

博士（医 学） 石 倉 久 光

学 位 論 文 題 名

Identification of CLUAP1 as a human
osteosarcoma tumor-associated antigen recognized by
the humoral immune system

（液性免疫認識ヒト骨肉腫関連抗原 CLUAP1の同定）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【はじめに】 骨肉腫は原発性骨腫瘍として最も頻度が高い腫瘍であり主として学童期から青年期にかけて発症する。近年の化学療法や手術の進歩はその治療成績を大きく改善したが、再発症例や転移症例ではいまだ予後不良である。したがって、更に有効で副作用の少ない免疫療法を含めた新規治療の開発が求められている。近年、さまざまな固形癌の腫瘍関連抗原が同定されてきているが、ヒト骨肉腫腫瘍抗原については報告が乏しく、診断や治療に結びつく新しい標的抗原の検索が必要である。そこで、我々は、serological analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX) 法を用いて液性免疫によって認識されるヒト骨肉腫腫瘍関連抗原を検索し、14個の抗原を同定した。さらに同定された抗原の中で正常組織での発現が限定的であった clusterin associated protein 1 (CLUAP1) について着目し、骨肉腫や他の悪性腫瘍における遺伝子発現を解析し、腫瘍マーカーや癌免疫治療の標的分子となる可能性を検討した。

【方法】 ヒト骨肉腫細胞株 MG 6 3 から cDNA library を作製し、この cDNA library 由来産物の分子の中で骨肉腫患者血清中抗体が反応する抗原の検索を SEREX 法により 2 名の患者血清について行った。スクリーニングで得られた陽性クローニングについて cDNA の塩基配列を決定し、database で確認した。また、それぞれの抗原について定量 RT-PCR を行い正常組織での mRNA 発現を比較した。同定抗原の一つ CLUAP1 は正常組織での発現がわずかであったことから、ヒト骨肉腫細胞株、骨肉腫組織、他のヒト癌組織（卵巣癌、大腸癌、非小細胞肺癌、食道癌、胆道癌）での遺伝子発現について、定量 RT-PCR 法で詳細に調査し、比較検討を行った。

【結果】 骨肉腫患者血清中の IgG 抗体により認識される 14 の抗原を同定した。その一つ CLUAP1 は正常組織では精巣、脳、心臓に僅かに発現されるのみで、定量的 RT-PCR による mRNA の解析では正常組織中最大の発現を示す精巣における発現量はライブラリー作製の元になつた骨肉腫細胞株 MG 6 3 における発現量は 80 分の 1 以下であることが分かった。正常精巣組織発現量の二倍以上の発現を CLUAP1 陽性とすると、ヒト骨肉腫細胞株 6 株ではすべて陽性であり、ヒト骨肉腫組織では、14 例中 9 例 (64%) で陽性であった。卵巣癌、大腸癌、非小細胞肺癌組織では、それぞれ、10 例中 7 例 (70%)、21 例中 9 例 (43%)、42 例中 3 例 (7.1%) が陽性であった。食道癌 15 例、胆道癌 16 例では陽性例はなかった。

【考察】 近年、さまざまな腫瘍関連抗原を標的とした癌の免疫療法の臨床試験が行われ、免疫を惹起し腫瘍縮小を誘導することも報告されている。しかし、骨肉腫についての抗原の報告は現在のところ非常に限られている。これは骨肉腫細胞株とこれに反応する CTL の両方の樹立が困難なこと、免疫治療の標的に適切な遺伝子の報告がないことなどの理由による。特に抗腫瘍免疫における重要性が近年指摘されている CD4⁺T 細胞が認識するヒト骨肉腫抗原の報告は現在までない。そこで、獲得性免疫を惹起できる新たな標的となり得る抗原の検索と、様々な癌腫における発現を検討した。

癌細胞由来 λ ファージ cDNA ライブラリーから大腸菌に発現させた蛋白を患者血清 IgG 抗体でスクリーニングする cDNA 発現クローニング法(SEREX 法)は癌患者の液性免疫を惹起するさまざまな蛋白を同定できる方法である。今回の SEREX 法で同定される抗原は IgG 抗体が認識するものであり、IgG 抗体産生には CD4⁺T 細胞の関与が必要であることより、今回の同定抗原には抗体のみでなく患者 CD4⁺T 細胞が応答したことが示唆される。実際これまでに、MAGE-1、tyrosinase など細胞障害型 T 細胞を使った方法により同定された抗原エピトープが、SEREX 法にも同定されることが報告されており、SEREX 法で同定された抗原は液性免疫と同じく細胞性免疫も惹起できると考えられる。

今回、同定された抗原 CLUAP1 は核に存在し Clusterin と反応、細胞増殖やアポトーシスに関与していると考えられている。我々は骨肉腫細胞株と骨肉腫組織で正常組織より CLUAP1 が過剰発現していることを明らかにした。また過去の cDNA マイクロアレイを用いた解析により報告された大腸癌での過剰発現に加え、卵巣癌、肺癌でも CLUAP1 過剰発現を新たに明らかにした。このことにより CLUAP1 が多くの癌種の発癌に何らかの重要な役割を持つことが示唆された。

CLUAP1 は一部の正常細胞でも僅かな発現が認められたが、CLUAP1 と同じく正常組織に発現しながらも、悪性腫瘍で過剰発現している HER2/neu を標的とした抗体療法の成功が報告されており、同様に CLUAP1 についても骨肉腫患者の免疫治療における標的になる可能性があると考えられる。

