の同定を目的に、複数の CT 抗原遺伝子発現陽性であった頭頸部癌患者血清を用いて SEREX スクリーニングを行なっているが、現在までのところ陽性クローンの単離には至っていない。今後、CCDC62-2、GKAP1 抗体陽性の頭頸部癌患者血清を用いた SEREX スクリーニングなどで新規がん抗原を検索していく。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 銅前昇平、他、CCDC62-2 expression in head and neck cancer and antibody response in patients、第 29 回口腔腫瘍学会総会、平成 23 年 1 月 27 日、熊本
- ② 銅前昇平、他、新規 CT (がん・精巢) 抗原 CCDC62-2 の同定とその免疫原性、第 55 回日本口腔外科学会総会、平成 22 年 10 月 18 日、千葉幕張
- ③ 銅前昇平、他、SEREX 法によるがん・精巢 (CT) 抗原 CCDC62-2 の同定とがん患者の液性免疫応答、第 64 回口腔科学会総会、平成 22 年 6 月 25 日、札幌

[その他]

ホームページ等

<http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/metadata/16862>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

銅前 昇平 (DOUMAE SHOUHEI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70397892

(3) 連携研究者

小野 俊朗 (ONO TOSHRO)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：50185641

上中 明子 (UENAKA AKIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：50273967