

## 慶應義塾大学学術情報リポジトリ

## Keio Associated Repository of Academic resources

Title	膀胱癌患者血清中のIgG抗体が認識する新しい膀胱癌抗原の同定
Sub Title	
Author	伊藤, 敬一(Ito, Keiichi) 村井, 勝(Murai, Masaru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T271- T287
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0271">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0271</a>

学位論文

膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する  
新しい膀胱癌抗原の同定

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

伊 藤 敬 一

(平成 16 年 3 月 25 日受付)

Key Words : SEREX, bladder cancer antigen, liponic acid synthetase, kelch-like protein,  
tumor reactive T cell

癌治療において有効な免疫治療を確立することは 1 つの重要なテーマである。生体内の免疫系による腫瘍の拒絶には細胞性免疫が重要であり、多くの場合 CD8+ 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes ; CTL) が腫瘍細胞を排除する役割を担っていることが分かってきた<sup>1-3)</sup>。このため悪性腫瘍に対する有効な免疫治療を確立するために、CD8+T 細胞に認識される腫瘍抗原の同定が試みられてきた。CD8+T 細胞が認識するヒト腫瘍抗原はメラノーマを中心に同定され、gp100<sup>4)</sup> や MART-1<sup>5)</sup> などの組織特異抗原、MAGE ファミリー<sup>6)</sup> などの癌精巢抗原、 $\beta$ -カテニン<sup>7)</sup> や MART-2<sup>8)</sup> などの癌特異的変異抗原などが腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法により同定された。これらの抗原の一部は、細胞免疫治療の臨床試験においてすでに適応され、腫瘍の縮小も報告されている<sup>1, 9)</sup>。

腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法は有効な方法であるが、腫瘍反応性 T 細胞株や腫瘍細胞株を樹立しにくい癌腫においては適用が難しい。このような背景から Sahin らは腫瘍組織から作成した cDNA ライブラリーを癌患者血清でスクリーニングする SEREX (serological identification of recombinant cDNA expression cloning) 法を報告した<sup>10)</sup>。SEREX 法には腫瘍細胞や腫瘍反応性 T 細胞の細胞株化を必要とせず、どのような癌腫においても適用できるという利

点がある。また SEREX 法は患者血清中の IgG が反応する抗原を単離するため、ヘルパー CD4+T 細胞がその抗原を認識していることが示唆されるが、Pfreundschuh や Old らのグループによる多くの検討の結果、SEREX 法で単離される抗原の中には MAGE ファミリーや tyrosinase など含まれることがわかり、CD8+T 細胞に認識される抗原を単離する方法としても有用であることがわかってきた<sup>10, 11)</sup>。

本研究は進行性膀胱癌に対する免疫治療に応用しうる癌抗原の同定を目的とした。進行性膀胱癌の治療は、他の転移性腫瘍の治療と同様に困難である。治療として多剤併用化学療法<sup>12)</sup>が行われる場合が多いが、治癒にいたることは少なく新しい治療法の開発が待たれる。進行性膀胱癌に対する治療として、免疫治療は可能性を秘めている。進行癌に進展する可能性がある異型度の高い表在性膀胱癌や carcinoma *in situ* を随伴する表在性膀胱癌に対して、*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) の膀胱内注入療法は最も有効な治療法とされており<sup>13)</sup>、その抗腫瘍効果の機序として、膀胱局所の免疫反応が関連していることが示唆されている<sup>14-16)</sup>。また腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうる癌抗原の中で、癌精巢抗原に分類される MAGE ファミリーや NY-ESO-1 などが膀胱癌に発現することが報告されている<sup>17-19)</sup>。我々の教室においても、HLA-A24 拘束性 MAGE-3 ペプチドで刺激した自己樹

本論文は Ito K, Fujita T, Akada M, Kiniwa Y, Tsukamoto M, Yamamoto A, Matsuzaki Y, Matsushita M, Asano T, Nakashima J, Tachibana M, Hayakawa M, Ikeda H, Murai M, Kawakami Y. Identification of bladder cancer antigens recognized by IgG antibodies of a patient with metastatic bladder cancer. *Int J Cancer* 108 (5) : 712-724, 2004 の一部を含む。

状細胞を用いることにより、進行膀胱癌症例において転移巣の縮小を認めている<sup>20)</sup>。これらの所見から免疫治療は進行性膀胱癌に対しても有効である可能性がある。

膀胱癌における細胞免疫治療を確立するためには、膀胱癌抗原の同定と腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうるエピトープの決定が必要である。しかし膀胱癌では、癌精巢抗原である MAGE-1, -2, -3, -12 や NY-ESO-1 などの発現が報告されているにとどまり<sup>17, 18, 19)</sup>、腫瘍反応性 T 細胞に認識されうる膀胱癌抗原の報告は少ない。比較的最近、膀胱癌において KIAA0205 という新規遺伝子の塩基配列に変異を生じ、変化したアミノ酸配列がエピトープになり HLA-B\*4403 拘束性に CD8+ T 細胞に認識されたという報告がなされた<sup>21)</sup>。しかし他の 60 例の膀胱癌組織で検討したところ、同様の遺伝子の変異は認められず診断や治療に応用しうる膀胱癌抗原とはならないと考えられた。現時点では細胞免疫治療に使用しうる膀胱癌抗原は非常に少ないといえる。

このような背景から、本研究では SEREX 法を用いて膀胱癌に対する免疫治療に応用しうる癌抗原を同定することを目的とした。膀胱癌抗原として KU-BL-1 と KU-BL-2 を同定した<sup>22)</sup>。これらの分子のアミノ酸配列をもとに機能的な推察を加えらるとともに、2 分子に由来する HLA-A24 高親和性ペプチドが腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうるかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株と組織

ヒト膀胱移行上皮癌 (transitional cell carcinoma : TCC) 細胞株である FY<sup>20)</sup>, KU1, KU7, KU19-19, NBT-2, T-24 は RPMI1640 (10% fetal bovine serum ; FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) で培養した。FY および KU-19-19 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade 3) の転移巣から樹立された細胞株であった。NBT-2 と T24 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade 3) の原発巣から樹立された細胞株であった。KU1 と KU7 は膀胱癌 (それぞれ grade 2 と grade 1) の原発巣から樹立されたものであった。

11 種類のヒトメラノーマ細胞株、4 種類のヒト肺癌細胞株、7 種類のヒト大腸癌細胞株、4 種類のヒト白血病細胞株、4 種類のヒト腎細胞癌細胞株、2 種類のヒト乳癌細胞株、2 種類のヒト前立腺癌細胞株、2 種類のヒトグリオーマ細胞株、2 種類のヒト食道癌細胞株、3 種類のヒト膵癌細胞株、腫瘍浸潤性 T 細胞株 (TIL), EB virus transformed B 細胞株、皮膚線維芽細胞株を

RNA の抽出に用いた。正常膀胱粘膜組織、膀胱癌組織、腎細胞癌組織は手術検体から採取し、使用するまで -80 °C で保存した。

### 2. 膀胱癌由来 FY 細胞からの cDNA ライブラリーの作成

症例は 76 歳の女性。筋層浸潤を伴う膀胱癌の診断で膀胱全摘除術を施行した。原発巣の組織診断は筋層浸潤を伴う非乳頭状移行上皮癌 (grade 3, pT3) であり、術後 5 カ月目に右鼠径リンパ節、傍大動脈リンパ節の腫脹を認めた。鼠径部の生検を行い組織診断は移行上皮癌 (grade 3) であった。膀胱癌細胞株 FY はこの鼠径リンパ節転移から樹立された<sup>20)</sup>。この FY 細胞からグアニジン塩化セシウム超遠心法を用いて total RNA を抽出した。Poly (A)<sup>+</sup> RNA は Oligotex-dT30 super (TAKARA, Kyoto, Japan) で 2 回処理を行い純化した。cDNA ライブラリーの作成には Poly (A)<sup>+</sup> RNA 5 µg を使用した。First-strand の合成は oligo (dT) プライマーを用いて行った。cDNA 断片はバクテリオファージ発現ベクター (ZAP express, Stratagene, La Jolla, CA) に封入し、*E. coli* に感染させ  $2.3 \times 10^6$  個のリコンビナントを有する cDNA ライブラリーを作成した。

### 3. cDNA ライブラリーの発現クローニング

作成した cDNA ライブラリーを用いて、寒天培地 (15 cm プレート) 上に約  $1.0 \times 10^4$  個のプラークを発現させ、その上にニトロセルロースメンブレン (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) を置いた。Isopropyl-thio-galactoside を用いてリコンビナントタンパクを発現させた。*E. coli* とラムダファージに対する血清中の抗体を吸収し偽陽性反応を最小限にするために、*E. coli* 細胞ライセートとインサートのないバクテリオファージ発現タンパクを用い血清を処理した。スクリーニングには 100 倍に希釈した患者血清を用いた。TBS-T (0.05% Tween 20) 溶液でメンブレンを 3 回洗浄し、1 : 4000 の 2 次抗体 (alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman Fc antibodies ; Cappel, Aurora, Ohio) を使用した。陽性のプラークは 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (SIGMA, St. Louis, MO) と nitroblue tetrazolium (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた発色反応で判定した。陽性のプラークはもとの寒天培地から分離した。単離したクローンの cDNA インサートは、T3 primer (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG) と T7 primer (5'-GTAATACGACTCACTATAGGC) を用いて

