

学位論文題名

マウス癌精巣抗原Ssxaの配列同定および生物学的特徴に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】マウスにおける癌ワクチン研究では、Ovalbumin(以下 OVA)等の免疫原性外来抗原を仮想癌抗原として強制発現させた腫瘍細胞を用いた癌ワクチンモデルが知られている。この実験系においては、マウスに OVA ワクチンを投与することによって OVA 特異的細胞障害性 T リンパ球が誘導され、OVA 過剰発現癌細胞に対する腫瘍増大抑制効果が示されている。一方で癌細胞は元来宿主の細胞から発生するため、宿主由来の蛋白を癌抗原とした免疫誘導が惹起されることが、本来の腫瘍免疫と同等の現象を反映する系である。OVA 等の外来抗原を仮想癌抗原とするマウスの腫瘍モデルは、腫瘍免疫のメカニズムを解明するという役割においては有用であるが、宿主に存在しない異種の蛋白、すなわち異物を癌細胞に強制発現させているため、宿主から発生した癌よりも免疫反応が誘導されやすい可能性がある。以上より、ヒトの生体内で起こっている腫瘍免疫反応をより正確に再現する実験系として、宿主由来の自己抗原に対する癌ワクチンの動物モデルが必要であると考へた。腫瘍免疫を誘導する癌抗原として代表的なものに癌精巣抗原がある。癌精巣抗原は精巣または卵巣といった生殖組織と癌組織のみで発現し、他の正常組織では発現していない蛋白であるため、癌ワクチンの標的抗原として有望視されている。ヒトでは NY-ESO-1 や MAGE-A4 をはじめとして 40 種類以上癌精巣抗原が同定されているが、現在マウスでは Ssxa、Tsga10、Mage-b、OY-MS-4 などの数種類しか同定されていない。以上を踏まえた上で、マウス癌精巣抗原について解析を進めていたところ、その 1 つである Ssxa の発現解析結果が従来の報告と異なることが明らかとなった。そこで 3'-rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE) 法を用いて Ssxa 遺伝子配列の再同定を行ってこれが従来報告されていた配列と異なることを明らかにした後に、新たに同定された配列の mRNA がマウス腫瘍細胞およびマウス精巣において特異的に発現していることを明らかにした。続いて、大腸菌の系を用いて産生させたりコンビナント Ssxa 蛋白を精製し、これを認識するポリクローナル抗体の作製を行った。最後に上記抗体を用いて Ssxa 蛋白の生物学的特徴について解析を行った。

【材料と方法】(1)Ssxa 塩基配列同定: BALB/c マウスの正常精巣から抽出した mRNA を材料に 3'-RACE 法を施行し、Ssxa cDNA を合成、DNA シーケンス解析にて Ssxa 遺伝子塩基配列の確認を行った。(2)リコンビナント Ssxa 蛋白精製: GST 法にて大腸菌で産生された Ssxa 蛋白を精製した。(3)抗 Ssxa ウサギポリクローナル抗体作製: Ssxa 蛋白の中で Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity 法にて抗原性が一番高いと予測された C1 ペプチド VTKSVLSDSDEVSS と今回同定された ExonX に相当する C2 ペプチド DKRKNPVV でウサギに免疫 (200 μ g/週 \times 6 回) し、ポリクローナル抗体を作製した。(4)Ssxa 発現ベクターの構築: 先に増幅させた Ssxa cDNA をプラスミドベクターである pcDNA3.1(+)_IRES_GFP (pGFP) に導入した。このベクターは導入した遺伝子と同時に

GFP 遺伝子も発現するベクターである。作製したベクター pcDNA3.1(+)_Ssxa_IRES_GFP (pSsxa) をコンピテント細胞 JM109 へ熱ショック法を用いて遺伝子導入して形質転換を行い、適切なプラスミドベクターが導入された JM109 株を採取してアンピシリン添加 LB 培地で培養した後 pSsxa を精製、DNA シーケンス解析で塩基配列を確認した。同様の方法で Ssxa と GFP の融合蛋白である Ssxa-GFP と GFP-Ssxa を導入したプラスミドベクター pcDNA3.1(+)_Ssxa-GFP (pSsxa-GFP)、pcDNA3.1(+)_GFP-Ssxa (pGFP-Ssxa) も作製した。精製したプラスミドベクターを HEK293FT 細胞に遺伝子導入し、引き続いてウェスタンブロットおよび免疫組織染色を施行して Ssxa の生物学的特徴を解析した。

