

原 著

食道癌における MAGE gene family の発現

滋賀医科大学外科学第1講座, 久留米大学医学部免疫学講座*

藤田 益嗣 内藤 弘之 寺田 信國
小玉 正智 伊東 恭悟*

Melanoma antigen (MAGE) gene family は細胞障害性 T 細胞によって特異的に認識される腫瘍退縮抗原をコードする遺伝子ファミリーである。この MAGE を応用した癌特異免疫療法が将来有望視されている。同ファミリーは、正常組織では精巣・胎盤および創傷治癒過程の皮膚以外に発現がみられず、組織型の異なる各種癌において高頻度に発現している。臨床検体での MAGE 発現の検討は、乳癌・肺癌・胃癌についてのみ報告されている。そこで食道癌について、われわれは MAGE gene family の発現を手術症例を用いて検討を行った。食道癌15例中10例 (67%) に発現を認めた。MAGE を用いた癌免疫療法の対象として食道癌は有望であると考えられた。

Key words: melanoma antigen, esophageal cancer, reverse transcription-polymerase chain reaction

はじめに

腫瘍特有の蛋白は合成されるとその一部はペプチドのレベルにまで分解され、HLA class I 分子と結合し腫瘍細胞表面に提示される。この提示された抗原を細胞障害性 T 細胞が認識し腫瘍細胞を攻撃しえた場合、そのような抗原をコードする遺伝子は腫瘍退縮抗原遺伝子と呼ばれる。腫瘍退縮抗原遺伝子として melanoma antigen (MAGE) gene は1991年に van der Bruggen¹⁾によって報告された。その後の研究から、MAGE gene は MAGE-1から-12の12の遺伝子からなる multigene family を形成しており²⁾、メラノーマでは40%以上^{2,3)}、乳癌⁴⁾・肺癌⁵⁾・脳腫瘍⁶⁾・血液癌⁷⁾など腫瘍細胞で15から30%以上発現しているとされている。また、正常組織では精巣・胎盤・創傷治癒過程の皮膚以外での発現は報告されていない^{2,8)}。この MAGE gene family のコードするペプチドを使って腫瘍細胞特異的に反応する細胞障害性 T 細胞を誘導し患者の体内の腫瘍細胞を攻撃させる腫瘍特異的免疫療法が提案され注目を集めている⁹⁻¹¹⁾。MAGE gene family に関して、最近 MAGE-1から-12の塩基配列が報告され²⁾、X 染色体上での位置が報告されている^{2,12,13)}。しかし臨床例の検討は少なく、消化器癌臨床例での発現を検討した報告は、胃癌について8/

18 (44%) の発現をみたという報告だけである¹⁴⁾。

今回、われわれは食道癌手術症例につき、MAGE gene family の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (以下、RT-PCR) 法を用いて mRNA レベルで検討し報告する。

対象と方法

1) 対象

1991年7月から1994年11月の期間に当科にて外科的治療を行った食道癌のうち15例について検討した。検体は腫瘍組織および正常粘膜組織を採取した。採取は標本切除後直ちに行い、液体窒素中に冷凍保存した。

2) 方法

1. RNA 抽出

Total RNA は RNazol™ (Biotecx Lab. Inc. Texas, USA) を用いて抽出した。

2. cDNA の合成

cDNA は、蒸留水中に溶解した total RNA 5 μ g, 200 U SuperScript™ reverse transcriptase (BRL, Gaithersburg, MD), 5 \times H-RT buffer (BRL), 0.01M dithiothreitol, 0.5mM dNTP, random hexamer からなる20 μ l の反応系にて合成した。室温10分間の後 42°C 50分間 incubate し、90°C 5分間加熱後、水中急冷した。

3. PCR

作製した cDNA を用いて PCR を行った。cDNA 2 μ l, 0.1 μ g oligo-nucleotide primers, 0.025U Taq

DNA polymerase (Promega, WI, USA), PCR Buffer (Promega), 10mM MgCl₂, それぞれ200 μ M の dNTP からなる25 μ l の反応系を用い, thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) にて94°C 5分間加熱後, 増幅反応(94°C30秒間, 57°C30秒間, 72°C90秒間)を40サイクル行った. 最終伸長反応は72°C15分間行い生成した PCR 産物は電気泳動まで4°C保存とした.

