岡山医学会雑誌　第115巻
May 2003, pp. 9－14

特別依頼原稿

プロアクロシン結合タンパクsp32前駆体のヒトホモログ遺伝子の同定とがん・精巣（CT）抗原

小　野　俊　朗

— 岡山大学医学賞（林原賞）を受賞して —

キーワード；OY-TES-1, sp32, Cancer/testis (CT) antigen, Sperm protein, Cancer

はじめに

現在までに，がん・精巣（cancer/testis, CT）抗原，分化抗原，突然変異によるもの，遺伝子増幅や過剰発現によるもの，スプライシング異常，レトロウイルス抗原などさまざまな種類のがん抗原が同定されてきている．これらの中でその発現特異性から，がん免疫療法の標的分子として最も有望と期待されているのはCT抗原である．CT抗原は正常では精巣のみに発現するが，さまざまな種類のがんに発現がみられるという特徴を有する．これまでにCT抗原としては細胞傷害性T細胞（CTL）認識抗原として同定されたMAGE[1]，BAGE[2]，GAGE[3]，がん患者血清を用いてがん細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングしてIgG認識抗原を同定するSEREX法によりSSX[4,5]，NY-ESO-1[6]，SCP1[7]，CT7[8]，CT8[9]，cTAGE-1[10]が同定された．また，ディファレンシャルディスプレイ法などの非免疫学的方法によりCT9[11]，CT10[12]，CTp11[13]，SAGE[14]が同定された．

われわれはSEREX法を用いてBALB/cマウス線維肉腫Meth AよりマウスCT抗原をコードする遺伝子pemを単離，同定した[15]．このpemのヒトホモログ遺伝子を同定する目的で，マウスpemの塩基配列とpemに関係するヒト精巣由来のEST配列情報を基に，ヒト精巣cDNAライブラリーを解析した．その結果，新規ヒト遺伝子OY-TES-1がクローニングされた[16]．これはpemのヒトホモログではなく精巣ア

論文請求先：岡山大学大学院医歯学総合研究科　免疫学
電話：086-235-7192　FAX：086-235-7193
E-mail：onot@md.okayama-u.ac.jp

● プロフィール ●

1978年岡山大学大学院理学研究科修士課程修了．重井医学研究所，岡山大学歯学部助手を経て，1990年医学部助手（寄生虫学教室）．1991年，中山睿一教授（現大学院医歯学総合研究科免疫学）の着任にともない，腫瘍免疫学の研究に従事．1996年4月より2年間米国アルバート・アインシュタイン医科大学（Stanley G. Nathenson 教授）においてT細胞レセプタのペプチド/MHC 複合体認識機構の研究に従事．帰国後，再渡米し，ニューヨーク，ラドウィック癌研究所，Lloyd J. Old，Matthew J. Scanlan 両博士のもとで，SEREX法（がん患者抗体を用いる cDNA 発現クローニング法）の手技を研修．このSEREX法で，マウス線維肉腫 Meth A 抗原の解析を行い，がん・精巣（CT）抗原 pem を同定した（平成13年度岡山医学賞（山田賞））．このマウスでの解析をもとに，ヒト精巣より新規ヒト CT 抗原，OY-TES-1 を同定した。CT 抗原はMAGE や NY-ESO-1などが知られているが，その発現特異性からがん免疫療法の標的分子として現在もっとも可能性のある抗原として，世界中で新たな CT 抗原の同定の努力がなされてる．現在肺癌，大腸癌，腎臓癌などの癌の他，自己免疫病についても SEREX 解析を行っている．また，これらに関連してがんと精子形成，胚形成反応との関連にも興味を持っている．

本年4月より，自然生命科学研究支援センター光・放射線解析部門鹿田施設助教授．

クロソーム内のプロアクロシン結合タンパク質sp32 前駆体であった．本稿ではこのOY-TES-1の同定とそのCT 抗原性の解析，及びがんに発現する他の精子タンパクについて解説する．