【結果】(1) Ssxa には従来報告されていた Exon5 の配列は存在せず、その 662 塩基下流に位置する新たな配列が Exon (ExonX) であることが判明した。Exon 5 では終止コドンが未同定であったのに対し、ExonX を含む Ssxa の cDNA 塩基配列では終止コドンを有しており、Ssxa 蛋白は 101 アミノ酸から成ることが示された。The general proprotein convertase cleavage site predictor により Ssxa 蛋白は Lys78 と Ser79 の間で分解されることが予想された。Exon2 と ExonX との間で RT-PCR を施行したところ、精巣における Ssxa mRNA 発現を確認した。また BALB/c 8 週齢の脳・心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓・骨格筋においては Ssxa の発現は認めなかった。マウス癌細胞株である CT26, B16, EL4, LLC では Ssxa mRNA の発現を認め、線維芽細胞株である NIH/3T3 では Ssxa mRNA の発現を認めなかった。(2) GST 法によるリコンビナント Ssxa 蛋白精製後、SDS-PAGE および 銀染色を行うことによって、Ssxa 蛋白の分子量は 12kDa であることが判明した。(3) ポリクローナル抗体として mSSXA-C1 と mSSXA-C2 と 2 種類を作製したが、ウェスタンブロットの結果からリコンビナント Ssxa 蛋白を良好に認識するのは mSSXA-C2 であることが判明した。mSSXA-C2 を一次抗体として使用した免疫組織染色では、陰性対照と比較して明らかに濃染された組織は精巣のみであり、他の正常組織では陰性対照と同様の染色態度であった。(4) 分子量の小さな Ssxa 蛋白を解析すること、および Ssxa 蛋白の細胞内における局在を調べることを目的として、Ssxa と GFP の融合蛋白を作製した。蛍光顕微鏡にて pSsxa-GFP 導入細胞では GFP が細胞質に局在していたのに対し、pGFP-Ssxa 導入細胞では GFP は細胞質よりも細胞核に局在することが確認された。同様に抗 GFP 抗体を一次抗体として使用した免疫染色で pSsxa-GFP 導入細胞は細胞質のみが染色されていたのに対し、pGFP-Ssxa 導入細胞は細胞質だけでなく細胞核も染色されていた。以上より、Ssxa は生体内で分解され、N 末端側分解産物は核に移行していることが示された。

【考察】(i) 今回同定した配列の特徴は終止コドンを有するという点である。以前の報告と異なるが、今回同定した配列は確実に存在し、癌精巣抗原として矛盾しない発現パターンであった。(ii) マウス Ssxa のホモログであるヒト SSX は核に存在し、転写抑制因子として働いていると報告されている。Ssxa の N 末端側分解産物には核移行シグナルである KRAB ドメインが含まれており、Ssxa も分解されることで核移行し、転写に関与している可能性がある。

【結論】 Ssxa の塩基配列を再確認し、完全なる蛋白コード配列を決定した。また、マウス正常精巣と癌細胞株 4 種でその mRNA 発現を確認した。分子量 12kDa の Ssxa は細胞内で分解され、N 末端側分解産物は核移行することを示した。今後 Ssxa を用いた同種同系癌精巣抗原ペプチドワクチンモデルを構築することで最適な免疫プロトコルを模索し、その結果に基づいた強力な補助療法が臨床開発されることを期待する。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	濱田淳一
副査	教授	田中伸哉
副査	准教授	丸尾聖爾
副査	教授	佐邊壽孝
副査	教授	平野聡