行った PCR 産物を用いて塩基配列を決定するか、pBK CMV プラスミドに変換した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を用い ABI Prism 310 genetic analyzer (PE Biosystems, Branchburg, NJ) で行った。決定されたインサートの塩基配列は NCBI の遺伝子データベースである BLAST プログラムを用いて解析した。

#### 4. 単離抗原に対する血清中の IgG 抗体の存在の検討

単離したそれぞれの抗原に対する IgG 抗体の存在を、癌患者や健康人の血清を用いて検討した。イムノスクリーニングと同様の手法を用いた。陽性ファージクローンとインサートを持たないファージ (negative control) を 1:1 の割合で混合することにより、陽性反応のある血清を識別した。

#### 5. RT-PCR およびノーザンブロット

Total RNA はグアニジン塩化セシウム超遠心法で細胞株や組織から抽出した。正常組織の RNA は正常膀胱組織をのぞいて Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から購入した。正常膀胱粘膜は手術試体を使用した。逆転写反応は Super Script II 逆転写酵素 (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いた。PCR は至適なアニーリング温度で Ex-Taq DNA polymerase (TAKARA) を用いて行った。検討する各遺伝子に特異的なプライマーは塩基配列が確定した cDNA インサートの配列が増幅されるように設定した。KU-BL-1 の primer は 5'-GGAAATGTCTCTACGCTGCG (sense primer) と 5'-AACATGATCGTGGCTGTGGC (anti-sense primer), KU-BL-2 の primer は 5'-GGTGGAGAAGAGCAGCAAGAAG (sense primer) および 5'-GGT CCTCTGGAGACAGTAGATG (antisense primer) を使用した。

またノーザンブロットを行うために正常組織の Poly (A)+RNA (2 µg/lane) がブロッティングされているナイロンメンブレン (Human Multiple Northern Blot, Clontech) を使用した。その他の組織や細胞株の RNA に関しては 20 µg の total RNA を各レーンに使用し、アガロース (1.0% ホルムアルデヒド) 上で電気泳動を行いナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham) にタンパクを転写した。目的の遺伝子を増幅した PCR 産物を用い、High Prime DNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH) を用いて<sup>32</sup>P で標識したプローブを作成した。Quick Hyb 溶液 (Stratagene) を用い、プ

レハイブリダイゼーション (68°C, 20 分間) およびハイブリダイゼーション (68°C, 2 時間) を行った。シグナルは Molecular Imager Fx (BIO RAD, Hercules, CA) で検出した。コントロールにはβ-actin cDNA プローブ (Clontech) を用いた。

#### 6. 定量的 PCR

正常組織と癌組織における B2 の発現レベルを検討するために Taqman real-time PCR を行った。センスプライマー (5'TCAAGGAGATGACAGACGTGC), アンチセンスプライマー (5'-GACCCAGGACTTTGGTTTCGA), プローブ (5'(FAM) CAAAGTGGTGAAGGAGGTGG CCAA-(TAMRA)) を用いた。データの検討は ABI Prism 7700 Sequence Detector System (PE Biosystems) を用いて行った。

#### 7. 5'-RACE

5'末端の塩基配列を決定するために Marathon TM cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて 5'-RACE を行った。FY 細胞から抽出した 1 µg の poly (A)<sup>+</sup> RNA を oligo (dT) プライマーと AMV 逆転写酵素を用い反応を行った。Second strand の合成は、E. coli DNA polymerase I, RNase H を用いた。T4 DNA polymerase を用いて 2 本鎖 DNA の末端を平坦化し、T4 DNA ligase を用いて Marathon cDNA adapter 1 と結合した。この cDNA を Marathon cDNA adapter 1 と KU-BL-1 特異的プライマー (5'-TCGTGGCTGTG GCGGTGGCATATTCTCC) を用い PCR を行った。さらに adapter primer 2 と KU-BL-1 特異的プライマー (5'-GGCATATTCTCCACCTCCCCAACACTC) を用いた二次 PCR を 20 サイクル行った。pGEM-T (Promega Inc., Madison, WI) に挿入し塩基配列を決定した。

#### 8. HLA-A24 高親和性合成ペプチドを用いた CTL の誘導

樹状細胞 (DC) の誘導は過去に報告された方法に従った<sup>23)</sup>。末梢血単核球 (PBMC) は Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway) を用いて健康人から分離した。PBMC を表面処理プレート (Primaria, Falcon, Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上で 30 分間培養し、浮遊細胞は凍結保存した。付着細胞は RPMI1640 (10% FCS) で翌朝まで培養した。付着細胞は RPMI1640 (10% FCS) に GM-CSF (50 ng/ml) と IL-4 (50 ng/ml) を加え 7 日間培養した。成

第2表 SEREX法で単離された未知分子。  
(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Table II を許可を得て転載)

クローン名	単離されたクローンの数	同定された遺伝子	Unigene	染色体
B1	2	Putative lipoic acid synthetase	Hs.53531	6p21.3
B3	8	Hypothetical protein	Hs.26481	7p21.3
B4	7	KIAA0603	Hs.173802	13q21.33
B15	2	KIAA0782	Hs.21264	11q13.3
B19	1	EST	Hs.288897	2q36.1
B22	1	EST	Hs.173259	6q25.3
B31	1	EST	Hs.21486	2p11.2
B33	1	EST	-	
B34	1	EST	-	
B36	1	Hypothetical protein	-	6
B39	1	EST	-	
B44	1	Hypothetical protein	Hs.8836	22q13.2

討した。HLA-A24 が導入された T2 細胞 (T2-A24) をペプチド抗原特異的 T 細胞誘導のポジティブコントロールとした。

#### 9. 統計学的解析

各群間の比較は Unpaired *t*-test を用いて検討し、 $p < 0.05$  を統計学的有意とした。

### 結 果

#### 1. 膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原の単離

FY 細胞から作成した cDNA ライブラリーを同一人の血清を用いてスクリーニングした。合計  $1.2 \times 10^6$  個のファージクローンをスクリーニングし、78 個の陽性クローンを単離した。78 個のクローンは 48 の異なった分子に分けられ (B1-B48)、36 の既知の分子 (第 1 表) と 12 の未知の分子に分けられた (第 2 表)。12 の未知分子のうち 8 分子は部分的な塩基配列が GenBank データベース上に登録されている Unigene cluster と一致した。High density lipoprotein binding protein (HDLBP)<sup>20</sup> (B13)、negative cofactor 2  $\alpha$ -subunit (B16)、pinch protein (B48)、B1、B3、B4、B15 の 7 つの分子は 2 回以上単離された。このうち HDLBP、B3、B4 が最も多く単離された。

膀胱癌の診断や治療に応用しうる抗原を見つけるために、既知分子では以前に癌との関連性が示唆されているもの、未知の分子に関しては完全に新規であるか、

DNA database で一致する cDNA 断片の由来組織が癌や限られた正常組織に限定されるものを選別した。36 の既知分子の中で、9 分子が癌との関連性が過去に報告されていた (B5、B6、B7、B8、B9、B12、B14、B27、B37)。未知分子では database 上で一致する cDNA 断片の由来組織を検討し、癌で高発現している可能性のあるものを選択した。例えば、B1 の一致する Unigene cluster (Hs.53531) は癌組織 (神経芽腫、網膜芽腫、胚細胞腫瘍、メラノーマ、リンパ腫、メラノーマ) などや、良性腫瘍 (膀胱移行上皮乳頭腫) や限られた正常組織 (胎児心臓、胎盤、メラノサイト) であった。この結果から、B1 は癌細胞と限られた正常組織のみに発現する可能性があると考えられる。また B3 の一致する Unigene cluster (Hs.26481) は癌組織 (神経芽腫、肺癌、メラノーマ、皮膚扁平上皮癌、腎癌、胚細胞腫瘍)、限られた正常組織 (胎児心臓、精巣、妊娠時の子宮、メラノサイト) などであった。多くの正常組織に発現し癌組織に対して発現の差がないと予想される分子は除外し、36 分子を免疫原性の有無を評価する分子として選択した。

#### 2. 単離抗原に対する健常人および癌患者血清中の IgG 抗体の存在

選別された 36 分子に対して IgG 抗体が健常人の血清中に存在するかを 16 例に対して行った。36 抗原中 24 抗原は、健常人血清 16 例中に抗体が存在しないか、1 例にのみ抗体が存在した (第 3 表)。これらの 24 抗原に対して、膀胱癌患者血清 28 例の検討を行った。24

熟 DC を誘導するために、抗 CD40 モノクローナル抗体 (500 ng/ml), IFN- $\gamma$  (500 IU/ml), LPS (0.4 ng/ml) で 5 日目に刺激を加えた。

KU-BL-1 と KU-BL-2 のアミノ酸配列上で HLA-A24 高親和性ペプチドを BIMAS プログラムを用いて検討した。それぞれ 2 つずつ HLA-A24 高親和性のペプチドを選択した (KU-BL-1<sub>89-97</sub> : NYNKLKNTL, KU-BL-1<sub>352-360</sub> : SYKAGEFFL, KU-BL-2<sub>338-346</sub> : VYILGGSQL, KU-BL-2<sub>207-215</sub> : VYDAAVRML)。これらのペプチドは Fmoc 法で合成し、逆相カラムを用いた高速液体クロ