OY-TES-1遺伝子の同定とOY-TES-1タンパク

マウスpemの塩基配列とpemに関係するヒト精巣由来のEST配列情報を基に，プライマーを設計し，ヒト精巣cDNAライブラリーを鋳型にしてPCR法を行い 1.1 kbのPCR増幅産物を得た．データベースでの検索の結果，この1.1 kbの遺伝子断片は14個のESTクローンと相同性があった．14個のESTクローンのうち12個は得られた遺伝子断片の 3'端に位置し，さらにそのうちの10個はヒト精巣由来のクローンであった．さらに5'RACE法などを行い，全長1895 bpのcDNAを得た．これは新規ヒト遺伝子であり，OY-TES-1と名付けた (GenBank accession number ABO51833)．データベースによるホモロジー検索の結果，このOY-TES-1はpemのヒトホモログではなく，精子アクロソームに局在するプロアクロシン結合タンパクsp32前駆体のヒトホモログであった．このsp32はマウス，モルモット，ブタで同定されているがヒトでははじめての発見であった．FISH法やゲノム情報解析によりOY-TES-1は12p12-p13にマッピングされており，10個のエクソンより構成され，全長は9339 bpであった．さらに，サザンブロット法により少なくとも2個の遺伝子ファミリーよりなっていることがわかった（図１）．OY-TES-1タンパクは12個のシステイン残基を含む543アミノ酸残基よりなり，その中には，グルタミン-グルタミン酸リッチドメイン，酸性アミノ酸リッチ領域があり，各動物種間でよく保存されていた．タンパク質レベルでの各動物種間での相同性はヒト-モルモットで77.2%，ヒト-ブタで81.9%，ヒト-マウスで75.2%であった．sp32前駆体タンパクはそのN-末端にシグナル配列を持ち，さらにアルギニン273とグルタミン酸274の間でクリーベイジされ，その後半部分が成熟sp32タンパクとなる（図２）．sp32は精子先端のアクロソーム内でプロアクロシンを効率的にパッケージングしていると予想される．