MAGE gene 発現の対照として用いるため, 培養細胞株について MAGE mRNA の発現をあらかじめ検討した結果, MAGE mRNA の発現を認めた培養細胞株 K562および NALM-6を陽性の対照とし, MAGE gene の発現が陰性であった培養細胞株 NALM-1を陰性の対照とした. K562は慢性骨髄性白血病由来, NALM-6・NALM-1は急性リンパ性白血病由来の培養細胞株である.

さらに PCR のネガティブコントロールとして cDNA の代わりに蒸留水を反応系に加えたもので PCR 法を行った.

4. プライマー

MAGE gene family のエクソン2に sense primer: 5'-AGGAGCACCAAGGAGAAGATCT-3', エクソン3に anti-sense primer: 5'-TTGCAGTGCAGACTCCTCTG-3'を設定した (Fig. 1). このプライマーによってヒトに発現している MAGE gene family のうち MAGE-1, -2, -3, -4, -6を増幅することが可能である.

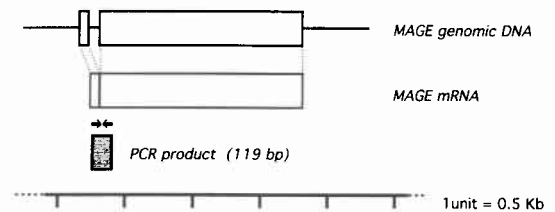
用いるプライマーをエクソン2とエクソン3のあいだの長さ75bpのイントロンを挟んで設定した. イントロンの部分は genomic DNA から mRNA に転写が行われる過程で編集され mRNA には存在しない. このため, RNA 抽出時に混入した genomic DNA 上の MAGE gene が PCR にて増幅されても, このイントロンの部分の長さだけ長いことから, mRNA から合成した cDNA からの増幅産物と区別をつけることができる.

また, 反応の対照として行った β actin を検出するプライマーは β actin のエクソン2に sense primer: 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3', エクソン3に anti-sense primer: 5'-TACATGGCTGGGGTGT-TGAA-3'を設定した.

5. 電気泳動

PCR 産物を2%アガロースゲル上で電気泳動し, Ethidium bromide にて染色し観察した.

Fig. 1 Structure of the amplified MAGE gene family. Exons are indicated as open box. Arrows represent the primers used to amplify MAGE gene family cDNA.



6. p53遺伝子産物の発現

同じ検体を用いて, 1次抗体として monoclonal antibody DO7 (Novocastra Lab. Ltd., UK) を用いた免疫組織化学染色 (SAB 法) を行った.

なお, 使用する臨床病理学的用語は食道癌取扱い規約¹⁵⁾に準じ, 統計学的検討は χ^2 検定を用い危険率5%未満を有意と判定した.

結果

食道癌手術症例より採取した腫瘍より RNA を抽出し cDNA を合成して PCR (RT-PCR 法) を行い, 食道癌15例中10例 (66.7%) の腫瘍組織に MAGE gene family の発現を認めた (Fig. 2). 図中の電気泳動において119bpの位置のバンドが mRNA に由来する PCR 増幅産物の存在すなわち MAGE gene family の発現を示している. 194bpのバンドは RNA 抽出時に混入した genomic DNA が PCR によって増幅されていることを示している. 症例#1, #2, #3, #4, #7, #11, #12, #13, #14, #15において MAGE gene family の発現を認めた.

正常粘膜組織に MAGE gene family の発現は認めなかった (Fig. 3).

同時に行った β actin では腫瘍組織・正常粘膜組織ともにネガティブコントロール (H₂O) 以外全例で増幅を認めた.