マトグラフィーにより精製し、質量分析にて確認を行った。CTL の誘導は、 $2 \times 10^6$  個の同一人の PBMC 中の浮遊細胞を、20  $\mu$ g/ml のペプチドで刺激した  $5 \times 10^5$  個の DC と Iscove's DMEM (10% human serum) 中で共培養した。共培養 3 日目に 50 IU/ml に IL-2 (Shionogi, Osaka, Japan) を加えた。培養 7 日目にペプチドで刺激した  $2 \times 10^6$  個の自己 PBMC を放射線照射後に加え刺激を行い、さらに 10 日目と 12 日目に IL-2 を加えた。同様の刺激を 2 回行い最後の刺激から 7 日目に抗原特異的応答を IFN- $\gamma$  release assay を用いて検

第 1 表 SEREX 法で単離された既知分子  
(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Table I を許可を得て転載)

クローン名	単離されたクローン数	同定された分子	染色体
B2	1	Transcription factor tat-CT1	19q13
B5	1	Golgin-84	14q
B6	1	-enolase	1p36.3-p36.2
B7	1	Laminin receptor 1	3p21.3
B8	1	Mitotin	1q32-q41
B9	1	PM5 protein	16p13.11
B10	1	EBNA-2 coactivator	7q31.3
B11	1	Hsp70-1	6p21.3
B12	1	-actinin 4	19q13
B13	8	High-density lipoprotein binding protein	2q37
B14	1	Lbc protooncogene	15q24-q25
B16	2	Negative cofactor 2 subunit	11q13.3
B17	1	Nitric oxide synthase 3	7q36
B18	1	Kinectin 1	14q22.1
B20	1	STE20-like kinase	12q24.2
B21	1	Follistatin-related protein	3q13.33
B23	1	Tyrosyl-tRNA synthetase	1p34.3
B24	1	Initiation factor 4B	12q12
B25	1	Elongation factor-1	6q14.1
B26	1	Translation factor CA150	5q31
B27	1	Thrombospondin 1	15q15
B28	1	Translocon-associated protein	Xq28
B29	1	C-terminal binding protein 2	10q26.13
B30	1	Protective protein for -galactosidase	20q13.1
B32	1	Lens epithelium-derived growth factor	9p22.1
B35	1	Histone macro H2A1.2	5q31.3-q32
B37	1	Annexin VIII	10q11.2
B38	1	Ribosomal protein L28	19q13.4
B40	1	Pyruvate dehydrogenase- subunit	Xp22.2-p22.1
B41	1	Ribosomal protein L19	17q11.2-q12
B42	1	Ribosomal protein L37a	2
B43	1	Ribosomal protein S6	9p21
B45	1	Succinate dehydrogenase complex subunit A	5p15
B46	1	Protein tyrosine phosphatase receptor type U	1p35.3-p35.1
B47	1	Pinch-2 protein	2q14-q21
B48	2	Pinch protein	2q12.2

第3表 健康人と様々な癌患者の血清中のSEREX単離抗原に特異的なIgG抗体の存在

36分子に対して健康人血清中のIgG抗体の存在を検討した。その中で健康人血清中にIgG抗体したのが1例以下であった24分子に対して癌患者血清における検討を行った。第3表にはその24抗原の結果を表示した。\*B1に関しては30の健康人に対してIgG抗体の存在を検討した。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004のTable IIIを許可を得て転載)

クローン名	健康人 n=16	膀胱癌 n=28	前立腺癌 n=14	メラノーマ n=10	脳腫瘍 n=10	膵癌 n=10	腎癌 n=10	食道癌 n=10	大腸癌 n=7	精巣腫瘍 n=6
B1	0*	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	8	0	0	0	0	1	0	0	0
B4	0	3	1	0	1	0	0	1	0	0
B5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	5	1	1	1	4	0	0	1	1
B9	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0
B10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
B13	0	4	0	1	0	0	1	0	0	0
B14	0	1	2	0	0	0	3	1	0	0
B15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
B20	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0
B22	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
B28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B33	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
B44	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

抗原中13抗原が28例中2例以上IgG抗体が存在した(第3表)。残りの11分子に関してはcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた血清にのみIgG抗体が存在した。B3は膀胱癌患者血清中に最も高頻度にIgG抗体が存在した(28例中8例)。

これらの24分子については膀胱癌以外の癌患者血清の検討も行った(第3表)。24抗原中14抗原は膀胱癌以外の癌患者血清中にIgG抗体は存在せず、高頻度にIgG抗体を認める抗原は少なかった。B8(mitotin), B14(LBc癌原遺伝子), B20(STE20-like kinase)は複数の膵癌、腎癌、前立腺癌などの患者血清中にIgG抗体が存在した。B3に特異的なIgG抗体は8例(28例中)の膀胱癌患者血清中に認められたが、その他の癌種においては腎癌患者血清1例でのみ陽性で、その他の癌患者血清や健康人血清では抗体の存在を認めなかった。B1に特異的なIgG抗体は膀胱癌患者28例中2例の血清中に認められ、その他の癌患者や健康人血清中にはIgG抗体を認めなかった。

### 3. 単離抗原の組織、細胞株におけるmRNA発現の検討

前述の選択された24抗原に対して、RT-PCRにより組織発現パターンを検討した。まずPCRで検討した。ほとんどの抗原は多くの正常組織に発現していたが、B1, B2, B3は癌細胞株と精巣などのごく限られた正常組織のみに25サイクルのPCRで発現を認めた。B1は6例中4例の膀胱癌細胞株と精巣に発現を認めた。また正常膀胱粘膜、脳、平滑筋にも弱く発現を認めた。さらに様々な癌組織や癌細胞株にパネルを広げて発現を検討した。多くの癌細胞株で発現を認め、23例の膀胱癌組織、3例の胃癌組織、10例の腎細胞癌組織では全例で発現を認めた(第4表)。ノーザンブロットでB1は約1.7-kbにバンドが認められ、4例の膀胱癌細胞株、6例の膀胱癌組織では全例、正常膀胱粘膜に発現を認め、RT-PCRの結果とほぼ一致した(第1図)。B1は正常膀胱粘膜に発現しているが、膀胱癌組織にも強く発現していた。B1は精巣にも発現し、その他の組織では正常

第4表 RT-PCR 法による KU-BL-1 の様々な癌細胞株や癌組織における発現の検討

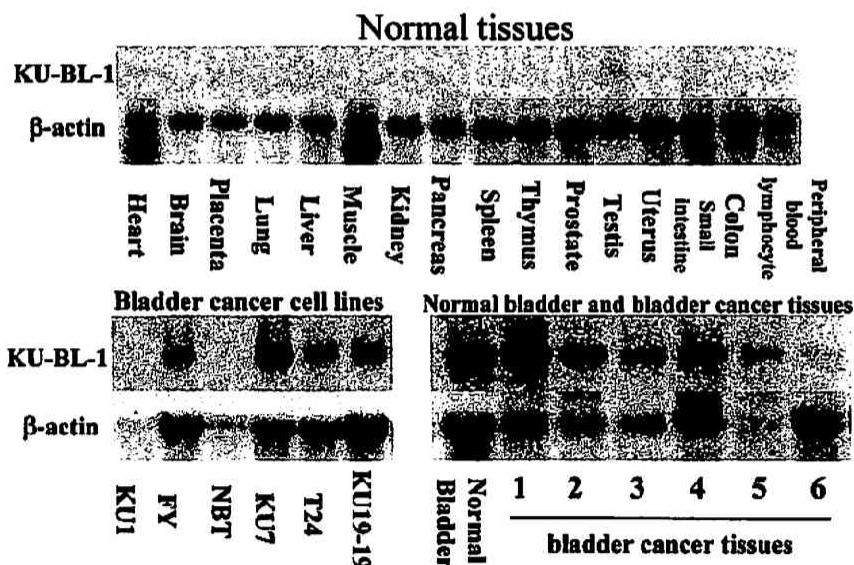
( ) 内は腫瘍組織に対する結果を表示した。細胞株では 25 サイクル、組織では 30 サイクルの結果を表示した。ND：施行せず。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Table IV を許可を得て転載)

癌種	陽性数/トータル
メラノーマ	11/11
膀胱癌	4/6 (23/23)
乳癌	1/2
大腸癌	5/7
食道癌	1/2
胃癌	ND (3/3)
グリオーマ	1/2
血液系腫瘍	4/4
肺癌	1/4
前立腺癌	1/2
膵癌	3/3
腎癌	2/4(10/10)

の心臓や肝臓にごく弱い発現を認めるのみであった。これらの結果から、B1 は膀胱癌、正常膀胱粘膜に強く発現し、精巣以外の正常組織にはほとんど発現がみられない抗原と考えられた。KU-BL-1 と命名しさらなる検討を行った。