学位論文題名

マウス癌精巣抗原Ssxaの配列同定および生物学的特徴に関する研究

腫瘍免疫を誘導する癌抗原として代表的なものに癌精巣抗原がある。癌精巣抗原は精巣または卵巣といった生殖組織と癌組織のみで発現し、他の正常組織では発現していない蛋白であるため、癌ワクチンの標的抗原として有望視されている。マウス癌精巣抗原について解析を進めていたところ、その1つであるSsxaの発現解析結果が従来の報告と異なることが明らかとなった。そこで3'-rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE)法を用いてSsxa遺伝子配列の再同定を行ったところ従来報告されていたExon 5の配列は存在せず、その662塩基下流に位置する配列が正しいExon (Exon X)であることが判明した。従来報告のExon 5では終止コドンが未同定であったのに対し、Exon Xを含むSsxaのcDNA塩基配列では終止コドンを有しており、Ssxa蛋白は101アミノ酸から成ることが明らかとなった。The general proprotein convertase cleavage site predictorによりSsxa蛋白は78番目のリジンと79番目のセリンの間で切断されることが予想された。Exon 2とExon Xとの間でRT-PCRを施行したところ、精巣におけるSsxa mRNA発現を確認した。また8週齢のBALB/cマウスの脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓および骨格筋においてはSsxaの発現は認められなかった。マウス癌細胞株であるCT26、B16、EL4、LLCではSsxa mRNAの発現が認められ、線維芽細胞株であるNIH/3T3ではSsxa mRNAの発現は認められなかった。以上より今回同定した塩基配列は再現性をもって確認され、また癌精巣抗原として矛盾しない発現様式であることが示された。GST法によるリコンビナントSsxa蛋白精製後、SDS-PAGEおよび銀染色を行うことによって、Ssxa蛋白の分子量は12 kDaであることが判明した。抗Ssxaウサギポリクローナル抗体としてmSSXA-C1とmSSXA-C2と2種類を作製したが、ウェスタンブロットの結果からリコンビナントSsxa蛋白を良好に認識するのはmSSXA-C2であることが判明した。mSSXA-C2を一次抗体として使用した免疫組織染色では、陰性対照と比較して明らかに濃染された組織は精巣のみであり、他の正常組織では陰性対照と同様の染色パターンであった。分子量の小さなSsxa蛋白を解析すること、およびSsxa蛋白の細胞内における局

在を調べることを目的として、Ssxa と GFP の融合蛋白を作製した。蛍光顕微鏡にて蛋白発現プラスミド pSsxa-GFP 導入細胞では GFP が細胞質に局在していたのに対し、pGFP-Ssxa 導入細胞では GFP は細胞質よりも細胞核に局在することが確認された。同様に抗 GFP 抗体を一次抗体として使用した免疫染色では pSsxa-GFP 導入細胞は細胞質のみが染色されていたのに対し、pGFP-Ssxa 導入細胞は細胞質だけでなく細胞核も染色されていた。以上より、Ssxa 蛋白は生体内で分解され、KRAB ドメイン（核移行シグナル）を含む N 末端側分解産物は核に移行していることが示された。以上の成果から、今後、蛋白をコードする完全な塩基配列が同定された Ssxa を用いて同種同系癌精巣抗原ワクチンモデルが構築され、臨床における治療法の開発に役立つことが期待されると結論づけた。

スライドを用いた口頭発表後、副査・田中教授より以前報告された配列がスプライシングバリエーションである可能性について質問があった。またマウス Ssxa とヒト SSX との相同性について質問があった。次に、副査・丸尾准教授より免疫組織染色にて腫瘍細胞における Ssxa 蛋白発現状況について質問があった。また Ssxa の正確な切断部位を同定するには他にどのような研究方法が考えられるかについて質問があった。続いて副査・佐邊教授より癌精巣抗原および癌ワクチンの定義について質問があった。また、癌組織で何故癌精巣抗原のような抗原が発現されるのかについて質問があった。次に主査・濱田准教授より Ssxa mRNA 採取の際のサンプル（マウスの系統）についての確認があった。またウェスタンブロット解析における分子量 10. kDa 以下の蛋白についての確認があった。そして、癌精巣抗原は腫瘍マーカーの如く診断に使用可能かについて質問があった。最後に副査・平野准教授より抗 Ssxa 抗体の N 末端側の抗体作製方法について質問があった。また現在の癌精巣抗原を用いた臨床試験の現状についての質問があった。

癌精巣抗原が癌で発現するメカニズムや、基礎的なワクチン研究の進展状況に関しては知識の整理がやや不十分な点があったものの、いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容やその過程で得られた知見、文献的考察を交えて概ね適切に回答した。

本論文は、マウス癌精巣抗原 Ssxa の蛋白をコードした完全なる配列を決定した点で高く評価され、今後同種同系癌精巣抗原ワクチンのマウスモデル構築に可能性をもたらし、抗腫瘍免疫のメカニズム解析や最適な免疫プロトコール開発へ可能性を与えると期待される。

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）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。