

論文要旨等報告書

氏名	銅前 昇平
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 乙 第 4 2 9 0 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Identification of CCDC62-2 as a novel cancer-testis antigen and its immunogenicity (新規がん・精巣抗原CCDC62-2の同定とその免疫原性)
論文審査委員	教授 滝川 正春 准教授 苔口 進 教授 佐々木 朗

学位論文内容の要旨

【目的】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がん・精巣 (Cancer/ Testis; CT) 抗原が標的分子として適していると考えられる。精巣には HLA (human leukocyte antigen) の発現がなく、T 細胞による細胞傷害から逃れている。そのため CT 抗原特異的な CTL (cytotoxic T lymphocytes) は、精巣を含む正常組織を攻撃することなくがん細胞のみを選択的に攻撃すると考えられる。現在までに約 50 種類の CT 抗原が同定、報告されている。MAGE、SSX、SYCP-1、NY-ESO-1 などが代表的な CT 抗原であり、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 は強い免疫原性を有し、現在最も理想的な CT 抗原と考えられている。岡山大学を含む世界中の関連施設において、NY-ESO-1 抗原を標的としたがんワクチン療法の研究および臨床試験が系統立てて行なわれている。SEREX 法は患者血清中 IgG 抗体を用いてがん抗原を同定する方法として確立され、抗体産生だけではなく、CTL を誘導するような免疫原性の高いがん抗原も検出可能である。本研究では、SEREX 法を用いて胃癌抗原を解析し、CT 抗原性を有する coiled-coil domain containing 62 variant 2 (CCDC62-2) を同定した。さらに癌患者に対する免疫原性を解析することにより、CCDC62-2 のがん免疫療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

【材料と方法】SEREX 解析には原発巣、肝転移巣共に一定期間ではあるが自然縮小を示した胃癌患者血清を用いた。この患者血清は正常精巣ライセートに対して、NY-ESO-1 抗体陽性癌患者血清と同レベルの反応を示した。この胃癌患者血清を用いて、正常精巣由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。2 種類のスプライスバリエントを有する同定抗原 CCDC62 (CCDC62-1, CCDC62-2) 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ー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 CCDC62-2 に対する液性免疫応答は組換えタンパクを作成し、ELISA 法及びウェスタンブロット法により解析した。

【結果と考察】約10万クローンのSEREXスクリーニングの結果、55個の陽性クローンを単離、ホモロジー検索にて23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、4種類 (*EID3*、*GKAP1*、*SYCP-1*、*CCDC62*) が精巣特異的遺伝子であり、既知のCT抗原、*SYCP-1*が含まれていた。定性的RT-PCR法 (35サイクル) にて、*EID3*遺伝子は調べた正常組織すべてに弱い発現を認め、*GKAP1*は精巣で強い発現を認めたがいくつかの正常組織でも弱い発現を認めた。一方、2種類の*CCDC62*の発現は正常組織では精巣に限局していることが確認された。*CCDC62* (-1、-2共通) 特異的タックマンプロー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も、*CCDC62*の発現は精巣に限局しており、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。次に、*CCDC62*についてRT-PCR法による癌組織での発現解析を行ったところ、2種類の*CCDC62*のうち*CCDC62-1*は癌組織には発現が見られなかった。*CCDC62-2*は胃癌の他、種々のがんに発現しており、肺癌に19例中5例 (26%) と比較的高頻度で発現していたほか、乳癌に4例中1例 (25%)、大腸癌に40例中5例 (12%)、食道癌に10例中2例 (20%)、胃癌に117例中8例 (7%)、頭頸部癌に34例中4例 (12%)、前立腺癌に9例中2例 (22%)、腎癌に4例中1例 (25%) で発現していた。リアルタイムRT-PCRによる癌組織における*CCDC62*の定量解析において、肺癌、胃癌、前立腺癌などの癌組織では正常精巣に比し1%以上の発現を認めた。特に、胃癌15例中1例、前立腺癌8例中1例では10%以上の発現を認めた。一方、対応するそれぞれの正常組織での発現は、正常精巣に比しいずれも0.1%以下であった。さらに、各種がん患者について組換え*CCDC62-2*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191人の癌患者のうち13人に抗体が認められた。41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。さらに胃癌及び肺癌患者血清についてウェスタンブロット法により検討したところ、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が確認された。*CCDC62-2*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*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免疫療法の標的となると考えられた。

論文審査結果の要旨

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がん・精巣 (Cancer/ Testis; CT) 抗原が標的分子として適していると考えられる。SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法は患者血清中 IgG 抗体を用いてがん抗原を同定する方法として確立され、抗体産生だけではなく、CTL (cytotoxic T lymphocytes) を誘導するような免疫原性の高いがん抗原も検出可能である。本研究では、SEREX 解析に原発巣、肝転移巣共に一定期間ではあるが自然縮小を示した胃癌患者血清を用いた。この胃癌患者血清を用いて、正常精巣由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。2 種類のスプライスバリエントを有する SEREX 同定抗原 CCDC62 (CCDC62-1, CCDC62-2) 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ー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 CCDC62-2 に対する液性免疫応答は組換えタンパクを作成し、ELISA 法及びウェスタンブロット法により解析した。その結果、以下の結論を得た。

- 1、SEREX 法を用いて胃癌抗原を解析し、CCDC62-2 を同定した。
- 2、正常組織、癌組織における定性的および定量的な遺伝子発現解析の結果、CCDC62-2 は CT 抗原性を有していた。
- 3、癌患者の CCDC62-2 に対する液性免疫応答が認められ、特異的 CD4 陽性 T 細胞の誘導が示唆された。

これらの知見は CCDC62-2 が広範囲ながんに対して、がん免疫療法の標的分子となる可能性を明らかにしたものである。よって本申請論文は博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認めた。