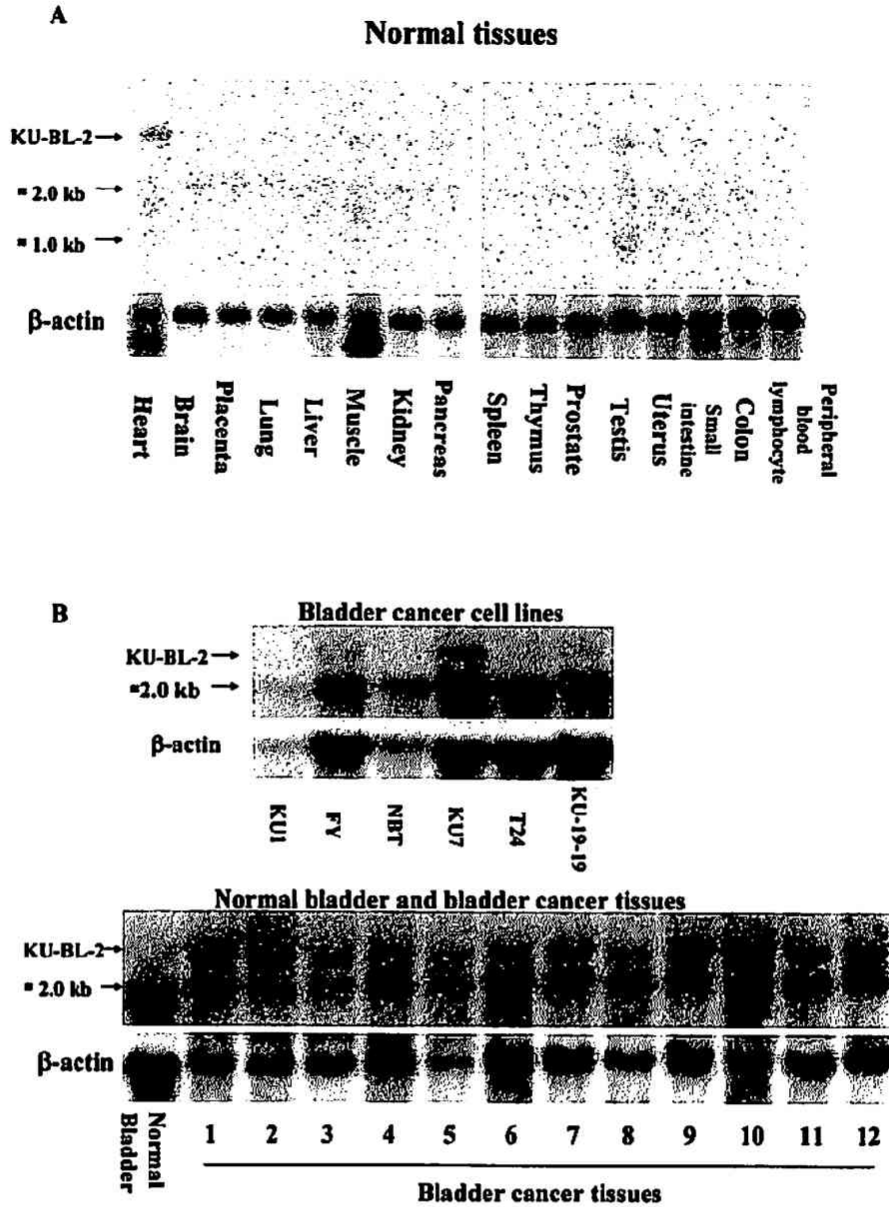
B2 (Tat-CT1) は RT-PCR とノーザンプロットで正常膀胱粘膜と比較し膀胱癌組織に発現が高かった。このため定量的な評価のために Real-time PCR を行った。B2 は正常膀胱粘膜と比較し膀胱癌組織に発現は高かったが、膀胱癌組織での発現は B2 の発現を認める心臓や腎臓などの正常組織と比べ高いとはいえなかった。このため B2 は膀胱腫瘍に対する免疫組織学的検討に利用しうる抗原であるが、免疫治療に使用しうる可能性は低いと思われた。

B3 に関して、25 サイクルの PCR では検討したほとんどの癌細胞株で発現を認め、膀胱癌細胞株では 6 例中 4 例で発現を認めた。正常組織では脳、心臓、肺、精巣に発現を認めた。ノーザンプロットでは、正常組織において B3 と考えられる弱い 3.2-Kb のバンドを心臓と精巣に認め、精巣にのみ弱い 1.0-kb のバンドを認めた。ごく弱い 2.0-Kb のバンドを正常組織全般に認めた(第 2A 図)。B3 と考えられる 3.2-Kb のバンドは 6 例



第1図 正常組織、膀胱癌細胞株および膀胱癌組織における KU-BL-1 の mRNA の発現の検討。約 1.7 kb の長さの部位に KU-BL-1 と考えられるバンドを認めた。6 種類中 4 種類の膀胱癌細胞株、膀胱癌組織 6 検体すべて、および正常膀胱粘膜と精巣に強い発現を認めた。市販に購入したメンブレン(図の上段)は各レーンに 2 μg の poly (A)<sup>+</sup> RNA を使用している。その他のメンブレンに関しては各レーンに 20 μg の total RNA (図の下段)を使用している。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 1 を許可を得て転載)





第2図 正常組織、膀胱癌細胞株および膀胱癌組織における KU-BL-2 の mRNA の発現の検討。KU-BL-2 の全長とはほぼ一致する 3.2-Kb の長さにバンドを認めた。正常組織 (図の上段) では、心臓と精巣に発現を認めた (A)。精巣にのみ弱い 1.0-kb のバンドを認めた。薄い 2.0-Kb のバンドはすべての組織に発現していた。3.2Kb のバンドは 6 種類中 3 種類の膀胱癌細胞株、膀胱癌組織のすべてに発現を認めたが膀胱粘膜には発現を認めなかった (B)。市販に購入したメンブレンは各レーンに 2g の poly (A)<sup>+</sup> RNA を使用している (A)。その他のメンブレンに関しては 20 μg の total RNA を各レーンに使用している (B)。(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Figure 2 を許可を得て転載)

```

1 gagcgacgtaatttcgacctgctcttccccgggagttagcgatccctcaaccctgcact
61 gcgctagtcctaaagaggaaATGTCTCTACGCTGCGGGGATGCAGCCCGCACCCCTGGGGC
121 CCCGGGTATTTGGGAGATATTTTTGCAGCCCAGTCAGACCGTTAAGCTCCTTGCCAGATA
181 CAAAAAAGGAACCTTAAGAATGGACCAGACCTTCAAGATTTGTATCTGGTGATCTTG
241 CAGCAGGAGCCTGGGATGAATATAAAGGAAACCTAAAACGCCAGAAAGGAGAAAGT
301 TAAGCATACCTCCATGGCTAAAGACAGAGATTCCCATGGGGAAAAATTACAATAAACTGA
361 AAAATACTTTGCGGAATTTAAATCTCCATACAGTATGTGAGGAAGCTCGATGTCCAATA
421 TTGGAGAGTGTGGGGAGGTGGAGAATATGCCACCGCCACAGCCACGATCATGTTGATGG
481 GTGACACATGTACAAGAGGTTGCAGATTTTGTCTGTAAAGACTGCAAGAAATCCTCCTC
541 CACTGGATGCCAGTGAGCCCTACAATACTGCAAAGGCAATTGCAGAATGGGGTCTGGATT
601 ATGTTGTCTGACATCTGTGGATCGAGATGATATGCCTGATGGGGGAGCTGAACACATTG
661 CAAAGACCGTATCATATTTAAAGGAAAGGAATCCAAAAATCCTTGTGGAGTGTCTTACTC
721 CTGATTTTCGAGGTGATCTCAAAGCAATAGAAAAAGTTGCTCTGTGAGGATAGATGTTG
781 ATGCACATAATGTAGAAACAGTCCCAGGATTAACAGAGTAAGGTTTCGTGATCCTCGGGCCA
841 ATTTGATCAGTCCCTACGTGACTGAAACATGCCAAGAAGGTTTCAGCCTGATGTTATTT
901 CTAAAACATGTATAATGTTGGGTTTAGCGGAGATGATGAGCAAGTATATGCAACAATGA
961 AAGCATTTCGTGAGGCAGATGTAGACTGCTTGACTTTAGGACAATATATGCAGCCAACA
1021 GCGGTCACCTTAAGGTTGAAGAATATATTACTCCTGAAAAATTCAAATACTGGGAAAAG
1081 TAGGAAATGAACCTGGATTTCATTTACTGCAAGTGGCCCTTTGGTGCCTTCTTCATATA
1141 AAGCAGGTGAATTTTCTGAAAAATCTAGTGGCTAAAAGAAAAACAAAAGACCTCtaaa
1201 acttcaacaagacctcaagatcacagaaattttaaaatttgattccagtttaataacag
1261 aggtggtgccagaatgcctggactgcagtggtgagtggtgccccacctcttgccttaaaaaaa
1321 aaatgtcaatagccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
1381 ggcgggtggatcacctgaggtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
1441 tgtctccactaaaaaacaaaaaattagtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
1501 tactcgggagcctaaggcaggagaatcactgaaacctgggagggggaggttgccagtgagc
1561 caagatcgtccattgccctccagcctgggtgacaagagcaaaactccatctcaataaaa
1621 taaaaaggaaaaaaaagtcaataaactgtacaaatttaattacagtaaaaaaaaaaaaaaa
1681 aaaaaaaaaaaaaa

```

第3図 KU-BL-1 cDNA の塩基配列。

KU-BL-1 の塩基配列の全長は 1,668-bp であり 1,116-bp の ORF を含んでいた (下線部)。372 のアミノ酸からなる蛋白であった。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 3 を許可を得て転載)

中 3 例の膀胱癌細胞株とほとんどの膀胱癌組織に発現を認めた (第 2B 図)。これらの結果から B3 は膀胱癌の診断や治療に応用できる可能性がある抗原と考えられた。B3 を KU-BL-2 と命名しさらなる検討を行った。

