

## SEREX による新規癌抗原の探索

日和佐隆樹<sup>1</sup>、島田英昭<sup>2</sup>、中畷和恵<sup>1,2</sup>、久保嶋麻理<sup>1,2</sup>、落合武徳<sup>2</sup>、瀧口正樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学、<sup>2</sup> 先端応用外科学

### 要 旨

SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) は癌細胞由来の cDNA 発現ライブラリーの中から患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子を同定する方法であり、癌抗原のスクリーニング法として優れている。我々は食道癌患者血清 21 検体を用いて SEREX スクリーニングを行い、411 クローン、297 種類の食道癌 SEREX 抗原を同定した。得られた cDNA クローンを大腸菌で発現させ、そのプロダクトについて血清抗体との特異的反応をウエスタン法により調べた。複数の患者血清において抗体陽性となる抗原を 13 種類選択し、それらについてさらに健常者血清における抗体陽性率と比較した。その結果、SURF1、TROP2、MKRN1 などの抗原に対する抗体は健常者血清よりも食道癌患者血清中に高頻度に検出されることがわかった。従って、これらの抗原は新規の癌抗原として有望であると考えられた。

### <序>

食道癌は最も悪性の癌の一つであり、5 年生存率も 20-40% 程度である。近年の外科手技の向上や補助化学放射線療法にもかかわらず予後は悪い (1,2)。治療成績の向上のためには早期発見が不可欠であるが、早期診断に用いられる腫瘍マーカーは限られている。そこで新規の癌抗原を発見し、それをマーカーとして診断に適用することは極めて重要である。

癌に対する自己免疫反応の解析方法として T 細胞エピソードのクローニング (3)、MHC ペプチドの溶出 (4)、そして SEREX (5) 等が用いられ、同定された遺伝子、タンパク質、ペプチドをまとめて癌イミュノームと総称している ([www2.licr.org/CancerImmunomeDB/](http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/))。このような方法による癌抗原の同定は癌の診断、モニタリング、そして免疫治療において極めて有用である。

この中で 1995 年に Sahin らが紹介した SEREX は癌細胞から調製された cDNA フェージライブラリーを大腸菌で発現させ、癌患者の血清中に存在する IgG 抗体が認識する抗原をスクリーニングする方法である (5)。その概略を図 1 に示す。SEREX 法では、同定された抗原をコードする遺伝子が既に cDNA の形でフェージにクローニングされているため、その塩基配列を調べるだけで遺伝子の同定が可能である。SEREX 法の開発によって癌抗原の大規模スクリーニングが可能になり、これまで多くの癌に適用され、1,100 以上の SEREX 抗原

が同定されている (6-10)。その中には p53, CDX2 等の変異抗原 (11)、NY-BR-1, tyrosinase 等の分化抗原 (12)、HER2, eIF-4 $\gamma$  等の過剰発現抗原 (11)、Restin, NY-CO-37 等のスプライスバリエントが含まれている。また、MAGE-1, NY-ESO-1 等の癌・精巣 (cancer-testes, CT) 抗原 (5,6) も含まれているが、SEREX 抗原の中で CT 抗原であることが確認されているのは 14 種類のみである。

SEREX データベースにはほとんどの癌について数十の SEREX 抗原が登録されているにもかかわらず、食道癌の SEREX 抗原は少ない。1997 年に Chen らが NY-ESO-1 から NY-ESO-8 までの 8 クローンを論文報告しているが、その後は Matthew と Scanlan が NY-ESO-9 から 12 までを追加登録しているのみである (表 1)。そのうち CT 抗原であることが確認されているのは NY-ESO-1 のみである (6)。その他には ribonucleoprotein が 2 種類、FUS がん遺伝子、endonuclease, LIMS1, CENPF, UACA 等が同定され、4 クローンは当時未同定の遺伝子であった。頭頸部扁平上皮癌では 2002 年に Monji らが 19 の SEREX 抗原を報告している (13)。また、2004 年には Vaughan らが 37 の SEREX 抗原を報告している (14)。肺扁平上皮癌では Diesinger らが 2002 年に 15 の SEREX 抗原を報告している (15) (表 1)。これら合計 83 の扁平上皮癌の SEREX 抗原のうち重複しているのは 1 ク

ローン (LIMS1) のみである。従って食道癌のみならず、扁平上皮癌の SEREX 抗原についてもまだスクリーニングは十分ではないと考えられる。その他扁平上皮癌 SEREX 抗原の特徴として RNA 結合および転写関連分子 9、翻訳関連タンパク質 7、タンパク質リン酸化関連分子 6、DNA 複製および DNA 結合タンパク質 5、熱ショックタンパク質 3、細胞骨格タンパク質 3、がん遺伝子 2 (FUS、LBC)、がん抑制遺伝子 1 (p53) 等であった。既知の癌抗原は 1 (CTCL) 種類のみであった。ほとんどの SEREX 抗原が細胞内タンパク質である一方で、collagen や laminin などの細胞外マトリックスタンパク質も同定されており、細胞外タンパク質や分泌タンパク質が SEREX 抗原となり得ないわけではない。

本研究では食道癌に対して SEREX スクリーニングを大規模に施行し、SEREX 抗原を多数同定した。それらをさらにウエスタン法を用いて解析し、新規腫瘍マーカーとなり得るいくつかの抗原を選別した。

#### <対 象>

SEREX 法：2000 年 5 月～2001 年 7 月の間に千葉大学医学部附属病院第二外科にて入院加療し、文書による同意を得た食道癌患者の中から無作為に抽出した 21 症例。