今回検討を行った15症例を表に示す (Table 1). 症例の内訳では進行癌が比較的多かった. Squamous cell carcinoma 13例, basaloid carcinoma 1例, adenocarcinoma 1例のうち, Squamous cell carcinoma の低分化型に MAGE gene family の発現が少ない傾向があった. 部位, リンパ管浸潤, 静脈浸潤, リンパ節転移, 予後とは統計学的に有意な関連がなかった. また, 同時に検討した p53遺伝子産物の発現と統計学的に有意な関連がなかった.

Fig. 2 Expression of MAGE gene family by human esophageal cancerous tissues and control cell lines detected by reverse transcription-PCR amplification.

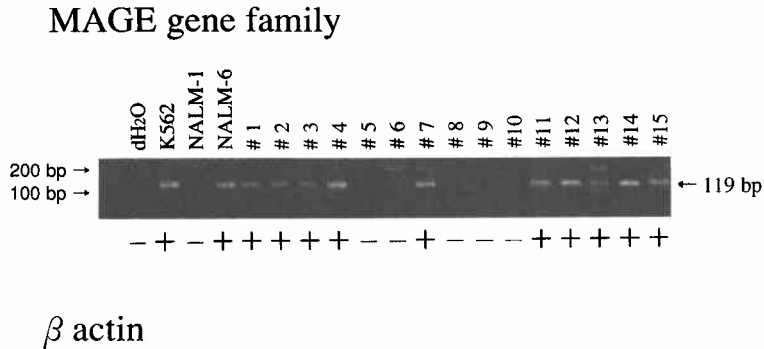
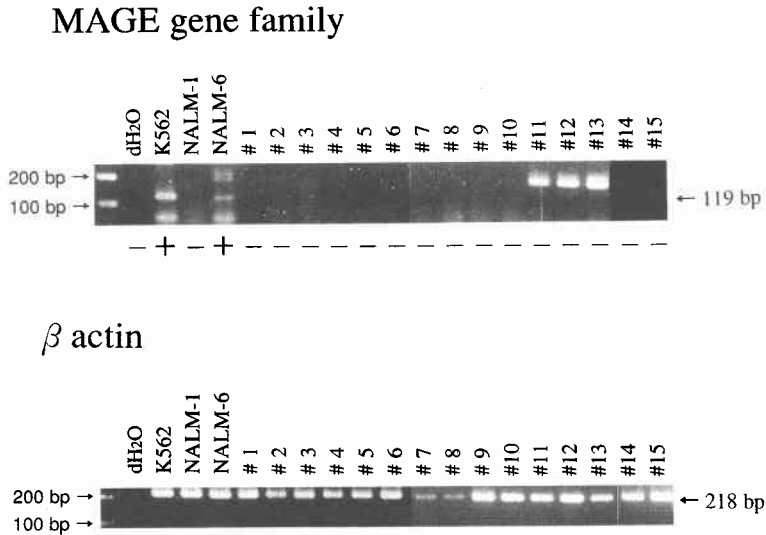


Fig. 3 Expression of MAGE gene family by human normal esophageal tissue samples and control cell lines detected by reverse transcription-PCR amplification.



考 察

腫瘍特有の蛋白を細胞傷害性 T 細胞が認識した場合、その腫瘍は細胞性免疫系からの攻撃を受け退縮する。そのような抗原をコードする遺伝子は腫瘍退縮抗原遺伝子と呼ばれる。van der Bruggen をはじめとする Boon らの研究グループによって1991年にはじめてこの1つが同定された¹⁾。メラノーマを用いて同定さ

れたことからメラノーマ抗原遺伝子 (melanoma antigen gene : MAGE gene) と名付けられたが、メラノーマに限らず組織型が異なる種々の臓器の腫瘍に発現していることから、さまざまな腫瘍に対する MAGE を用いた腫瘍特異免疫療法の可能性が現在検討されはじめている¹⁰⁾¹¹⁾。