#### 4. KU-BL-1 の全長の同定と KU-BL-1 蛋白の機能の予測

SEREX 法で単離されたクローンがコードする cDNA で最長のものは 1,603-bp の cDNA フラグメントであった。5'末端側の残りの塩基配列を決定するために 5'-RACE 法を行った。5'-RACE により、ノーザンプロットで認められる約 1.7-kb のバンドにはほぼ一致する 1,668-bp の cDNA を同定した (第 3 図)。1,116-bp の open reading frame (ORF; 下線) を有し、Kozak 配列とストップコドンで最初の ATG と推定される部位の 5'側に認められた。372 個のアミノ酸で構成される蛋白と考えられた。相同性のある遺伝子を DNA データベースで検討すると推定の human lipoic acid synthetase (LAS) (AJ224162) の部分配列と human cDNA clone

FLJ22636 (UniGene number: 53531) とほとんど一致した。このため KU-BL-1 はヒト LAS と考えられた。KU-BL-1 遺伝子は FLJ22636 より 5' 側に 18bp 長く、3' 側に 65 bp 短かった。FLJ22636 と比較し 1077 番目の塩基が異なり、コドン 333 においてリシンがアルギニンに変わっていた。第 4 図に示されたように NCBI の protein BLAST でそのアミノ酸配列を検討すると、マウスの乳癌から同定された LAS (NP\_077791) と 87%、分裂酵母から同定された LAS の可能性のある蛋白 (O13642) と 59%、分裂酵母から同定された LAS precursor (BAA21430) と 67%、酵母から同定された Lip 5p<sup>25</sup> (NP\_014839) と 56% 一致した。マウス LAS (NP\_077791) と Lip 5p (NP\_014839) との相同性を第 4 図に示した。KU-BL-1 は金属結合部位 (iron-sulfur cluster) である CXXXCXXX という特徴的なモチーフを他の LAS と同様に有していた。この構造は硫黄が lipoic acid に導入されるさいに関与していると報告されている<sup>26)</sup>。

BL-1	1	<u>MSLRGDAARTLGPVFGRYFCSPVPLSSLPDRKKKLLIONGPDI</u>	45
MLAS	1	<u>MALRGWDARSIGSRIFGRYAFT-VRALSSLPDRKKKELIINGPDI</u>	44
LIP5	57	<u>RVPVGNSTEVENATSQLTGTSGKRRKGNRRKRITEFKDAINLGSF</u>	91
BL-1	46	<u>QDFVSGDLADRSTWDEYKGNLKRORGERLRPLDPWERTLPMGQNY</u>	90
MLAS	45	<u>QDFVSGDLADKSTWDEYKGNLKRORGERLRPLDPWLKRTLPMGQNY</u>	89
LIP5	92	<u>ADFVSGK-ASKMILDPL-EKARQNTLAKKLRWLRVDPKGTNY</u>	134
BL-1	91	<u>NKLFNHLRNINLHIVCEEARCPNIGECWGGGEPYADATATDMLGDI</u>	135
MLAS	90	<u>NKLFNHLRNINLHIVCEEARCPNIGECWGGGEPYADATATDMLGDI</u>	134
LIP5	135	<u>HGLRGDVKEIQLSIVCEEARCPNIGECWGGKDKSKATATDMLGD</u>	179
* * *			
BL-1	136	<u>TCTRGCRFCSVKTRARNPPFDASSEYNTAKLAEWGLDYVWVTSV</u>	180
MLAS	135	<u>TCTRGCRFCSVKTRARNPPFDANEDNTAKLAEWGLDYVWVTSV</u>	179
LIP5	180	<u>TCTRGCRFCSVKTRNTPSKPDPMEFENLAEAKRRLGLYVWVDTV</u>	224
BL-1	181	<u>DRDDMPDGGAEHTAKTVSYLKERNPKLVEGCLTDFRGRDKRTER</u>	225
MLAS	180	<u>DRDDVADGGAEHTAKTVSCLKERNPKLVEGCLTDFRGRDRAVER</u>	224
LIP5	225	<u>DRDDLVDGGANHLAEIVRKIKQKANTLVEITLSGDFRGRDLMVDI</u>	269
BL-1	226	<u>VALSGLDVYAHNVEVPELQSKVRDPRANFDOSLRVLRHAKKVOF</u>	270
MLAS	225	<u>VALSGLDVYAHNVEVPELQSKVRDPRANFDOSLRVLRHAKKVOF</u>	269
LIP5	270	<u>MAQCGLDVAHNLLETVESLTPHVRDRATYRQSLSVLERARATVE</u>	314
BL-1	271	<u>DVLSKTSIMLGLGETDEQVYATMKALREADVDCITLGOYMQPTKR</u>	315
MLAS	270	<u>DVVSRTSIMLGLGETDEQVYATMKALRAADVDCITLGOYMQPTKR</u>	314
LIP5	315	<u>SLITKTSIMLGLGETDEQITQIRDLRNIQCDDVVFQYMRFTKR</u>	359
BL-1	316	<u>HLKVEEYITPEKPKYWEKVGNELGFLYTAGGPLVRSSYKAGEFFI</u>	360
MLAS	315	<u>HLKVEEYVTPKPKYWEKVGNELGFLYTAGGPLVRSSYKAGEFFI</u>	359
LIP5	360	<u>HMKVVEYVKPEKFDYWKERALEMGFLYTAGGPLVRSSYKAGEAFI</u>	404
BL-1	361	<u>KNLVAKRRTKDL</u>	372
MLAS	360	<u>KNLVARRRTR</u>	369
LIP5	405	<u>ENVLKRNMK</u>	414