ウエスタンブロットティング：上記に 1997 年 6 月からの同条件の食道癌患者 54 症例を加えた 75 症例。対照群として健常者 43 例。

#### <方 法>

##### 1. $\lambda$ ZAPII フェージライブラリーの調製

食道癌細胞株 T.Tn より、全 RNA を抽出した。mRNA を調製後、cDNA を  $\lambda$ ZAPII の EcoRI-XhoI 部位に挿入して、cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリーサイズは、 $1.80 \times 10^6$ であった。

##### 2. SEREX スクリーニング

SEREX は Sahin らの方法により施行した (5)。大腸菌 (XL1-Blue MRF')  $1.5 \times 10^8$  個とフェージ ( $\lambda$  ZAPII ライブラリー)  $5 \times 10^4$  個を混合し、 $\Phi = 15\text{cm}$  NZY プレートに撒き、プラークが見え始めるまで 4～5 時間培養した。IPTG (Isopropyl-b-D-thio-galactopyranoside, 10mM) に浸したニトロセルロースメンブレンをプレートに載せ、更に 2～3 時間培養して cDNA から発現したタンパク質をメンブレンに転写した。メンブレンを TBS-T (0.05% Tween-20, 0.15M NaCl,

20mM Tris-HCl (pH 7.5)) で 3 回洗った後、2000 倍に希釈した食道癌患者血清を一次抗体として加え、メンブレンに転写したタンパク質と反応させた。TBS-T で洗った後、5000 倍希釈した二次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG) を加えた。発色試薬 (0.3mg/ml nitrobluetetrazolium, 0.15mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 0.1M NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl (pH 9.5)) を調製し、二次抗体と結合したプラークを発色させ、陽性プラークを回収した。1 血清につき 20 枚、計  $1 \times 10^6$  個のフェージをスクリーニングした。同様のスクリーニングをさらに 2 回繰り返し、単一のフェージクローンを分離回収した。

##### 3. In Vivo Excision

XL1-Blue MRF' に、単離された  $\lambda$ ZAP フェージと ExAssist helper phage を同時に感染させることで、インサート cDNA を含んだ pBluescript フェージミドに変換した。これを、大腸菌株 SOLR に導入し、pBluescript プラスミドを単離した。

##### 4. 遺伝子の同定

得られた pBluescript のインサート cDNA の塩基配列を調べ、NCBI-BLAST を用いてデータベースとのホモロジー検索を行い、遺伝子を決定した。

##### 5. ウエスタンブロットティングによる解析

上記で得られた pBluescript クローンを大腸菌 JM109 に導入し、IPTG を最終 1mM となるように加え、さらに 2 時間培養してインサート cDNA の発現を誘導した。その後、大腸菌を回収し、タンパク質抽出液を調製した。上記サンプルおよび、コントロール (IPTG 未処理大腸菌の抽出液) につき、患者血清を 2000 倍希釈したものを一次抗体として用いて、ウエスタンブロットティングを施行した。IPTG 処理したサンプルのみに、特異的なバンドが検出されたものを、陽性と判定した。

##### 6. RT-PCR

食道癌細胞株から AquaPure RNA Isolation Kit (Bio-Rad) を用いて全 RNA を単離した。逆転写は ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) を用いて oligo(dT)<sub>20</sub> プライマーにより行った。TROP2 の PCR には次のプライマーを用いた；センスプライマー：5'-GGCGCAAAGGAGACGTTTATC-3'、アンチセンスプライマー：5'-GACATCCAAACTGCGTTCAGG-3'。

また、コントロールの $\beta$ -アクチンのPCRには、センスプライマー：5'-GGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'、アンチセンスプライマー：5'-GAGAAGTGGGGTGGC TTTTAG-3'を用いた。PCRは94°C、3分の変性に続いて94°C、30秒の変性、59°C、30秒のアニーリング、68°C、30秒の伸長反応を30サイクル行った。

## 7. TROP2 抗体の作製

TROP2 タンパク質のアミノ酸 169-182 に相当する NH<sub>2</sub>-CHSDLDAELRRLFRE-CONH<sub>2</sub> ペプチドを KLH に結合させてウサギに3回免疫し、102日後に抗血清を得た。得られた血清をアフィニティー精製して抗 TROP2 ポリクローナル抗体を調製した。

## 8. 免疫組織染色

食道癌の組織アレイは Cybrdi 社、及び Superbiochips 社より購入した。それぞれの4 $\mu$ mの厚さの切片をキシレンで脱パラフィン化し、エチルアルコールで脱水し、クエン酸緩衝液中で5分間電子レンジ処理した。3%過酸化水素水を含むPBS中で15分間処理して内在性のペルオキシダーゼ活性を失活させた。TROP2抗体は250倍希釈して4°Cで24時間反応させた。二次抗体はビオチン標識抗ウサギIgG抗体を用い、ペルオキシダーゼ結合アビジンとdiaminobenzidineを用いて特異的反応を検出した。

## <結果と考察>

SEREX法にて同定された癌抗原は411クローンで、重複を除き297種類であった。その内訳を表2に示す。この中にはp53やCENPFなど、他のグループから扁平上皮癌のSEREX抗原として報告された分子が含まれていた。また、ferritinやkeratin19等の既存の腫瘍マーカーが含まれており、SEREX法が適切に施行されたことが示唆される。

これまで約100遺伝子についてウエスタンブロッティングを施行し、複数の癌患者血清で抗体陽性になることが確認された抗原遺伝子は13種類である。表3にそれらの遺伝子名、アクセッション番号、ORF領域、及びプロダクトサイズ、そして染色体位置を示す。表3、及び図2にそれらのプロダクトに対する抗体の陽性率を食道癌患者血清と健常者血清と比較した結果を示す。CU-EC-1, 2, 3, 4, 12, 13のプロダクトに対する血清抗体の陽性率が健常者血清よりも癌患者血清において有意に高くなっていた。一方ではCU-EC-6のように健常者血