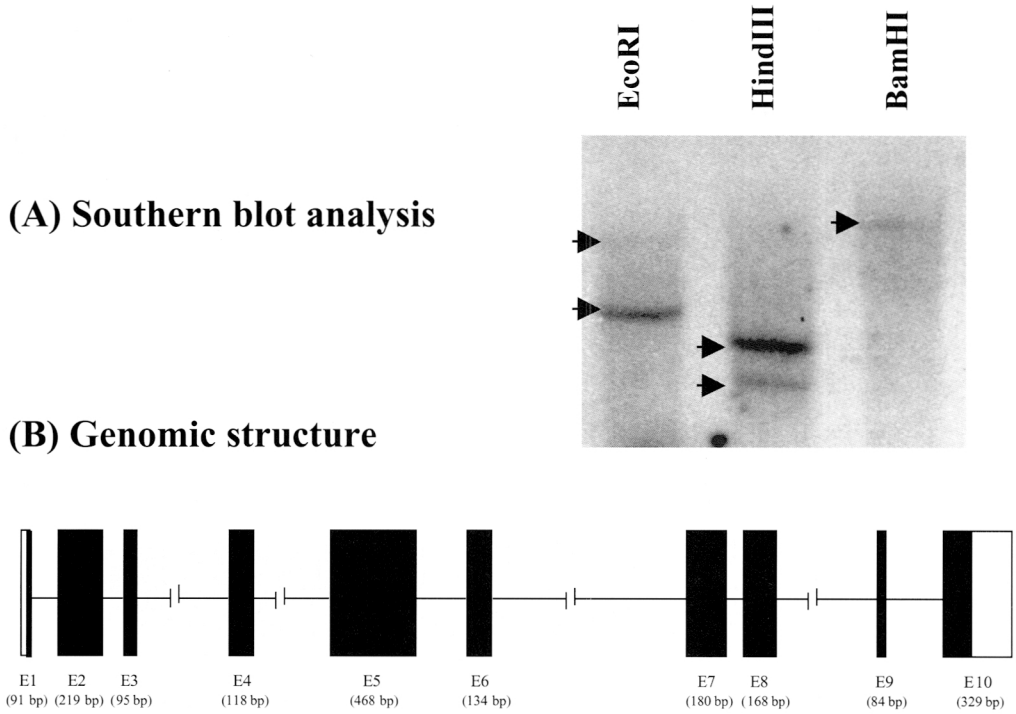

図１　OY-TES-1遺伝子
(A)サザンブロット解析．(B) OY-TES-1のゲノム構造．10個のエクソンより構成され、全長9339 bpである．
(Ono T, et al, Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 3282-3287.より改変)

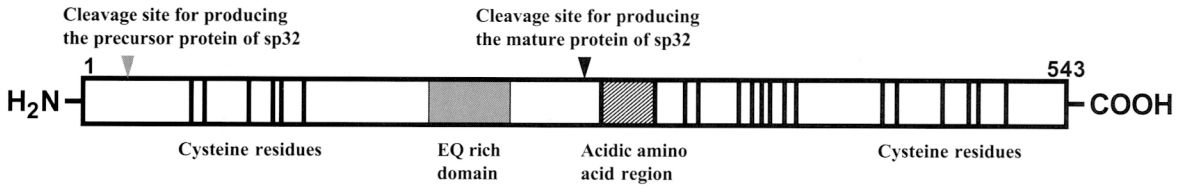

図２　プロアクロシン結合タンパクsp32前駆体の模式図
アミノ末端のシグナル配列がクリーベイジされた後（灰色矢頭），アルギニン273とグルタミン酸274の間でクリーベイジされ（矢頭），その後半部分が成熟sp32タンパクとなる．

OY-TES-1の正常組織及び癌での発現とその免疫原性の解析

OY-TES-1遺伝子の正常組織及び各種の癌での発現をRT-PCR法で解析した．OY-TES-1は正常組織では調べた16種類の組織のうち，予想通り精巣にのみ発現していた（図３）．癌組織では膀胱癌，乳癌，肝癌，肺癌，大腸癌に発現していた（図４，表１）．次にOY-TES-1組み換えタンパクを作製し，これを用いてELISA法により，癌患者血清中の抗体の有無を解析した．健常人20名には抗体産生はまったく