第4図 KU-BL-1 と他の lipoic acid synthetase との アミノ酸配列の比較。

KU-BL-1 のアミノ酸配列を他の LAS と比較した。KU-BL-1 はマウスの乳腺腫瘍から単離された LAS (NP\_077791) (MLAS) と 87% の相同性があり、酵母で報告されている Lip 5p (NP\_014839) と 56% の相同性を認めた。金属結合部位のモチーフ (iron-sulfur cluster) である CXXXCXXC には下線を引いてある。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 4 を許可を得て転載)

```

1      cyyyyagcagccagttggttagcgtogctccctgagcgtttcttaagggggcggccggc
61     ctgtcttccggcagtgccgagccaccgocctgocgogcttccagagctggggcgt
121    cgagctgcactgcgatgcgctgttggctgatagaa tcccccagtgccccagagagtc
181    gacccctogccggccggcggcagcccccggggtgaaaccgagctgagggaggATGCCAC
      M A A
241    CTCTGGGGTGGAGAGAGCAGCAAGAAGAAGACCGAGAAGAAGCTTCTCTCTGGGAGA
      S G V E K S S K R K T E K R L A A R E E
301    AGCTAAATGTTGGCGGTTTCATGGCGCTCATGAATAACATGCGAAACAGAAAACGTT
      A K * L L A G F N G V M N N M R K Q K T L
361    GTGTGACGTGATCTCATGCTCCAGGAAAGAAGATACCTGCTCATGCTGTTGTTCTGCG
      C D V I L M V O E R K I P A H R V V L A
421    TCCAGCCAGTCATTTTAACTTAATGTTTCAACTAACATGCTTGAATCAAAGTCTT
      A A S H P F N L M P T T N M L E S K E F
481    TGAAGTAGAACTCAAAGATGCTGAACCTGATATTATGAACAACCTGGGAATTCCTTA
      E V E L K D A E P D I I R O L V E F A Y
541    TACTGCTAGAAATTCGCTGAATAGCAAAATGTTGAGTCTTCTGCTGGATCCAGCAACCA
      T A R I S V N S N N V O S L L D A A N Q
601    ATATCAATGTAACCTGTGAAGAAAATGTGTGTGATTTTGAAGAACAAGTTCATGTC
      Y Q I E P V K K M C V D P L K E Q V D A
661    TTCAAATGTTCTGGATAAGTGTGCTAGCGAGTGTCTAGATGCTGTAATGAAGNC
      S N C L G I S V L A E C L D C P E L K A
721    AACTGCAGTACTTATTCATCAGCACTTACTGAAAGTTACAAAACGTAGAAATTCCT
      T A D D F I H Q H P T T E V Y K T D E T F L
781    TCAATTTGATGTCAGCGAGTAAACACATCTTCTCAACCAGGACACTCTGACTGTGAGAC
      Q L D V K R V T H L L N Q D T L T V R A
841    AGAGGATCAGGTTTANGATGCTGCACTCAGGTGTTGAAATACGATGAACCTAATGCCA
      E D T Q V Y D A A V R W L K Y D E P N R Q
901    GCCATTATGTTGATACTCTTAAAGTCAAGTTCCTCTTATATCAAAGAAATTTCTT
      P F M V D I L A K V R P P L T I S K N F L
961    AAGTAAACGGTACAAAGCTGAACCACTTATCAAGACAACTCTGAAATGCCCTAAGATGGT
      S K T V Q A E P L I Q D N P E C L K M V
1021   GATAATGGAAATGAGGTACCATCTACTGCTCCAGAGGACCGAGAAGAAGTGTAGATGG
      I S G M R Y H L L S P E D R E E L V D G
1081   CACAAGACCTAGAAGAAGAAGCAATGACTACCCATAGCCCTATTGGAGGCTCTCAACC
      T R P R R K K H D Y R U I A L F G G S O F
1141   ACAGTCTGTAGATATTTAACCDAAGGATATAGCTGGACAGACATCCGCTGCCCTT
      G S C R Y F N P K D Y S W T D I R C P F
1201   TGA AAAACGAGAGATGCAAGTCCGCTGTTTGGGACAAATGAGTATACATTTTGGGAGG
      E K R R R D A A C V F W D N 2 V V Y I L G G
1261   CTCTCAGCTTTTCCCAATAAGCGAATGGACTGCTATAATGATGTAAGGATAGCTGGTA
      S O L F P I K R M D C Y N V V K D S W Y
1321   TTGGAAACTGGCTCCTCCGACACCTCGAGACAGCCTTGTCTCATGCTGCAAGAGCCAA
      S K L G F P T P R D S L A A C A A E G J E
1381   AATTTATACATCGGAGGTTCAAGATGAGAACTCAGCTCTGTATTATTTCAGTGTCTA
      I Y T S G G S E V G N S A L Y L F E C Y
1441   TGATACGAGAATGAAAGCTGGCACAAAGCCACATGCTGACCCAGGCTGCAGCCA
      D T R T E S W H T K P S M L T O R C S H
1501   TGGATGAGGAGGCTTAATTCCTGTGAGTATATGATCTGCCACAGAAACATGGATG
      G M V E A N G A L I Y V C G G S L G N N V
1561   TTCGGVGAAGTCTTAATTCCTGTGAGTATATGATCTGCCACAGAAACATGGATG
      H G R V L N S C E V Y D P A T E T W T E
1621   GCTGTCTCAAATGATGAAAGCCAGGAAATCATGGCTGGTATTGTAAAAGACAAAT
      L C P M I E A R K N H G L V F V K D S K I
1681   ATTGCTGTGGTGTGATGATGCTTGGTGGTCTGGACAAATGGAATATACGATAT
      F A V G G G O N G L G G L D N V R Y Y D I
1741   TAAATGAAAGGATGGAAGATGCTCACCAGCCATGGAGGCTTAACAGTGAATG
      K L N E W K M V S P M P W K G V T V K C
1801   TCCAGCACTGGCTCTAAGTATTATGCTTGGCTGGTTTCAAGGCTTGGTGGATTAGG
      A A A V G S I V I V L A G F O G V G R L G
1861   ACACATCTCGAATAAATACGAAACAGACAAATGGCTTCCCACTCCAAAGTTCGTGC
      H I L E Y N T E T D K W V A N S K V R A
1921   TTTCCAGTCACAGTGTTTAATTTGCTGTGCTGATACTTGTGGACAAATGAGAGAGC
      F P V T S C L I C V V D T C G A N E E T
1981   CCTTGAACATgasaatgagtgagcttcagactcatcagagcctcassaataagccac
      L E T
2041   cagtgtttgttccagagtttggtagaagtttggtttgggttttggtaagaag
2101   tttcaagtgaatgaggttccctaasaatagatgtttcttttataagatttcttaatt
2161   csaagtccatatttggctggccacaaaccagaacatctctagcagaaacttgaaa
2221   aagtaaaagatttggtaaaatgtgaaattcttgaaatgaaatccacttggtaactatg
2281   attttggcgaatagaagattggctcactcagtgaaagcagtactctagcttagatct
2341   attttctgcaatcagagaggtgctatcaggttaggtctgtttgtctcagtcagaacta
2401   agaaatgatagaattgtaagtcaagatgggcaactcagatggagcagcttagctcaca
2461   gtttggctgtctatttatttttagtgccaaatgatatccattttaaagtaagccag
2521   agtgngtcaagcattatccacactttctcacaacttcccaaacagatttgggggtta
2581   atatgtccaaactcctcatgaanataatccaaactcactaaatataatccatttttaac
2641   ataaatgtaagcttagcaccatcattaattatgtctgttttataccagtggttaa
2701   aaaggaattctgctctttagctcactgttaaaataaaccccaatcagtagtaggtat
2761   aactagcaaaaagttaagctattatagcaattttagatcattagaagaagcactggtta
2821   gttgtcaaatcagtggtgactttgaactctttaaagagatcagtaattcttttccct
2881   tagccaasacatgaatatitaccctagttgtctcacaagttttgtaactaggttag
2941   atatagtcaatcctatcattgcttttatgtgatcaataaatttttacaaccccaac
3001   tctcaatttctctagtaatactttgcttttctcactgtgtagaagtagcaaacatgta
3061   aagctgtcaaatcaatgtttttatctgtaataataaatttttttaacttaaaaaaa
3121   aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

第5図 KU-BL-2の塩基配列およびアミノ酸配列。  
 KU-BL-2のORF(下線)は1,758 bpであり、586のアミノ酸で構成される蛋白であった。KU-BL-2のアミノ酸配列はBTB/POZドメイン(a)と6つのkelch repeat(b)を有していた。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004のFigure 5を許可を得て転載)

A

KU-BL-3	MAASGV	EKSSKKKTEK	KLAA	REEAK	LLAG	FMGV	MNNMR	KQ	40