清においても高い抗体陽性率を示す抗原も認められた。

以下、それらの遺伝子の文献報告の情報を示す。

### クローン Id : CU-EC-1、遺伝子名 : SURF1

ヒトSURF1 cDNAは約1kbで300アミノ酸から成るタンパク質をコードし、2つの膜貫通ドメインを持つ(16)。チトクロームCオキシダーゼ複合体の形成と安定化に必要な因子の1つであり、Leigh症候群で変異していることが報告されている(17)。

### クローン Id : CU-EC-2、遺伝子名 : LOC146223

ESTクローンの一つ。機能に関する情報はなし。

### クローン Id : CU-EC-3、遺伝子名 : HOOK2

エンドサイトーシスに関わるタンパク質の1つ。膜貫通性のリガンドのmultivesicular body内への蓄積に関与する(18)。この分子の変位によってリソソームに存在すべき加水分解酵素が初期エンドソームに運ばれ、そこに取り込まれたタンパク質の早期分解が誘導される。SEREXデータベースへの登録はない。

### クローン Id : CU-EC-4、

### 遺伝子名 : AGENCOURT\_7565913

ESTクローンの一つ。機能に関する情報はなし。

### クローン Id : CU-EC-5、遺伝子名 : mitosin/CENPF

SEREXデータベースには大腸癌など7件の登録があり、Matthewらが食道癌のSEREX抗原として登録したNY-ESO-11と同じ分子である。350-400kDaのリン酸化タンパク質。late G2期に染色体キネトコア(動原体)に結合し、細胞分裂後に急速に分解される。そのリン酸化の時間的経過は、細胞分裂における核の再構築の時間的経過とほぼ一致する。またmitosinのN末端の欠如した変異体の過剰発現によって、主にG2/M期で細胞周期がブロックされる。これらのことから、mitosinは、細胞分裂に重要な役割を果たしていると考えられる(19, 20)。

### クローン Id : CU-EC-6、遺伝子名 : ZIC2

転写因子。主に小脳にて発現している。Sp1, Sp3と共にドーパミンレセプターの組織特異的な発現の調整に関わる。肺扁平上皮癌のSEREXによって単離されているNY-SCLC-3と同じ遺伝子である(8)。前全脳胞症(holoprosencephaly-5)の原因遺伝子。APOE promoterと結合。

**クローン Id : CU-EC-7、遺伝子名 : CCNL2**

cyclin ファミリーの新メンバー。RNA ポリメラーゼに結合し、スプライシングに関与すると報告されている (21)。SEREX データベースには大腸癌で 1 件報告されている。

**クローン Id : CU-EC-8、遺伝子名 : Ki-1/57**

キナーゼ活性を保持しており、さまざまながん細胞において高発現している (22)。この抗原は抗 CD-30 抗体 Ki-1 と交叉反応することから同定された。

**クローン Id : CU-EC-9、遺伝子名 : enigma**

enigma は細胞骨格の形成、器官形成、エンドサイトーシスに関与する。2 つの Zn フィンガーを含む LIM ドメインによって PKC や Ret と結合する (23)。Shc と enigma は両者とも Ret のシグナル伝達に必要であり、しかも Ret の同じ領域に結合する。このことから Ret が二量体を形成することがシグナル伝達に必須であり、片方の Ret に結合した enigma が局在を決定し、もう一方の Ret に結合した Shc がシグナルを下流に伝える役割を担っていると推定される (23)。

**クローン Id : CU-EC-10、遺伝子名 : HCA25a**

EST クローンの一つ。肝細胞癌から単離されたが、機能については未知である (24)。

**クローン Id : CU-EC-11、遺伝子名 : symplekin**

Huntingtin と結合し、caspase-8 をリクルートしてアポトーシスを誘導する (25)。また、HSF1 に作用して HSP70 mRNA のポリアデニル化を制御する (26)。SEREX データベースへの登録は大腸癌で 1 件。

**クローン Id : CU-EC-12、遺伝子名 : TROP2/ TACSTD2**

TROP2 は 323 アミノ酸から成る分子量 35,709 のタンパク質である (27)。細胞表面に存在し、受容体であろうと推定されているがリガンドは不明である。Ca<sup>2+</sup> シグナルの伝達分子である。ほとんどのがんにおいて発現している細胞膜表面糖タンパク質で、がん関連抗原である GA733-1 とほぼ同じものである (27)。TROP1 と共にがん細胞の増殖を調節すると考えられている。cyclin D1 とのキメラはがん遺伝子に分類されている。

**クローン Id : CU-EC-13、遺伝子名 : makaorin1**

中枢神経系の発生、発達過程、及び成体の精巣に豊富

に発現する MKRN 遺伝子ファミリーの原種。RING 及び、2 ~ 4 の C<sub>3</sub>H Zn フィンガーモチーフを持つ (28)。転写因子 Oct-4 の標的遺伝子の一つ。

これら 13 のクローンのうち CU-EC-12/TROP2 についてさらに解析を進めた。血清 TROP2 抗体をウエスタン法により調べた結果の一例を図 3 に示す。A は患者血清を、B は健常者血清を一次抗体として用いた結果である。患者血清を用いた場合、IPTG 処理に依存して矢印に示すバンドが特異的に検出された。このバンドの分子量は約 44 kDa であり、pBluescript の b-Gal 遺伝子の途中に TROP2 遺伝子が組み込まれているので、b-Gal-TROP2 融合タンパク質として発現されていると考えられる。

このようなウエスタン法によって 75 検体の食道癌患者血清と 43 検体の健常者血清における TROP2 抗体の有無を調べた。その結果、患者血清では 31% (23/75) で抗体が検出されたのに対し、健常者ではわずか 2.3% (1/43) であった。

