

非小細胞肺癌における癌・精巢抗原 XAGE-1 の 発現と免疫応答の解析

中川和彦^{a,b,*}, 野口雄司^a, 奥村英雄^{a,b}, 佐藤修一郎^a, 田中志幸^a, 下野玄英^{a,c},
アリ・エルディブアリ・モハメド^a, 青江基^b, 小野俊朗^d, 上中明子^a, 大原信哉^e,
吉野正^e, 山下和城^f, 角田司^f, 清水信義^b, 中山睿一^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a免疫学, ^b腫瘍・胸部外科学, ^c血液・腫瘍・呼吸内科学, ^e病理・病態学,
^d岡山大学自然生命科学研究支援センター, ^f川崎医科大学附属病院 消化器外科学

キーワード: XAGE-1b, 癌精巢抗原, 非小細胞肺癌

はじめに

癌細胞は無限の自立性増殖をしめすものの、宿主自身の細胞から発生したものである。その為、癌細胞の構成成分のほとんどは由来する個体の正常細胞に存在し、癌細胞が表現すると予想される非自己成分はきわめて少ないと考えられる。その中から癌特異抗原の存在を証明し、癌に対する免疫応答を励起することは、癌免疫療法確立のための重要な課題である。ヒト癌組織の病理学的検索において、多数のリンパ系細胞の浸潤等により、癌免疫の存在は以前より予想されていた。近年、自己の癌に対する免疫反応も証明され、癌抗原も遺伝子レベルで同定されてきたが、癌免疫療法は確立されていないのが現状である。癌免疫療法の樹立を目的とし、宿主免疫系が認識する癌特異抗原の同定、および抗原に対する免疫応答の解析として、癌精巢抗

原 XAGE-1b の発現と免疫応答の解析を行った。

癌精巢抗原

癌精巢抗原はさまざまな癌組織や精巢の胚細胞に発現しているが、成人正常体細胞には発現していない^{1,2)}。今日まで44の癌精巢抗原が同定されている³⁾。NY-ESO-1 や SSX2 といった癌精巢抗原が癌組織に発現し、同時に体液性免疫、細胞性免疫の存在が確認されている^{4,5)}。癌精巢抗原は癌組織での発現頻度が高い一方、正常組織での発現は低く、免疫原性の高さから癌精巢抗原は癌ワクチンの有効なターゲットである。XAGE-1 は発現シークエンスタグデータベースを用いて同定された PAGE/GAGE 遺伝子ファミリーに属する遺伝子で⁶⁾、癌精巢抗原様の発現パターンを有している⁷⁾。これまでに、XAGE-1a, XAGE-1b, XAGE-1c, XAGE-1d の4種類の transcript variant が同定され、メラノーマ転移巣、ユーイング肉腫、乳癌、肺癌、前立腺癌などのさまざまな上皮性腫瘍に発現していると報告されている⁸⁻¹⁰⁾。以前我々は肺癌悪性胸水から樹立した肺腺癌細胞株由来の cDNA ライブラリーと自己血清を用いて行った SEREX 法により、

平成19年6月受理

*〒792-8543 愛媛県新居浜市王子町3-1

住友別子病院外科

電話：0897-37-3111 FAX：0897-37-7121

E-mail：kazuhiko_nakagawa@ni.sbh.gr.jp

プロフィール



中川 和彦

平成6年岡山大学医学部卒業、同4月に岡山大学第二外科（現腫瘍・胸部外科）に入局しました。香川県立中央病院外科、愛媛県立伊予三島病院外科にて研修し、平成10年12月第二外科帰局、平成11年11月より岡山大学医学部免疫学教室にて中山睿一先生の指導の下、腫瘍免疫に関する研究を行いました。腫瘍抗原の検索のため、腫瘍胸部外科教室はもとより、川崎医科大学消化器外科教室より、多くの組織検体を提供して頂きました。多くの先生方のご協力のお陰で何とか論文を完成させることができました。平成16年9月より四国がんセンター外科、平成19年4月より住友別子病院外科に勤務しております。癌免疫療法が臨床の場で活躍できることを祈りながら、日々癌治療に携わっています。