Kelch	QYSNEQ				HTARS	FDA	MNEM	RKQ	153
KLHL3	KLSSQ	TLIQAGDDEKN	QRTITV	NPA	HMGK	AFKV	MNEL	RSK	46

KU-BL-3	KT	LCDV	ILMV	QERK	LP	AHRV	VLA	AA	S	H	F	N	L	M	F	T	T	N	M	L	E	S	80
Kelch	KQ	LCDV	ILV	ADDVE	L	AHRM	VLA	ASC	S	P	Y	F	A	M	F	T	S	-	F	E	E	S	192
KLHL3	QL	LCDV	MIVA	EDVE	L	AHRV	VLA	AC	S	P	Y	F	A	M	F	T	G	D	M	S	E	S	86

KU-BL-3	K	S	F	E	V	E	L	K	D	A	E	P	D	I	E	Q	L	V	E	F	A	Y	T	A	R	I	S	V	N	S	N	N	V	O	S	L	D	A	120		
Kelch	R	Q	A	R	I	T	L	Q	S	V	D	A	R	A	L	E	L	I	D	Y	V	Y	T	A	T	V	E	V	N	E	D	N	V	Q	V	L	L	T	A	232	
KLHL3	K	A	K	K	I	E	I	K	D	V	D	G	Q	T	L	S	K	L	I	D	Y	I	Y	T	A	E	I	E	V	T	E	E	N	V	Q	V	L	L	P	A	126

KU-BL-3	A	N	Q	Y	D	I	E	P	V	K	K	M	C	133
Kelch	A	N	L	L	D	L	T	D	V	R	D	A	C	245
KLHL3	A	S	L	L	D	L	M	D	V	R	Q	N	C	139

B

KU-BL-3(R1)	I	A	L	F	G	G	-----	S	P	D	S	C	R	---	Y	F	N	P	K	D	Y	S	H	T	D	I	R	-	C	P	F	E	K	R	D	A	A	C	V	F	W	O	N	336			
KLHL3 (R1)	V	M	I	V	G	G	-----	Q	A	P	K	A	I	R	S	V	E	C	Y	D	F	E	E	D	R	D	Q	I	A	-	E	L	P	S	R	R	C	R	A	G	V	V	F	M	A	G	347
Kelch (R1)	I	L	L	V	I	G	G	Q	A	-----	P	K	A	I	R	S	V	E	N	D	L	R	E	E	K	N	Y	Q	A	A	-	M	P	N	R	R	C	R	S	G	L	S	V	L	G	D	450

KU-BL-3(R2)	V	W	Y	I	L	G	G	-	S	-	Q	-	L	F	P	-	I	K	R	M	D	L	N	V	V	K	D	S	H	Y	S	K	L	G	-	P	P	T	P	R	D	S	L	A	C	A	E	G	382		
KLHL3 (R2)	H	V	Y	A	V	G	G	F	N	-	G	-	S	L	R	-	V	R	T	V	D	V	D	G	V	K	D	D	H	T	S	I	A	S	-	M	Q	E	R	R	S	T	L	G	A	A	V	L	N	D	394
Kelch (R2)	K	V	Y	A	V	G	G	F	N	-	G	-	S	L	R	-	V	R	T	V	D	V	D	P	A	T	D	H	A	N	C	S	N	-	M	E	A	R	R	S	T	L	G	V	A	A	L	N	G	496	

KU-BL-3(R3)	K	I	T	S	G	G	S	E	V	G	-	N	S	A	-	L	Y	L	F	E	L	C	D	T	R	T	E	S	H	T	K	P	-	S	M	L	T	Q	R	C	S	H	G	N	V	E	A	N	G	430
KLHL3 (R3)	L	L	Y	A	V	G	G	F	D	-	G	-	S	T	G	-	L	A	S	V	E	A	Y	S	Y	K	T	N	E	F	F	V	A	-	P	M	N	T	R	Q	S	S	V	G	V	V	E	G	441	
Kelch (R3)	C	I	Y	A	V	G	G	F	D	-	G	-	T	T	G	-	L	S	S	A	E	M	D	P	K	T	D	I	R	F	I	A	-	S	M	T	R	R	S	S	V	G	V	V	H	G	543			

KU-BL-3(R4)	L	I	V	C	G	G	S	L	-	G	N	N	V	S	G	R	V	L	N	S	C	E	V	D	P	A	T	E	H	T	E	L	C	-	P	M	E	A	R	K	N	H	G	L	V	F	V	K	D	481
KLHL3 (R4)	K	L	Y	A	V	G	G	Y	D	-	G	-	A	S	R	Q	C	L	S	T	V	E	Q	N	P	A	T	N	E	Y	V	A	-	D	M	S	T	R	R	S	G	A	G	V	G	V	L	S	G	490
Kelch (R4)	L	L	Y	A	V	G	G	Y	D	-	G	-	F	T	R	Q	C	L	S	S	V	E	R	N	P	D	I	D	H	M	N	V	A	E	-	M	S	S	R	R	S	G	A	G	V	G	V	L	N	592

KU-BL-3(R5)	K	I	F	A	V	G	G	N	-	G	-	L	Q	G	L	-	D	N	V	E	Y	D	I	K	L	N	E	K	M	V	S	-	P	M	P	W	K	G	V	T	V	K	C	A	V	G	S	528		
KLHL3 (R5)	Q	L	Y	A	T	G	G	H	D	-	G	-	P	L	V	R	-	K	S	V	E	Y	D	P	G	T	N	T	K	Q	V	A	-	D	M	N	C	R	R	N	A	G	V	C	A	V	N	G	537	
Kelch (R5)	I	L	Y	A	V	G	G	H	D	-	G	-	P	M	V	-	R	R	S	V	E	A	D	C	E	T	N	S	R	S	V	A	-	D	M	S	Y	C	R	R	N	A	G	V	V	A	H	D	G	639

KU-BL-3(R6)	I	V	V	A	G	F	Q	-	G	-	V	G	R	-	-	G	H	I	L	E	Y	N	T	E	D	K	R	M	A	N	S	K	V	R	A	F	P	V	T	S	C	L	I	C	V	V	D	T	576		
KLHL3 (R6)	L	L	Y	V	V	G	G	D	-	G	-	S	C	N	-	-	L	A	S	V	E	Y	N	P	V	T	D	K	H	T	L	L	P	T	N	M	S	T	G	R	S	Y	A	G	V	A	V	I	H	K	585
Kelch (R6)	L	L	Y	V	V	G	G	D	-	G	-	T	S	N	-	-	L	A	S	V	E	Y	N	P	D	S	D	S	R	I	L	P	A	L	M	T	I	G	R	S	Y	A	G	V	C	M	I	D	K	687	

第6図 KU-BL-3とkelchおよびKLHL3との2つのドメインの比較。

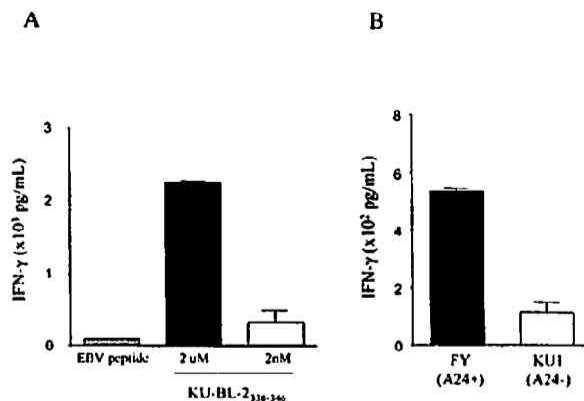
(A) BTB/POZドメインの比較。KU-BL-3では過去に報告された37のコンセンサスシーケンス<sup>20)</sup>のうち35アミノ酸(\*)が一致していた。一致しない部位は(#)でマークした。(B) Kelch repeatの比較。完全に一致するアミノ酸は(#)でマークした。機能的に類似しているアミノ酸は(+)でマークしている。

## 5. KU-BL-2 の構造と機能の検討

KU-BL-2 をコードする最長の cDNA クローンは 3,112-bp の長さの cDNA をコードしており、ノーザンプロットの 3.2-kb のバンドとほぼ一致した。KU-BL-2 をコードするその他の 7 つのクローンの塩基配列と比較し、ORF は 1,758-bp であり 586 個のアミノ酸で構成される蛋白であることがわかった (第 5 図)。Kozak 配列とストップコドンが最初の ATG と推定される部位の 5' 側に存在し ORF の正当性が確認された。DNA データベース上で検討すると KU-BL-2 はヒト胎児脳組織に由来する機能不明の cDNA clone DKFZp564C1616 (AL136597) と一致し、7 番染色体上に存在することがわかった。KU-BL-2 はショウジョウバエの卵子形成時に発現される *kelch protein*<sup>27)</sup> に相同性が高かった。DKFZp564C1616 と比較し 584 番目と 887 番目の塩基が異なっていたが、アミノ酸配列に変化はなかった。相同性のある蛋白をデータベース上で検索すると、KU-BL-2 のアミノ酸配列は機能不明の蛋白 hypothetical protein (CAB66532) とほぼ一致した。KU-BL-2 はヒト *kelch-like protein 3* (KLHL3 : Q9UH77) と 34%、ショウジョウバエの *kelch 蛋白*<sup>27)</sup> (Q04652) と 33%、*kelch-like 2* (Mayven : NP\_009177) と 32% の相同性があり、その他の *kelch-like protein* と同相同性を認めた。PROSITE プログラムや Pfam プログラムを用いたアミノ酸配列のモチーフを検討すると、KU-BL-2 は *kelch-like protein* に特徴的に保存されている BTB/POZ ドメインと 6 つの *kelch repeat* という特徴的な配列を有する可能性が示された (第 5 図)。KU-BL-2 のアミノ酸配列上の BTB/POZ ドメインと考えられる部位はアミノ酸で 37 個中 35 個 (94.6%) が過去に報告されたコンセンサスシーケンス<sup>28)</sup> と一致した (第 6A 図)。また KLHL3 と *kelch 蛋白* の 6 つの *kelch repeat* との相同性を (第 6B 図) に示した。これらの結果から、KU-BL-2 は新規の *kelch-like protein* であると考えられた。

## 6. 合成ペプチドを用いた腫瘍反応性 T 細胞の誘導

KU-BL-1 と KU-BL-2 由来の HLA-A24 高親和性ペプチドを合成し、これを用いて 8 人の健康人の PBMC を刺激することによりペプチド特異的に反応する T 細胞の誘導を試みた。4 種類のペプチドを合成した。これらの中で、KU-BL-2 に由来するペプチドである VYILGGSQI でペプチド特異的に反応する T 細胞を 1 例において誘導できた (第 7A 図)。VYILGGSQI で刺激された T 細胞は HLA-A24 と KU-BL-2 を同時に発



第 7 図 HLA-A24 結合 KU-BL-2 ペプチドによる腫瘍反応性 T 細胞の誘導。

HLA-A24 高親和性合成ペプチドを用い、8 人の健康人の末梢血リンパ球から腫瘍反応性 T 細胞を誘導した。1 回目の刺激は樹状細胞を用い、その他の 3 回は放射線照射後の自己末梢血リンパ球を用いて行った。T 細胞による抗原の認識は IFN-γ release assay を用いて評価した。A ; 8 例のドナー中 1 例で KU-BL-2 ペプチド (VYILGGSQI) を特異的に認識する T 細胞が誘導できた。ペプチドで刺激されていない T2-A24 細胞からの IFN-γ の産生をバックグラウンドとして、その IFN-γ 値を差し引いた値を示した。B ; その CTL は HLA-A24 陽性 KU-BL-2 陽性自己膀胱腫瘍細胞株 FY を認識したが、HLA-A24 陰性膀胱癌細胞株 KU1 を認識しなかった。(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Figure 6 を許可を得て転載)

現する膀胱癌細胞株 FY を認識し、HLA-A24 陰性の膀胱癌細胞株 KU1 は認識しなかった (第 7B 図)。その他の 3 つのペプチドでは、腫瘍細胞に強く反応する T 細胞を誘導できなかったが、SYKAGEFFL で刺激することにより、ペプチド特異的に T2-A24 細胞に弱く反応する T 細胞が 1 例で誘導された。

## 考 察

免疫学的な癌の拒絶において患者血清中に産生された抗体の役割は明らかにされていないが、生体内における腫瘍の消退に T 細胞が重要な役割を果たすことが多くのマウス腫瘍モデル<sup>3)</sup>やヒトメラノーマ<sup>1, 2)</sup>において証明されてきた。癌患者において T 細胞の反応をモニターしながら効率の良い細胞免疫治療を確立するためには腫瘍反応性 T 細胞に認識される腫瘍抗原を同定することが必要である。これまで cDNA 発現クローニング法を用い腫瘍反応性 T 細胞により認識されるヒトメラノーマ抗原が数多く単離されてきた<sup>4, 5, 9)</sup>。