次に血清 TROP2 抗体の有無と臨床病理学的分類との関係を調べた。その結果、血清 TROP2 抗体は腫瘍のサイズと有意に相関していた (表 4)。このことから血清 TROP2 抗体を調べることによって腫瘍のサイズを推定できる可能性が示唆される。しかしながら、性、年齢、発生部位、深達度、転移、ステージ等とは無関係であった。また、生存率とも有意な関係を示さなかった。

次に血清 TROP2 抗体と既存の腫瘍マーカー、SCC-Ag、CYFRA21-1、CEA と比較した。その結果、血清 TROP2 抗体の陽性率は他の腫瘍マーカーの陽性率に匹敵するものであり (図 4A)、さらにそれらと組み合わせることによって高い確度で腫瘍の存在を予測できることがわかった (図 4B)。

血清 TROP2 抗体の出現は抗原の高発現による可能性が考えられるので、TROP2 の mRNA 発現を RT-PCR で、タンパク質発現をウエスタン法により調べた。正常食道粘膜細胞に比べて T.Tn 細胞株では TROP2 mRNA の発現が高くなっていったが、その他の細胞株では必ずしも高発現しているわけではなかった (図 5A)。しかしながら、TROP2 タンパク質の発現はほとんどの食道癌細胞株で上昇していた (図 5B)。これらのことから、転写レベルよりもむしろ翻訳、及び翻訳後の発現レベルの調節機構の関与が推定された。

食道癌組織における TROP2 タンパク質の発現を免疫組織染色法により調べた。図 6 にその結果の 1 例を示

す。Aの過形成組織に比べてBの食道癌組織においてTROP2タンパク質の発現が顕著に高くなっていることがわかる。組織アレイを用いて55の食道癌組織を調べた結果、そのうち10(18%)検体においてTROP2タンパク質の高発現が認められた。従ってこのような癌組織における高発現がTROP2の血清抗体の出現の一因となっていると考えられた。

TROP2は多くの癌細胞において高発現することが知られていたが、本研究においてその自己抗体が食道癌患者血清中に存在することが初めて発見された。血清TROP2抗体は高発現したTROP2により誘導されたと推定されるが、正常食道細胞においてもある程度の発現が認められることから、抗体の発生には抗原の発現レベルに閾値があると推定される。あるいは、図5Bに示すTROP2タンパク質は複数のバンドを呈し、さまざまな翻訳後修飾があると推定され、それらの癌特異的な修飾が抗体を誘導した可能性も否定できない。

TROP2の例のように、本研究のSEREX法により単離された抗原はその抗体が患者血清中に存在することが明らかであり、この血清抗体を調べることにより癌の診断が可能である。このような血清抗体による診断は既に抗p53抗体の例で有効であることが立証されており(29,30)、従来の抗原を調べる方法に加えて有用な診断方法として今後期待されるところである。

### <結語>

これまでの解析により、新規の食道癌腫瘍マーカーの候補となる遺伝子が単離された。これらの抗原タンパク質の血清中での発現レベルは未解析であるが、血清中におけるそれらの抗体レベルそのものが今後診断上有用な腫瘍マーカーとして成り立つであろうと考えられた。さらにこれらの血清抗体を既存のマーカーと組み合わせることによって、より正確な診断が可能になると考えられた。