高免疫原性を有する XAGE-1b を同定した¹¹⁾。さらに肺癌患者32例中8例に抗体反応を確認し、XAGE-1の免疫原性を確認した。今回非小細胞肺癌組織における4つのXAGE-1バリエントのmRNA発現及び蛋白発現、肺癌患者におけるXAGE-1bに対する液性免疫応答を検討した。

mRNA 発現

49の非小細胞肺癌組織における4つのXAGE-1のtranscript variantのmRNA発現をRT-PCRで検討した。結果はXAGE-1b及びXAGE-1d mRNAの発現を認めたが、XAGE-1a及びXAGE-1cの発現を認めなかった。XAGE-1b mRNAの発現を腺癌31例中14例、扁平上皮癌15例中1例に認めた。一方XAGE-1d mRNAの発現は腺癌31例中6例でXAGE-1b mRNAの発現に関連していた。あわせて行った49例の非癌部肺組織ではXAGE-1 mRNAの発現を認めなかった。精巢でも同様にXAGE-1b XAGE-1dの発現を認めたが、XAGE-1a XAGE-1cの発現を認めなかった。Real-time RT-PCRにてXAGE-1b及びXAGE-1d mRNAの発現を検討した。XAGE-1b mRNA発現が陽性であった15例のtotal RNA 60ng中の遺伝子コピー数は 3×10^3 copyから 7×10^5 copyの間であった。XAGE-1d mRNAのコピー数はRT-PCR陽性6例において 10^3 copyから 10^4 copyの間であった。非癌部肺組織での

XAGE-1b及びXAGE-1d発現コピー数はいずれも 10^3 copy以下であった。XAGE-1b mRNA発現に関して臨床病理学的検討を行ったところ腺癌で有意にXAGE-1b mRNAが発現しているが、年齢、性別、病期、病理組織学的分化度では有意差を認めなかった。

蛋白発現

XAGE-1bモノクローナル抗体(USO 9-13)を用いた免疫染色にてXAGE-1b蛋白発現を検討した。XAGE-1b mRNA陽性15例中14例、陰性34例中3例においてXAGE-1b蛋白発現が認められた。染色は腫瘍細胞の核、特に核小体に認められた。非癌部肺組織は染色されなかった。正常組織では精巢の精祖細胞、精母細胞の核のみ染色された。腺癌において有意に蛋白発現を認めた。

抗体産生

癌患者におけるXAGE-1bに対する抗体反応をXAGE-1b蛋白を用いたELISA法¹²⁾で検討した。74例の肺癌患者と40例の健常者の血清反応を調べた。肺腺癌56例中5例に抗体反応を認めたが他の組織型18例では抗体産生を認めなかった。健常者40例では抗体産生を認めなかった。ELISA陽性症例5例中抗体価が一番高かった血清は、pcDNA3.1/XAGE-1bにより293 T cellに発現させたXAGE-1bを認識した。