今回われわれは MAGE gene family の発現を RT-

Table 1 Clinicopathological analysis and expression of MAGE gene family in esophageal cancer

case	age	sex	location	histology	depth of invasion	ly	v	n	location of recurrence	post op. survival time(months)	p53 expression	MAGE expression
#1	61	M	EaEi	well	a2	1	1	2	—	10/alive	++	+
#2	68	M	Ce	mod	a2	1	1		—	11.1/alive	+	+
#3	72	M	EaEi	mod	a2	2	2	1	Liver, LN*	9.4/alive	++	+
#4	71	M	ImIu	well	mp	1	1	2	LN*	39.7/dead	+	+
#5	65	M	Im	por	a2	2	0	2	—	26.9/alive	—	—
#6	61	M	ImIu	por	a1	2	0	0	MDST	17.4/dead	++	—
#7	65	M	IuIm	BSC	sm	1	1	0	LN**, liver	13.8/alive	+	+
#8	69	M	EaEi	mod	a3	3	0	2	—	12.2/dead	++	—
#9	68	M	ImIu	mod	a2	2	0	4	—	21.8/alive	—	—
#10	57	M	Im	well	a3	2	1	0	—	2.0/alive	++	—
#11	58	M	ImEi	mod	a3	2	0	3	—	1.0/alive	—	+
#12	62	M	Ei	por	a1	2	1	2	MDST, liver	20.8/dead	++	+
#13	37	W	Im	mod	a1	1	1	2	LN**	2.9/alive	+	+
#14	66	M	ImEi	por	a2	1	1	4	—	3.0/alive	—	+
#15	75	M	Ea	MDA	a2	2	0	2	—	2.0/alive	+	+

ly; lymphatic invasion, v; blood vessel invasion, n; degree of lymph node metastasis, well; well differentiated squamous cell carcinoma, mod; moderately differentiated squamous cell carcinoma, por; poorly differentiated squamous cell carcinoma, BSC; basaloid-(squamous) carcinoma, MDA; moderately differentiated adenocarcinoma
LN*; cervical lymph nodes, LN**; thoracic paraesophageal lymph nodes, MDST; mediastinum

PCR法を用いた mRNA レベルで検討した。RT-PCR法では genomic DNA の混入が偽陽性的原因となる。われわれはイントロンを挟んでプライマーを設計し、組織から抽出する際に混入した genomic DNA 由来の PCR 産物を大きさから識別して、偽陽性を生じないようにした。また、Fig. 2 の電気泳動において 119bp と 194bp との間に生じているバンドは genomic DNA 由来の PCR 非特異的産物と考えられる。腫瘍組織・正常粘膜組織ともにネガティブコントロール (H₂O) 以外全例で β actin で増幅を認めたことは、RNA 抽出・cDNA 合成の過程に問題がなかったことを示している。さらに、PCR 法において問題となる環境中からの混入物による偽陽性¹⁶⁾¹⁷⁾を検出するため検体と同時に PCR を行ったネガティブコントロール (蒸留水) は MAGE・ β actin とともに陰性であり、実験環境中からの混入物がなかったことを示している。

われわれの今回の検討から食道癌において約 66.7% の症例に MAGE gene family の発現があることがわかった。臨床例をもちいた消化器癌の検討では胃癌¹⁴⁾に続き、われわれは食道癌においても高い発現率を有することを証明し、食道癌が MAGE をもちいた腫瘍特異免疫療法の対象となりうることを示すことができた。

MAGE gene が発現している細胞において、MAGE

gene がコードする蛋白はプロテアーゼにてペプチドレベルに切断され HLA class I 分子と結合し細胞膜表面に提示される。この HLA class I 分子上に提示された MAGE 蛋白由来のペプチドが T 細胞レセプターによって認識され、細胞障害性 T 細胞の誘導が行われる。しかし、すべての MAGE 蛋白由来のペプチドがすべての型の HLA class I 分子と結合し細胞障害性 T 細胞を誘導できるわけではない。例えば MAGE-3 発現細胞の場合、MAGE 蛋白が切断されて生じたペプチドのうち FLWGPRLV という 9 つのアミノ酸からなるペプチドが HLA class I 分子のうち A2 と結合し細胞障害性 T 細胞を誘導することが報告されている¹⁸⁾。