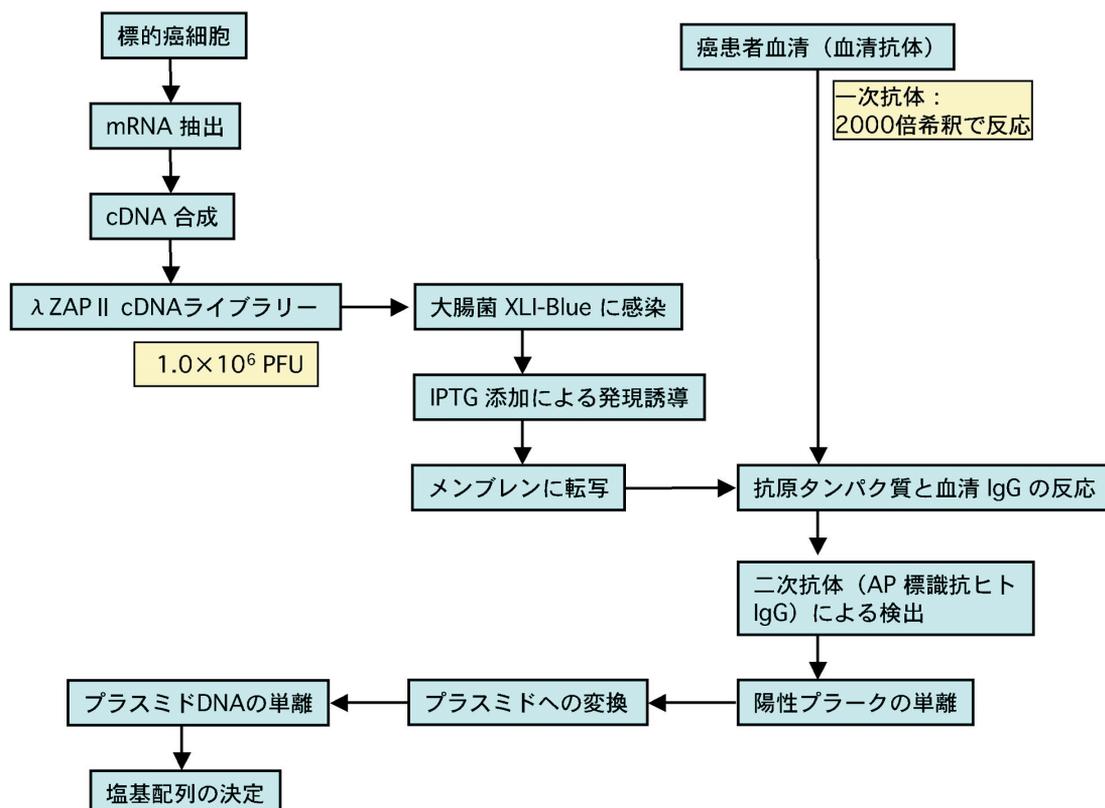


図1. SEREX法の概略

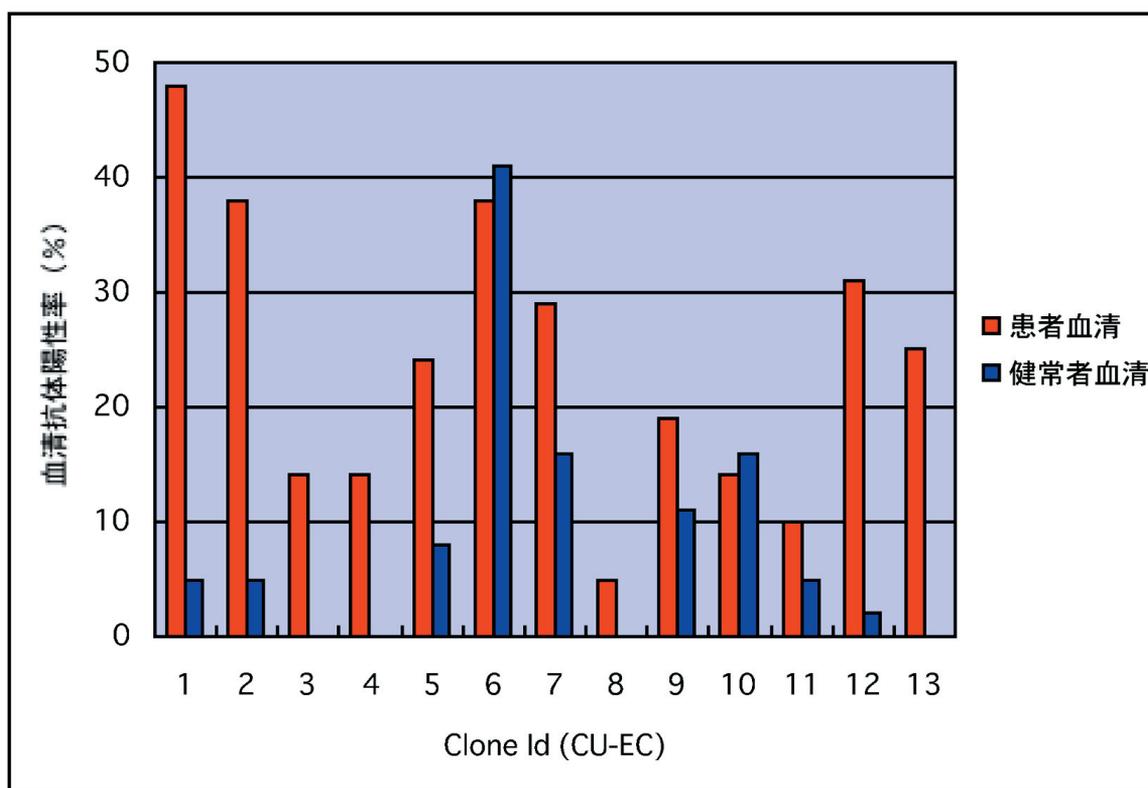


図 2. SEREX 抗原に対する食道癌患者血清及び健常者血清の抗体陽性率

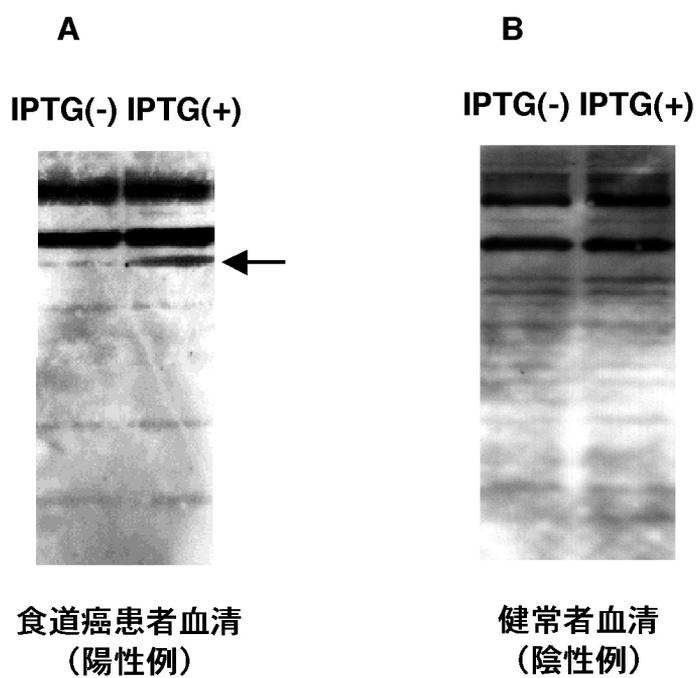


図 3. ウェスタン法による血清 TROP2 抗体の解析

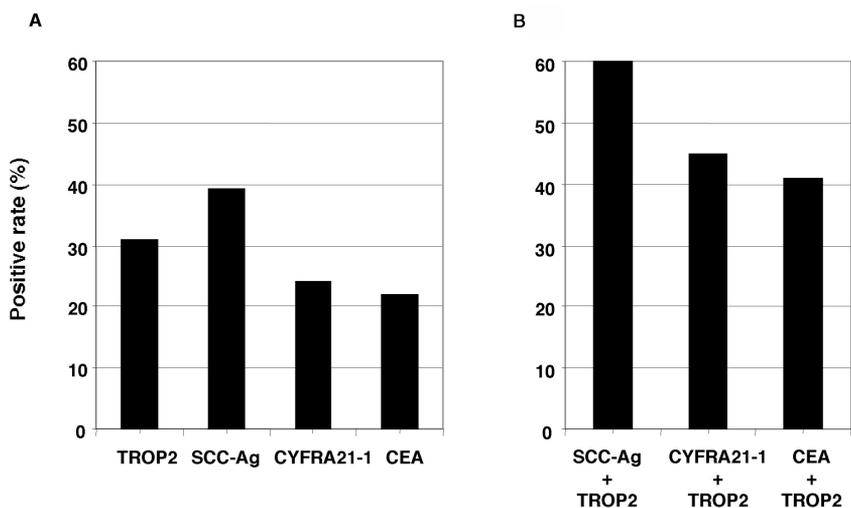


図 4. 血清 TROP2 抗体と既存の腫瘍マーカーの比較、およびそれらの組み合わせ

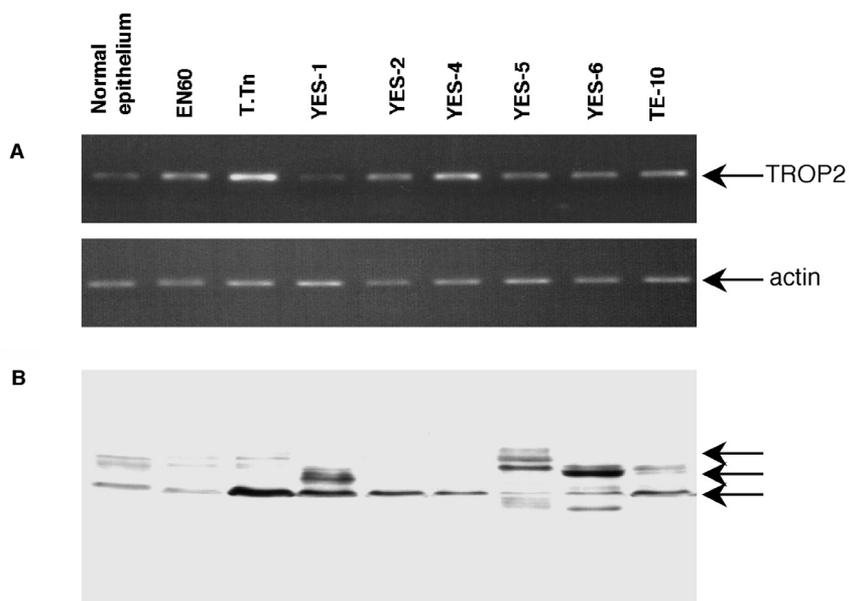


図 5. 食道癌細胞株における TROP2 mRNA、およびタンパク質の発現  
B の矢印は食道癌細胞株の TROP2 タンパク質の翻訳後修飾と考えられる

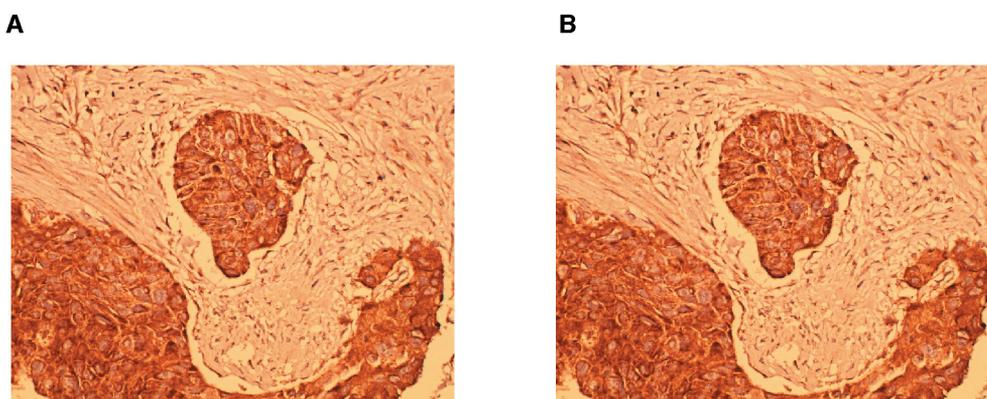


図 6. TROP2 抗体を用いた免疫染色の結果

表 1. 扁平上皮癌の SEREX 抗原のリスト

	Gene Id	Gene name	Ref.
食道癌	NY-ESO-1	No strong homology	6
	NY-ESO-2	U1 sn RNP1 homolog	
	NY-ESO-3	Colon 3' direct Mbol cDNA: brain cDNA	
	NY-ESO-4	No strong homology	
	NY-ESO-5	No strong homology	
	NY-ESO-6	Human FUS/TLS gene	
	NY-ESO-7	Human U1-70k sn RNP	
	NY-ESO-8	No strong homology	
食道癌	NY-ESO-9	NTHL1: endonuclease III-like protein 1	31
	NY-ESO-10	LIMS1: LIM and senescent cell antigen-like domains 1	
	NY-ESO-11	CENPF	
	NY-ESO-12	UACA: uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeat	
頭頸部癌	KM-HN-1	No match	13
	KM-HN-2	KIAA0175	
	KM-HN-3	Casein kinase 1, gamma 1S	
	KM-HN-4	Homo sapiens clone HH409 unknown mRNA	
	KM-HN-5	MAGE4a	
	KM-HN-6	Replication protein A2	
	KM-HN-7	KIAA0729	
	KM-HN-8	DKFZP564M182	
	KM-HN-9	NFR $\kappa$ B binding protein	
	KM-HN-10	Nuclear pore complex protein	
	KM-HN-11	NF-E2-related factor 2	
	KM-HN-12	Integrin $\alpha$ 6	
	KM-HN-13	FLJ00016	
	KM-HN-14	Ribosomal protein L35a	
	KM-HN-15	Karyopherin (importin) $\beta$ 3	
	KM-HN-16	Mitochondrial ribosomal protein S10	
	KM-HN-17	BK65A6.2 Sushi domain (SCR repeat) containing	
	KM-HN-18	Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 1	
	KM-HN-19	UBE3A	
頭頸部癌	AU-HN-2	TREX1, 3' repair exonuclease	14
	AU-HN-4	BRAP (BRCA1 associated): Nuclear localization protein	