今回 SEREX 法で同定された抗原の中で、CLUAP1 の他に nucleolar protein 8(NOL8)、heat shock 70(HSP70)、huntingtin interacting protein 1(HSP1) はこれまでに腫瘍関連蛋白と報告されており、これらに対する免疫応答も癌患者における抗腫瘍性免疫と関連があることも考えられた。

【結論】 我々は、SEREX 法を使って骨肉腫腫瘍関連抗原を検索し、腫瘍マーカー及び、骨肉腫免疫治療の標的の一つとなる可能性のある分子 CLUAP1 を同定した。この検索システムより CLUAP1 は獲得性免疫の活性化にとって重要な CD4⁺T 細胞に認識されると考えられるので、今後 CD8⁺T 細胞認識抗原と複合的に使用する免疫治療が更に有効になると予想される。本研究における一連の結果より、腫瘍関連抗原である CLUAP1 は、ヒト骨肉腫において免疫システムを介した診断、治療における、新しい標的分子として有用であることが示された。

学位論文審査の要旨

主査教授 笠原正典

副査教授 西村孝司

副査教授 三浪明男

学位論文題名

Identification of CLUAP1 as a human osteosarcoma tumor-associated antigen recognized by the humoral immune system

(液性免疫認識ヒト骨肉腫関連抗原 CLUAP1の同定)

学位論文はヒト骨肉腫関連抗原を検索する実験に関するものである。骨肉腫は原発性骨腫瘍として最も頻度が高い腫瘍であり主として学童期に発症する。近年の化学療法や手術の進歩は治療成績を大きく改善したが、再発症例や転移症例ではいまだ予後不良である。したがって、更に有効で副作用の少ない免疫療法を含めた新規治療の開発が求められている。論文では serological analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX) 法を用いて液性免疫によって認識されるヒト骨肉腫腫瘍関連抗原を検索し 14 の抗原を同定した。さらに同定された抗原の中で正常組織での発現が限定的であった遺伝子 clusterin associated protein 1(CLUAP1)に着目し、骨肉腫や他の悪性腫瘍における遺伝子発現を解析し、腫瘍マーカーや癌免疫治療の標的分子となる可能性を検討した。CLUAP1 は定量的 RT-PCR による mRNA の解析では正常組織中最大の発現を示す精巣における発現量はライブラリー作製の元になった骨肉腫細胞株における発現量の 80 分の 1 以下であることが分かった。正常精巣組織発現量の二倍以上の発現を CLUAP1 陽性とすると、ヒト骨肉腫細胞株 6 株はすべて陽性であり、ヒト骨肉腫組織では、14 例中 9 例 (64%) で陽性であった。卵巣癌、大腸癌、非小細胞肺癌組織では、それぞれ、10 例中 7 例 (70%)、21 例中 9 例 (43%)、42 例中 3 例 (7.1%) が陽性であった。CLUAP1 が骨肉腫、卵巣癌、大腸癌、非小細胞肺癌で過剰発現していることが示された。SEREX 法で同定される抗原は IgG 抗体が認識するものであり、IgG 抗体産生には CD4⁺T 細胞の関与が必要であることより、今回の同定抗原には抗体のみでなく患者 CD4⁺T 細胞が応答したことが示唆される。また、細胞障害型 T 細胞を使った方法により同定された抗原エピトープ

が、SEREX 法にも同定されることが報告されており、SEREX 法で同定された抗原は液性免疫と同じく細胞性免疫も惹起できると考えられる。本研究における一連の結果より、腫瘍関連抗原である CLUAP1 は、ヒト骨肉腫において免疫システムを介した診断、治療における、新しい標的分子として有用であることが示された。

学位論文公開発表では、副査の三浪明男教授より、リンパ球誘導の確認の必要性、今後の応用方法、骨肉腫で抗原性が低い理由について質問があった。これらに対して申請者はリンパ球の誘導確認実験の予定、今後の応用については、CLUAP1 に対する抗体、リンパ球の誘導を行い、治療に応用していくこと、ELISA などで診断に応用していくと回答した。また骨肉腫の抗原性について現在詳細は不明と回答した。次いで副査の西村孝司教授から、CLUAP1 の蛋白生成状況の質問があり、現在、大腸菌に発現していることが確認され精製中であると回答した。最後に主査の笠原正典教授より CLUAP1 の局在、機能及び SEREX 法の特徴につき質問があった。申請者は局在は過去の報告では免疫染色により核内にあることが確認されており、機能については clusterin と相互作用する以上は不明であるが clusterin は細胞増殖やアポトーシスに関与しているので、CLUAP1 も同様なことが考えられる、SEREX の特徴については、腫瘍細胞株、それに対する CTL を樹立する必要がなく簡便であるが手技がやや煩雑であると回答した。

この論文は、ヒト骨肉腫関連抗原を SEREX 法で検索した実験であり、同定された 14 の抗原の一つ CLUAP1 は骨肉腫、卵巣癌、大腸癌、非小細胞肺癌で過剰発現していることが示された。今後、骨肉腫をはじめとする悪性腫瘍の診断、治療への臨床応用につながる重要な研究である点で高く評価され、今後、抗原蛋白の機能解析、動物実験における腫瘍縮小などさらなる研究成果が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。