腫瘍に対する MAGE をもちいた治療では、まず患者 HLA class I の型をあらかじめ調べておき、今回われわれが報告した RT-PCR 法をつかって手術切除された腫瘍組織における MAGE gene の発現を検査する。検査の結果、MAGE 蛋白が腫瘍に発現しかつ HLA class I の型が細胞障害性 T 細胞を誘導しうる組み合わせであるなら、生体内で自然に誘導される細胞障害性 T 細胞だけでは排除できず発育・進展した腫瘍と考えることができ、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞を人工的に強く誘導し生体の局所における effector/tumor 比を高めてやる治療を行う。しかし、MAGE を

使って実際の治療を行うためには、実際の生体に免疫を行う方法¹⁾や腫瘍細胞において観察される HLA class I 抗原の発現の低下¹⁹⁾など、いくつか存在する問題を解決してゆく必要がある。

MAGE gene family の発現と臨床病理学的因子および予後との有意な相関は今回の検討では認めなかった (Table 1)。しかし15例と検討した症例数が個々の因子について検討するには少なすぎることから症例数を増やしてさらに検討を行う必要がある。

さらに今回、MAGE gene family の発現とともに p53 蛋白発現を検討した (Table 1)。p53 蛋白は細胞周期の調節や DNA の修復にかかわり²⁰⁾、p53 蛋白の異常発現の臨床的意義については、生物学的悪性度の指標になると考えられている²¹⁾。一方、MAGE gene のコードする蛋白の生体内での機能はいまだ不明であり、MAGE の発現を示す正常細胞がいずれも細胞増殖の盛んなところであることから MAGE gene の役割と細胞増殖との関連が予想されている⁸⁾。細胞周期にかかわって MAGE 発現と p53 蛋白異常発現とのあいだに関連があるのではとわれわれは考え、今回の検討を行った。しかし結果として、両者が相関しない傾向を示す成績が得られた。症例数を増やしさらに検討を行う必要がある。

今回の検討で、食道癌においては従来の集学的な治療に加えて、MAGE gene family により得た特異的抗腫瘍細胞障害性 T 細胞を使った治療が比較的高い割合の症例で行える可能性が示唆された。MAGE gene を同定するために用いられた分子生物学的手法により新たな腫瘍退縮抗原遺伝子として最近チロシナーゼ²²⁾、MART-1^{24)~26)}や Pmel17/gp100^{27)~29)}が見つかり、今後 MAGE だけでなく腫瘍特異的免疫療法の研究がますます発展すると考えられる³⁰⁾。より有効な治療法のために MAGE の生物学的検討をさらに詳細に行い、腫瘍特異的免疫療法の実現につなげていきたい。

なお本研究の一部は文部省科学研究費 (06454382) によった。

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* 254: 1643-1647, 1991

2) De Plaen E, Arden K, Traversari C et al: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40: 360-369, 1994

3) Coulie P, Weynants P, Lehmann F et al: Genes coding for antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes. *J Immunother* 14: 104-109, 1993

4) Brasseur F, Marchand M, Vanwijck R et al: Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors. *Int J Cancer* 52: 839-841, 1992

5) Weynants P, Lethe B, Brasseur F et al: Expression of MAGE genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56: 826-829, 1994

6) Rimoldi D, Romero P, Carrel S: The human melanoma antigen-encoding gene, MAGE-1, is expressed by other tumor cells of neuroectodermal origin such as glioblastomas and neuroblastomas. *Int J Cancer* 54: 527-528, 1993

7) Chambost H, Brasseur F, Coulie P et al: A tumour-associated antigen expression in human haematological malignancies. *Br J Haematol* 84: 524-526, 1993

8) Becker JC, Gillitzer R, Brocker EB: A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 58: 346-348, 1994