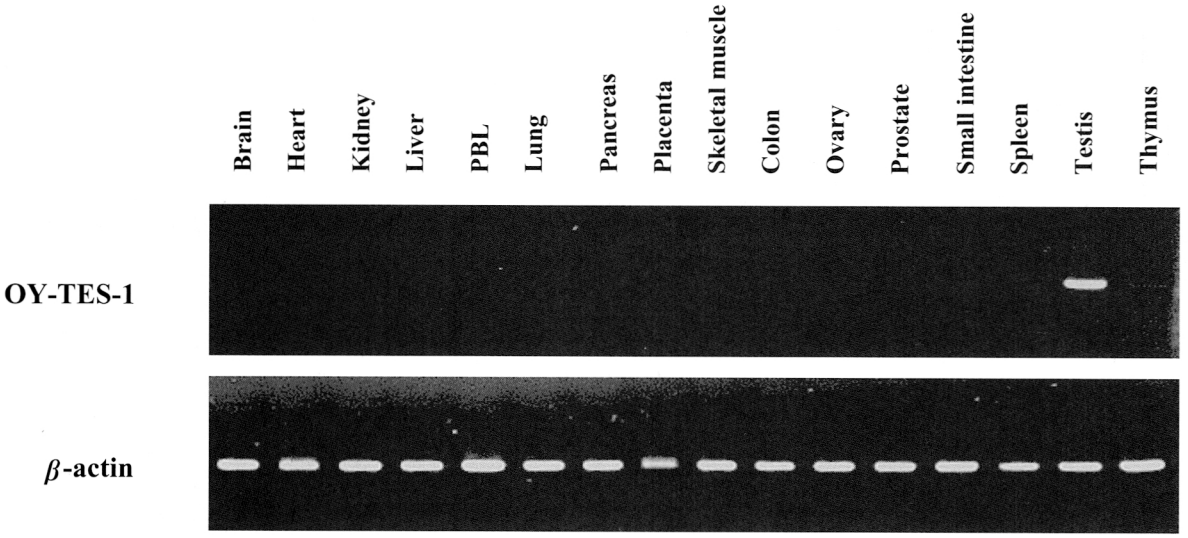

図３　正常組織でのOY-TES-1 mRNAの発現
（Ono T, et al, Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 3282-3287.より改変）

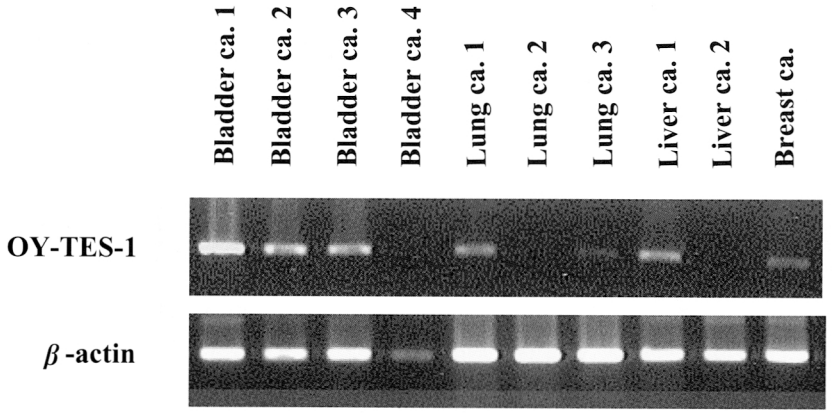

図４　各種の癌組織でのOY-TES-1 mRNAの発現
（Ono T, et al, Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 3282-3287.より改変）

表1　各種がん組織でのOY-TES-1 mRNAの発現

Tumor type	mRNA, positive/total
Bladder cancer	11/39 (28%)
Breast cancer	2 / 5 (40%)
Liver cancer	2 / 5 (40%)
Lung cancer	1 / 5 (20%)
Colon cancer	2 /13 (15%)
Stomach cancer	0 / 5 (0 %)
Renal cancer	0 /10 (0 %)

(Ono T, et al, Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 3282-3287.より改変)

認められなかったが，調べた393人の癌患者のうち25人（6.4%）にOY-TES-1に対する抗体が認められ，新しいCT抗原であることが証明された（表2）．表には同じ癌患者血清を用いて，代表的なCT抗原であるNY-ESO-1に対する抗体産生を調べた結果も示してある．NY-ESO-1はCTLと抗体で共に認識される抗原として，現在免疫療法の最も有力なターゲットとされており，欧米ではすでに悪性黒色腫患者などに対して臨床応用がなされ，一定の効果が得られている[17,18]．OY-TES-1も癌患者に対して高い免疫原性を有していることがわかった．

表2　健常人及びがん患者血清の OY-TES-1 及び NY-ESO-1に対する反応性

	OY-TES-1	NY-ESO-1
Healthy donor	0 /20	0 /20
Bladder cancer	3 /58	9 /108
Prostate cancer	3 /85	6 /85
Lung cancer	3 /66	4 /66
Liver cancer	10/95	2 /95
Colon cancer	6 /58	0 /58
Ovarian cancer	0 /31	3 /31
Total	25/393(6.4%)	24/443(5.4%)

(Ono T, et al, Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98, 3282-3287.より改変)