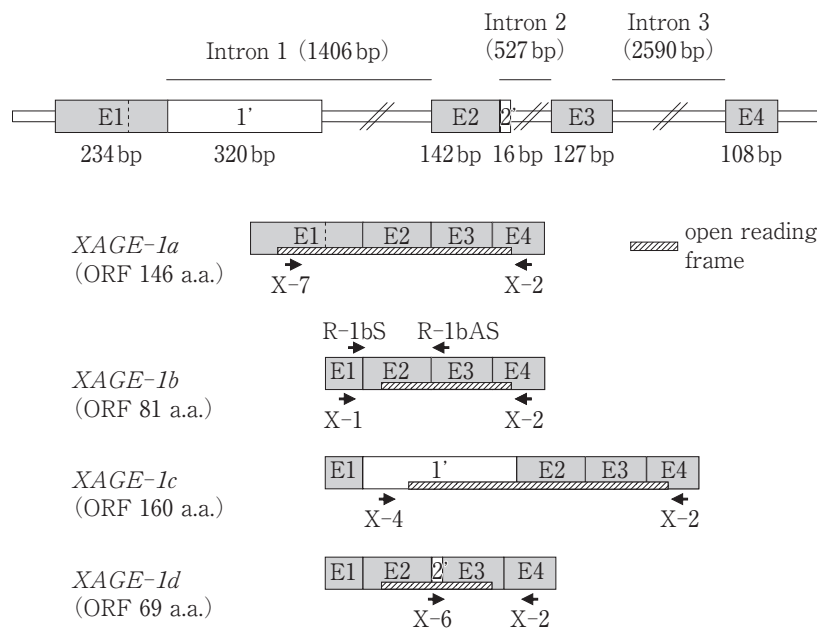


図1 XAGE-1遺伝子構造と転写物のシェーマ
Exons (gray box), Introns (open box), Open Reading Frame (hatched box), PCR primers (arrows)

考 察

XAGE-1は元来発現シーケンスタグデータベースを用いて同定された遺伝子で精巣及び Ewing sarcoma に発現している^{6,7)}。当研究では，肺腺癌において XAGE-1bmRNA は高率に強発現しているが，XAGE-1d mRNA の発現はそれより低く，XAGE-1a 及び XAGE-1c は発現していなかった。XAGE-1b が肺腺癌において優位に発現する variant であると確認した。メラノーマ転移巣で類似した発現パターンが報告されている。XAGE-1b の発現は非小細胞肺癌のうちで主に腺癌に認められた。一方肝臓癌においては19例中11例（58%）前立腺癌では54例中14例（24%）乳癌では20例中1例（5%）に認められた。MAGE SSX などの癌精巣抗原は，肺癌において高頻度に認められるが，液性免疫反応はほとんど確認されていない¹³⁾。われわれは肺腺癌56例中5例に抗体産生を認めたが，18例の他の組織型の肺癌患者，健常者血清では抗体産生を認めなかった。これらの事から，XAGE-1b は肺癌患者において免疫原性があると考えられた。XAGE-1b は肺癌に対するワクチン療法のターゲットとなり得る事が示唆された。

おわりに

今回の結果から，XAGE-1b 抗体陽性患者において XAGE-1b 特異的 CD8 T cell 反応が確認される可能性が示唆された。今後癌免疫治療の樹立の為に XAGE-1b からの CD8 T cell epitope の特定が望まれるところである。

文 献

- 1) Boon T, Old LJ : Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol* (1997) **9**, 681-683.
- 2) Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. : Cancer/testis antigens : an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* (2002) **188**, 22-32.
- 3) Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ : The cancer/testis genes : review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* (2004) **4**, 1.
- 4) Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, et al. : Simultaneous

- humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO1 : definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* (1998) **187**, 265-270.
- 5) Ayyoub M, Stevanovic S, Sahin U, et al. : Proteasome-assisted identification of a SSX-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma. *J Immunol* (2002) **168**, 1717-1722.
- 6) Brinkmann U, Vasmatazis G, Lee B, Pastan I : Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database. *Cancer Res* (1999) **59**, 1445-1448.
- 7) Liu XF, Helman LJ, Yeung C, Bera TK, Lee B, Pastan I : XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* (2000) **60**, 4752-4755.
- 8) Zendman AJ, Van Kraats AA, den Hollander AI, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN : Characterization of XAGE-1b, a short major transcript of cancer/testis-associated gene XAGE-1, induced in melanoma metastasis. *Int J Cancer* (2002) **97**, 195-204.
- 9) Zendman AJ, Van Kraats AA, Weidle UH, Ruiter DJ, Van Muijen GN : The XAGE family of cancer/testis-associated genes : alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* (2002) **99**, 361-369.
- 10) Egland KA, Kumar V, Duray P, Pastan I : Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers. *Mol Cancer Ther* (2002) **1**, 441-450.
- 11) Ali Eldib AM, Ono T, Shimono M, et al. : Immunoscreening of a cDNA library from a lung cancer cell line using autologous patient serum : identification of XAGE-1b as a dominant antigen and its immunogenicity in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* (2004) **108**, 558-563.
- 12) Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, et al. : NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma : correlation with tumor grade. *Cancer Res* (2001) **61**, 4671-4674.
- 13) Stockert E, Jager E, Chen YT, et al. : A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* (1998) **187**, 1349-1354.