9) Boon T: Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int J Cancer* 54: 177-180, 1993

10) Boon T, Cerottini JC, van den Eynde B et al: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337-365, 1994

11) Boon T, Coulie P, Marchand M et al: Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy. Edited by DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Important advances in oncology*. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, p53-69

12) Oaks MK, Hanson JJ, O'Malley DP: Molecular cytogenetic mapping of the human melanoma antigen (MAGE) gene family to chromosome region Xq27-qter: implications for MAGE immunotherapy. *Cancer Res* 54: 1627-1629, 1994

13) Wang MG, Zakut R, Yi H et al: Localization of the MAGE1 gene encoding a human melanoma antigen to chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 67: 116-119, 1994

14) Inoue H, Li J, Honda M et al: Expression of MAGE-1,-2,-3 mRNA in gastric carcinoma. *Med Sci Res* 22: 793-794, 1994

15) 食道疾患研究会編: 臨床・病理. 食道癌取扱い規約. 改訂第8版. 金原出版, 東京, 1992

- 16) Kinoshita T, Imamura J, Nagai H et al: Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain. *Anal Biochem* 206 : 231—235, 1992
- 17) 木下朝博, 下遠野邦忠: PCR 法による RNA の解析. *蛋・核・酵* 35 : 2992—3002, 1990
- 18) van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T et al: A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol* 24 : 3038—3043, 1995
- 19) 軍司祥雄, 落合武徳, 磯野可一: 腫瘍の MHC 発現と腫瘍免疫. *臨免疫* 26 : 133—140, 1994
- 20) Smith ML, Chun IT, Zhan Q et al: Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266 : 1376—1380, 1994
- 21) 内藤弘之, 川口 晃, 柴田純祐ほか: 食道癌における DNA ploidy pattern と p53 蛋白の発現. *癌と治療* 22 : 110—114, 1995
- 22) Brichard V, Van Pel A, Wolfel T et al: The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178 : 489—495, 1993
- 23) Robbins PF, El-Gamil M, Kawakami Y et al: Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy. *Cancer Res* 54 : 3124—3126, 1994
- 24) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH et al: Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 3515—3519, 1994
- 25) Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K et al: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180 : 347—352, 1994
- 26) Cole DJ, Weil DP, Shamamian P et al: Identification of MART-1-specific T-cell receptors: T cells utilizing distinct T-cell receptor variable and joining regions recognize the same tumor epitope. *Cancer Res* 54 : 5265—5268, 1994
- 27) Cox AL, Skipper J, Chen Y et al: Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264 : 716—719, 1994
- 28) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH et al: Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 6458—6462, 1994
- 29) Adema GJ, de Boer AJ, Vogel AM et al: Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem* 269 : 20126—20133, 1994
- 30) Houghton AN: Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 180 : 1—4, 1994

Expression of MAGE Gene Family in Esophageal Cancer

Masutsugu Fujita, Hiroyuki Naitoh, Nobukuni Terata,
Masashi Kodama and Kyogo Itoh*

First Department of Surgery, School of Medicine, Shiga University of Medical Science

*Department of Immunology, Kurume University, School of Medicine

MAGE (melanoma antigen) gene family, including MAGE-1, -2, -3, -4 and -6 genes that encode the human tumor-rejection antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes, preferentially is expressed on many tumor cell lines as well as fresh tumor cells of various organs such as breast carcinoma, lung carcinoma, and gastric carcinoma, but is not expressed on a panel of normal tissues except testis, placenta, and skin during wound healing. We tested 15 surgical specimens of esophageal carcinomas and observed MAGE gene expression at the mRNA level in 10 out of 15 cases (67%). The results suggest that MAGE antigens are an appropriate target molecule for specific immunotherapy in substantial proportions of patients with esophageal cancer.

Reprint requests: Masutsugu Fujita First Department of Surgery, School of Medicine, Shiga University of Medical Science
Tsukinowa-cho, Seta, Otsu, 520-21 JAPAN