精子タンパクと癌

現在までにOY-TES-1を含めて14種類を超えるヒトCT抗原が同定されているが，タンパクとしての機能が知られているのは，OY-TES-1の他は減数分裂に関与するタンパクであるSCP-1のみである[19]．その他CTp11が精子タンパクとしてみいだされたSPAN-Xであることがわかった[20]．これらのことから，精子タンパクの中には，癌に発現し，しかもCT抗原性を有するものが存在することが考えられた．われわれは，データベースや文献上からOY-TES-1/sp32やSPAN-X/CTp11を含む12種類の精子タンパクをリストアップした（表3）．SPAN-X/CTp11を除く11種の精子タンパクについて，それぞれの遺伝子特異的プライマーを作製し，正常組織での発現をRT-PCR法及びリアルタイムRT-PCR法で解析した（表4）．精巣のみに発現が認められたacrosin，PH-20，AKAP110（AKAP3），NYD-sp10の他，精巣に加えて膵臓にも発現が見られたSP-10とropporinについてはさらに各種の癌組織での発現を解析した．その結果，PH-20は癌にはまったく発現していなかったが，他の精子タンパク，特にacrosin，AKAP110（AKAP3）は膀胱癌，肝癌，肺癌，大腸癌，腎癌，卵巣癌などに発現が見られ，これらはCT抗原性を有することが示された[21]．さらに，われわれはバイオインフォーマティクスに基づくデータマイニング法や，悪性黒色腫患者血清を用いたSEREX法により癌に発現する新たな精子タンパクを見いだしており，現在これらについてはさらに解析中である．

お　わ　り　に

われわれが同定したOY-TES-1はプロアクロシン結合タンパクsp32前駆体のヒトホモログであった．このOY-TES-1の他，複数の精子タンパクをコードする遺伝子が癌にも発現していることがわかった．すべての体細胞がほぼ完全な遺伝子のセットを持っていても，発現するのはその一部でしかないとされている．精子タンパクをコードする遺伝子が癌にも発現しているという事実は，がん化の過程と精子形成反応や胚形成反応がなんらかの関連を有していることを物語っている．いいかえると，癌の持つ異常な増殖能や機能が精子あるいは精巣にだけ発現する遺伝子の異常発現による可能性が考えられる．

癌の診断や癌免疫療法の標的分子として，最も有望と期待されているのはCT抗原である．精巣にはHLAクラスⅠの発現がなく，このため，T細胞による細胞傷害から逃れている．癌細胞にCT抗原が発現するとその断片がAPCを介してHLAクラスⅠに結

表3　精子タンパク

Antigens	Chromosome localization	Species	Function/characteristics
Proteins involved in sperm-egg interaction			
・SP-10	11	human	acrosomal antigen
・SP17	11	human, rabbit, mouse	zona pellucida (ZP) binding in vitro
Enzyme present in sperm			
・Acrosin	22	human, mouse	serine protease localized in sperm acrosome
・PH-20	7	human, guniea pig	hyaluronidase activity, sperm penetration of the layer of cumulus cells surrounding oocyte
Others			
・OY-TES-1/sp32	12p12-p13	human, mouse guniea pig, pig	proacrosin binding protein precursor
・AKAP110 (AKAP3)	12	human, mouse	A-kinase anchoring protein
・ASP	5	human	AKAP-associated protein
・Ropporin	3	human	AKAP-binding protein
・CS-1	2	human	cleavage signal protein
・SPAG9/HSS	17	human	sperm surface protein
・NYD-sp10/RFX4	12	human	regulatory factor
・SPAN-X/CTp11	Xq27.1	human	nuclear protein

表4　精子タンパクmRNAの正常組織での発現

	Genes										
Tissues	SP-10	SP17	Acrosin	PH-20	OY-TES-1/sp32	AKAP110	ASP	Ropporin	CS-1	SPAG9	NYD-sp10
Brain	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Heart	-	+	-	-	-	-	-	-	+	±	-
Kidney	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Lung	-	+	-	-	-	-	-	-	+	±	-
Pancreas	+	+	-	-	-	-	±	+	+	±	-
Placenta	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Skeletal muscle	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Colon	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ovary	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PBL	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Prostate	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Small intestine	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Spleen	-	+	-	-	-	-	±	-	+	±	-
Testis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thymus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