	AU-HN-5	Trim 26 zinc finger domains	
	AU-HN-10	GTF21 transcription factor. Murine homolog TF11-1	
	AU-HN-11	NSEP1 (YB-1) transcription factor	
	AU-HN-16	MAZ transcription factor associated with c-myc	
	AU-HN-17	SON (DBP-5; KIAA1019; NREBP DNA binding protein)	
	AU-HN-27	NACA nascent polypeptide-associated complex	
	AU-HN-37	NUBP2 nucleotide binding protein	
	AU-HN-3	EEF2 Translation elongation factor 2	
	AU-HN-13	GU2 Putative RNA helicase	
	AU-HN-30	RPL13A ribosomal protein	
	AU-HN-31	SFRS21P (CASP1 1; SIP1; SRRP1290 splicing factor)	
	AU-HN-33	RPS12 ribosomal protein	
	AU-HN-34	MGC2835 RNA helicase	
	AU-HN-18	TMF1, TATA modulatory factor	
	AU-HN-23	PRC1 regulator of cytokinesis	
	AU-HN-22	KRT14 keratin 14	
	AU-HN-28	Vinuculin	
	AU-HN-32	H2AFY histone family member	
	AU-HN-14	SLK (KIAA02304) Ste related kinase	
	AU-HN-20	NOL3 (ARC) nuclear protein 3, apoptosis repressor	
	AU-HN-24	DNAJA2 member of Hsp40 family	
	AU-HN-35	DNAJA1 member of HSP40 family	
	AU-HN-1	LINE-1 retrotransposon	
	AU-HN-6	MOG (HSPC 165) Homolog of yeast protein	
	AU-HN-12	LIMS1 (PINCH): LIM and senescent antigen-like domain	
	AU-HN-21	COPB2 coatomer protein complex subunit protein	
	AU-HN-25	FLJ22548 hypothetical protein	
	AU-HN-26	C21orf97; FLJ21324; MGC15873	
	AU-HN-29	SSNA1 Sjogrens syndrome nuclear autoantigen 1	
	AU-HN-9	unknown	
	AU-HN-15	KIAA0530, zinc finger domain	
AU-HN-36	rat stannin		
AU-HN-7	hypothetical protein DKFZp4340032		
AU-HN-8	human FLJ23089		
AU-HN-19	PC326		
肺癌		lymphoid blast crisis oncogene (LBC)	15
		ribosomal protein S18 (RPS18)	
		mRNA for protein kinase C (PKC)	
		heat shock protein 75 (TRAP1)	
		hypothetical protein DKFZp761L0424 (DKFZP)	
		KIAA0244 protein	
		protein Immunoreactive with anti-PTH polyclonal antibodies	
		cDNA FLJ12693 fis clone NT2RP1000324	