それぞれ遺伝子特異的プライマーを用いて30サイクルでRT-PCRを行った．PCR産物は通常のアガロースゲル電気泳動法，及びマイクロチップデバイスを用いたキャピラリー電気泳動法(Agilent 2100)で解析した．

合し，CTLに認識されると考えられる．OY-TES-1をはじめとする精子タンパク抗原やNY-ESO-1のような既存のCT抗原を組み合わせることでより効果的な癌ワクチンが可能となると考えられる．また，これらを使った抗原チップを作り，これを診断に応用することも考えられる．すなわち，個々の癌についてより正確にその癌の悪性度あるいは種々の性質を明らかにすることが出来るようになる．

謝 辞

岡山大学大学院医歯学総合研究科免疫学 中山睿一教授には終始変わらぬ御指導を頂き，お礼申し上げます．ラドウィック癌研究所 L. J. Old博士には暖かい御援助と御指導をいただき，感謝いたします．また，多くの貴重な検体を提供してくださった臨床教室の先生方にお礼申し上げます．免疫学教室の磯辺みどりさん，水内純子さんには，研究の手伝い，論文の作成に協力いただきました．お礼申し上げます．

文 献

1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science (1991) **254**, 1643−1647.

2) Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, et al : BAGE : a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. Immunity (1995) **2**, 167−175.

3) Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, et al : A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. J Exp Med (1995) **182**, 689−698.

4) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al : Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Proc Natl Acad Sci USA (1995) **92**, 11810−11813.

5) Gure AO, Tureci O, Sahin U, et al : SSX, a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. Int J Cancer (1997) **72**, 965−971.

6) Chen Y-T, Scanlan MJ, Sahin U, et al : A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc Natl Acad Sci USA (1997) **94**, 1914−1918.

7) Tureci O, Sahin U, Zwick C, et al : Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) **95**, 5211−5216.

8) Chen Y-T, Gure AO, Tsang S, et al : Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. Proc Natl Acad Sci USA (1998) **95**, 6919−6923.

9) Sahin U, Koslowski M, Tureci O, et al : Expression of cancer/testis genes in humam brain tumors. Clin Cancer Res (2000) **10**, 3916−3922.

10) Eichmuller S, Usener D, Dummer R, et al : Serological detection of cutaneous T cell lymphoma-associated antigens. Proc Natl Acad Sci USA (2001) **98**, 629−634.

11) Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, et al : Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. Cancer Lett (2000) **150**, 155−164.

12) Gure AO, Stockert E, Arden KC, et al : CT10 : A new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. Int J Cancer (2000) **85**, 726−732.

13) Zendman AJW, Cornelissen IMHA, Weidle UH, et al : CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens. Cancer Res (1999) **59**, 6223−6229.

14) Martelange V, De Smet C, De Palen E, et al : Identification on a humam sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. Cancer Res (2000) **60**, 3848−3855.

15) Ono T, Sato S, Kimura N, et al : Serological analysis of BALB/c methylcholanthrene sarcoma Meth A by SEREX. Identification of a cancer/testis antigen. Int J Cancer (2000) **88**, 845−851.

16) Ono T, Kurashige T, Harada N, et al : Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. Proc Natl Acad Sci USA (2001) **98**, 3282−3287.

17) Jager E, Nagata Y, Gnjatic S, et al : Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1 : Correlation of humoral and cellular immune responses. Proc Natl Acad Sci USA (2000) **97**, 4760−4765.

18) Valmori D, Dutoit V, Lienard D, et al : Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. Cancer Res (2000) **60**, 4499−4506.

19) Old LJ : Cancer/testis (CT) antigens-a new link between gametogenesis and cancer. Cancer Immunity (2001) **1**, 1.

20) Westbrook VA, Diekman AB, Naaby-Hansen S, et al : Differential nuclear localization of the cancer/testis-assciated protein, SPAN-X/CTp11, in transfected cells and in 50% of human spermatozoa. Biol Reprod (2001) **64**, 345−358.

21) Ono T and Nakayama E, in preparation.