		eukaryotic translation initiation factor 2 kinase 4 (Eif2ak4)	
		TP53 BP	
		laminin 1 (LAMC 1)	
	collagen 1A1		
	thyroid hormone receptor interactor 11		
	CTCL tumor antigen se2-5		
	cathepsin B (CTSB)		

表 2. SEREX 法によって同定した食道癌抗原

分類	クローン数
癌遺伝子・癌抑制遺伝子 (PI3K-p85、p53)	2
癌関連遺伝子 (ferritin、keratin 19など)	27
増殖/アポトーシス関係	55
癌関連の可能性あり	44
不明	160
新規遺伝子	9
合計	297

表 3. 食道癌 SEREX スクリーニングによって同定された抗原遺伝子

Clone Id	Name	GENBANK Accession No.	CDS	Mr (kDa)	Chromosome Location	Positivity of serum antibodies		P values*
						Cancer patients	Healthy donors	
CU-EC-1	surfeit 1 (SURF1)	NM_003172	33-935	33	9q34.2	10/21 (48%)	2/37 (5%)	<0.01
CU-EC-2	similar to RIKEN cDNA 2810051A14 (LOC146223)	XM_085368	183-887	26	16q23.1	8/21 (38%)	2/37 (5%)	<0.01
CU-EC-3	HOOK2	NM_013312	75-2234	79	19p13.2	3/21 (14%)	0/37 (0%)	0.04
CU-EC-4	AGENCOURT_7565913	BQ222104	ND	ND	ND	3/21 (14%)	0/37 (0%)	0.04
CU-EC-5	mitosin (CENPF)	NM_016343	73-9414	340	1q32-q41	5/21 (24%)	3/37 (8%)	0.12
CU-EC-6	Zinc finger protein ZIC2	AF104902	1-1602	59	13q32	8/21 (38%)	15/37 (41%)	0.26
CU-EC-7	CCNL2	AF251294	1152-2198	38	1p36.33	6/21 (29%)	6/37 (16%)	0.32
CU-EC-8	Ki-1/57 intracellular antigen	U77327	1-900	33	9q22.3-q3	1/21 (5%)	0/37 (0%)	0.36
CU-EC-9	enigma (LIM domain protein)	NM_005451	67-1440	50	5q35.3	4/21 (19%)	4/37 (11%)	0.44
CU-EC-10	hepatocellular carcinoma- associated antigen HCA25a	AF469043	1935-2396	17	19	4/21 (14%)	6/37 (16%)	0.50
CU-EC-11	symplekin/Huntingtin interacting protein 1 (SPK)	NM_004819	460-3888	126	19q13.3	2/21 (10%)	2/37 (5%)	0.61
CU-EC-12	TROP2/TACSTD2	X77753	616-1587	36	1p32-p31	23/75 (31%)	1/43 (2%)	<0.01
CU-EC-13	makorin1 (MKRN1)	NM_013446	159-1607	53	7q34	18/73 (25%)	0/50 (0%)	<0.01

\* P values were calculated by Fisher's exact probability.  
ND, not determined.

表 4. 食道癌患者血清 TROP2 抗体の有無と臨床病理学的分類の関係

分類		血清TROP2抗体の陽性率			P値*
		総数	陽性数	百分率	
Gender	Male	68	22	32%	0.427
	Female	7	1	14%	
Age	<66	37	11	30%	>0.999
	≥66	38	12	32%	
Location	Upper	13	1	8%	0.055
	Lower	62	22	35%	
Tumor size	<50mm	32	4	13%	0.005
	≥50mm	43	19	44%	
Tumor depth	T1	20	4	20%	0.270
	T2-T4	55	19	35%	
N factor	N0	20	6	30%	>0.999
	N1	55	17	31%	
M factor	M0	52	16	31%	>0.999
	M1	23	7	30%	
Stage	I	14	3	21%	0.450
	II, III, IV	61	20	33%	

\*P values were calculated by Fisher's exact probability test.

文 献

1. Isono K, Ochiai T. (1992) Recent advances of treatment of cancer of the esophagus (review). *Ann Cancer Res and Therapy*. 1: 9-16.
2. The Japanese Society for Esophageal Diseases. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer In Japan (1998, 1999) & Long-term Results of Esophagectomy in Japan (1988-1997) 3<sup>rd</sup> Edition. Tokyo, Japan.
3. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254: 1643-1647.
4. Skipper JC, Kittleson DJ, Hendrickson RC, Deacon DD, Harthun NL, Wagner SN, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL Jr. (1996) Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17 /gp100. *J Immunol*. 157: 5027-5033.
5. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:11810-11813.
6. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 1914-1918.
7. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Tureci O, Sahin U, Pfreundschuh M, Old LJ. (1998) Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer*. 76: 652-658.
8. Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jager D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT. (2000) Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 4198-4203.
9. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. (2001) Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 281: 936-944.
10. Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF. (2002) Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol*. 169: 1102-1109.
11. Scanlan MJ, Gout I, Gordon CM, Williamson B, Stockert E, Gure AO, Jäger D, Chen YT, Mackay A, O'Hare MJ, Old LJ. (2001) Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun*. 1: 4.
12. Jäger D, Stockert E, Gure AO, Scanlan MJ, Karbach J, Jager E, Knuth A, Old LJ, Chen YT. (2001) Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res*. 61, 2055-2061.
13. Monji M, Senju S, Nakatsura T, Yamada K, Sawatsubashi M, Inokuchi A, Nishimura Y. (2002) Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun*. 294: 734-741.
14. Vaughan HA, St Clair F, Scanlan MJ, Chen YT, Maraskovsky E, Sizeland A, Old LJ, Cebon J. (2004) The humoral immune response to head and neck cancer antigens as defined by the serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning. *Cancer Immun*. 4: 5.
15. Diesinger I, Bauer C, Brass N, Schaefer HJ, Comtesse N, Sybrecht G, Meese E. (2002) Toward a more complete recognition of immunoreactive antigens in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer*. 102: 372-378.
16. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA.

- (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nature Genet.* 20: 337-343.
17. Tiranti V, Galimberti C, Nijtmans L, Bovolenta S, Perini MP, Zeviani M. (1999) Characterization of SURF1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet.* 36: 2533-2540.
  18. Kramer H, Phistry M. (1999) Genetic analysis of hook, a gene required for endocytic trafficking in *Drosophila*. *Genetics.* 151: 675-684.
  19. Zhu X, Mancini MA, Chang KH, Liu CY, Chen CF, Shan B, Jones D, Yang-Feng TL, Lee WH. (1995) Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol Cell Biol.* 15: 5017-5029.
  20. Landberg G, Erlanson M, Roos G, Tan EM, Casiano CA. (1996) Nuclear autoantigen p330/CENP-F: a marker for cell proliferation in human malignancies. *Cytometry.* 25: 90-98.
  21. Yang L, Li N, Wang C, Yu Y, Yuan L, Zhang M, Cao X. (2004) Cyclin L2, a novel RNA polymerase II-associated cyclin, is involved in pre-mRNA splicing and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem.* 279: 11639-11648.
  22. Kobarg J, Schnittger S, Fonatsch C, Lemke H, Bowen MA, Buck F, Hansen HP. (1997) Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. *Exp Clin Immunogenet.* 144: 273-280.
  23. Dudrick K, Gill GN, Taylor S. (1998) Shc and enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Mol Cell Biol.* 18: 2298-2308.
  24. NCBI Nucleotide data base. AF469043. Unpublished information.
  25. Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, Vaillancourt JP, Houtzager V, Rasper DM, Roy S, Hayden MR, Nicholson DW. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol.* 4: 95-105.
  26. Xing H, Mayhew CN, Cullen KE, Park-Sarge OK, Sarge KD. (2004) HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin. *J Biol Chem.* 279:10551-10555.
  27. Fornaro M, Dell'Arciprete R, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG, Alberti S. (1995) Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int J Cancer.* 62: 610-618.
  28. Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, RusK, Marshall Graves JA, Stewart CL, Nicholls RD. (2000) The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics.* 66: 76-86.
  29. Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. (2000) Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 89: 1677-1683.
  30. Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Shiratori T, Hayashi H, Takeda A, Ochiai T. (2002) Prognostic significance of serum p53 antibody in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery.* 132: 41-47.
  31. Matthew J. Scanlan MJ, Cancer Immunome Database.