MAGE や NY-ESO-1 などの癌精巢抗原が膀胱癌に発現していることが報告されている<sup>17, 18, 19)</sup>が、T細胞に認識される腫瘍抗原が膀胱癌において同定された報告は少なく<sup>18, 20)</sup>、膀胱癌に対する免疫治療を確立するためには膀胱癌抗原をさらに同定する必要がある。Pfreundschuh や Old らのグループは SEREX 法を様々な癌腫に適用し、多くの腫瘍抗原を単離した<sup>10, 11)</sup>。その結果、SEREX 法は血清中の抗体で腫瘍抗原を検出する方法であるが、CD4<sup>+</sup>T細胞認識抗原だけではなく CD8<sup>+</sup>T細胞認識抗原を同定する方法としても有用であることが分かってきた。我々のグループもメラノーマとメラノサイトに高発現される KU-MEL-1 を SEREX 法により同定し報告した<sup>29)</sup>。本研究では SEREX 法を膀胱癌に対して適用し、癌抗原の同定を試みた。

本研究では、36 の既知分子と 12 の未知分子を単離した。HDLBP と新規遺伝子である B3 と B4 が最もイムノスクリーニングで単離された分子であった。HDLBP に対する IgG 抗体は 28 例中 4 例の膀胱癌患者の血清中に存在した。HDLBP は 110-kD の細胞膜関連タンパクであり細胞内のコレステロールを取り除くために HDL に特異的に結合すると報告されている<sup>29)</sup>。しかし癌に関連した報告はなされていない。膀胱癌を有する患者において HDLBP に対する免疫反応がに起こっている場合があり、膀胱癌との関連性を検討する必要がある。

単離された 36 の既知分子の中で 9 分子は過去に何らかの癌との関連性が報告されている。そのうち 2 つ (Golgin-84 および LBc 癌原遺伝子) は他の遺伝子と組み換えを起こして癌遺伝子を形成する遺伝子であった。しかし FY 細胞株にはこのような遺伝子の変化は検出されなかった。α-enolase, mitosin, thrombospondin-1, AnnexinVIII などの遺伝子は癌細胞における発現の増加が報告されている。癌細胞において発現が増加している蛋白に対して IgG 抗体が生体内で産生されることは過去の SEREX 法を用いた報告で示唆された<sup>29)</sup>。また α-enolase が HLA-DRB1\*08032 拘束性に CD4<sup>+</sup>T細胞に認識され、IgG の産生を促進していることが扁平上皮癌を有する患者において最近証明された<sup>30)</sup>。Laminin receptor 1, α-actinin4, Metalloproteinase-like collagenase (PM5) などは正常細胞にも発現する蛋白であるが、癌の進展や予後との関連性も過去に報告されてきた。このような正常細胞にも存在する蛋白に対して抗体が産生されるのは、癌細胞内でこれらの蛋白が構造の変化を起こし免疫原性が高まった可能性がある。しかし本研究では、それぞれのクローンにコードされた塩基配列に遺伝

的多型以外の変化は認められなかった。

FY 細胞株は MAGE-1, -2, -3 を発現し<sup>20)</sup>、過去の SEREX 法によるメラノーマなどに関する報告でも MAGE ファミリーが単離されているが<sup>10)</sup>、本研究では MAGE ファミリーは単離されなかった。この理由として患者の血清中の MAGE 抗原に対する抗体価が比較的低かったか、HLA タイプなどの遺伝的要因で MAGE 抗原に対する IgG 抗体が産生なかったことが考えられる。

KU-BL-1 は mRNA の発現と血清中の IgG 抗体の存在を検討した結果、膀胱癌に発現し正常膀胱と精巣以外の正常組織に発現を認めない免疫原性のある抗原であると考えられた。KU-BL-1 は過去に報告された LAS と構造が類似しており、ヒト LAS をコードしていると推定された。これまでに報告された LAS と同様に、硫黄を lipoic acid に導入する際に必要である金属結合部位 (iron-sulfur cluster) のモチーフである CXXXXCXC という配列を含んでいた。Lipoic acid は硫黄を含む補酵素である pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase, branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase, glycine cleavage system などの酵素の作用に不可欠である<sup>31)</sup>。膀胱腫瘍における LAS の役割は今後検討する必要がある。

KU-BL-2 は膀胱癌細胞株、膀胱癌組織、および正常心臓や精巣組織に発現していた。KU-BL-2 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者 28 例中 8 例に存在し、健常人の血清中には検出されなかった。KU-BL-2 は *kelch* 蛋白およびその他の *kelch-like protein* と相同性が高かった。*Kelch* はショウジョウバエの卵子形成の時に発現し *ring canal*<sup>32)</sup> という細胞間輸送路に発現する蛋白である。KU-BL-2 は zinc-type の転写因子に認められる BTB/POZ ドメインを持ち、また *kelch-like protein* に特徴的である *kelch repeat* を有していた。*Kelch repeat* は蛋白と蛋白の相互作用をに関連する部位であり、これによってクロマチンの構造を変化させたり、細胞骨格や nuclear matrix protein などを変化させることが報告されている<sup>29)</sup>。*Kelch repeat* は典型的に約 50 のアミノ酸からなる 6 つのリピートからなっており、β-superbarrel 構造<sup>32)</sup>をなしていると予想される。このリピートはアクチンなどの他の蛋白に作用することが報告されている<sup>33)</sup>。この蛋白の膀胱腫瘍における役割も今後検討を要する。

KU-BL-1 と KU-BL-2 は細胞内蛋白と考えられるので、生細胞では抗体はこれらの抗原を認識することはできず、抗体を利用した治療には使用することができない。しか

し T 細胞を介した免疫治療の良いターゲットになりうると考える。本研究ではこの 2 つの分子に由来する 4 種類の HLA-A24 親和性のペプチドを用いて腫瘍反応性 T 細胞を誘導できるかを検討した。KU-BL-2 に由来するペプチドにおいてペプチド特異的 T 細胞が誘導でき、同時に KU-BL-2 を発現する腫瘍細胞株を認識した。また KU-BL-1 に由来するペプチドにおいても、ペプチド特異的に弱く反応する T 細胞が誘導された。この結果から、KU-BL-1 と KU-BL-2 は細胞免疫治療に応用しうる膀胱癌抗原である可能性が示された。今後はその他のペプチドにおいて CTL を誘導できるか、膀胱腫瘍の患者の PBMC から CTL が誘導できるか、特に KU-BL-1 や KU-BL-2 に対する IgG 抗体が血清中に存在する患者において CTL が誘導できるかをさらに検討していく必要がある。

細胞免疫治療を行うときに、KU-BL-1 や KU-BL-2 が精巣に発現していることは大きな問題とは思わないと思われる。つまり精粗細胞や精母細胞などは MHC class I を発現していないため T 細胞に認識されない。また KU-BL-2 は正常心臓に、KU-BL-1 は正常膀胱に比較的強く発現していたが、免疫治療に使用する抗原として除外する必要はないと思われる。もし KU-BL-2 のエピトープの密度が心筋細胞に低ければ、自己免疫反応は起こらないであろうし、KU-BL-1 が正常膀胱粘膜に発現しているも膀胱切除症例では免疫治療の妨げとはならない。

SEREX 法で同定された抗原の免疫細胞治療における意味は、最近マウスの腫瘍モデルにおいて検討された<sup>30)</sup>。その報告では、SEREX 法で同定された抗原は有用なヘルパー CD4<sup>+</sup> T 細胞の抗原になりうるということが証明され、抗原性のあるペプチドで同時に CD8<sup>+</sup> T 細胞を刺激することにより、強い抗腫瘍効果を認めることが示された。この所見から KU-BL-1 や KU-BL-2 も細胞免疫治療の際に免疫反応を誘導できる可能性がある。この 2 つの分子は膀胱腫瘍に比較的高頻度に発現し、限られた正常組織のみに発現を認め、膀胱腫瘍の患者で IgG 抗体が産生されていた。さらに KU-BL-2 に由来する一つのペプチドにおいて腫瘍反応性 T 細胞を誘導できた。これらの抗原は膀胱癌の診断に応用しうる腫瘍マーカーや、膀胱癌患者に対する免疫細胞治療におけるターゲットになりうる抗原であると考えられた。

## 総 括

膀胱癌抗原の同定するために SEREX 法を用いた。細胞異型度の高い膀胱癌の転移巣から樹立した FY 細胞

株から cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを同一人の血清でスクリーニングした。

1. 48 種類の抗原が単離され、36 種類の既知分子と 12 種類の未知分子であった。
2. 健常人および癌患者血清中の抗体の存在や組織特異的な発現パターンの検討を行った結果、KU-BL-1 と KU-BL-2 が免疫原性が高く、癌組織に高発現している有力な膀胱癌抗原候補と考えられた。
3. KU-BL-1 は特徴的な CXXXCXXC というモチーフを有し、*lipoic acid synthetase* の一つと考えられた。KU-BL-1 は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては膀胱粘膜や精巣に発現していた。KU-BL-1 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者血清中 28 例中 2 例に認められたが、健常人 30 人では認められなかった。
4. KU-BL-2 はショウジョウバエの *kelch* 蛋白に相同性があり *kelch-like protein* の一つと推定された。特徴的な BTB/POZ ドメインや *kelch repeat* を認めた。KU-BL-2 は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては精巣や心臓に発現していた。KU-BL-2 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者血清中 28 例 8 例に認められたが、健常人 16 人では認められなかった。
5. KU-BL-1 と KU-BL-2 のアミノ酸配列に由来する HLA-A24 高親和性ペプチドを用いて、健常人由来の末梢血リンパ球から腫瘍反応性 T 細胞の誘導を試みた。KU-BL-2 のペプチドである VYILGGSQI において 8 例中 1 例で腫瘍反応性の T 細胞を誘導することができた。

以上の結果から KU-BL-1 と KU-BL-2 は膀胱癌に高発現する免疫原性のある分子であり、膀胱癌の診断や免疫細胞治療に応用しうる抗原であると考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲および激励を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深甚なる謝意を表します。また終始懇切に多大なる直接のご指導、ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報部門河上裕教授に心から感謝致します。さらに多大なご協力をいただきました先端医科学研究所細胞情報部門と慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の諸先生方に感謝致します。

また本研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究 (S)、厚生労働省がん研究助成金、厚生労働科学研究費補助金 (がん克服戦略研究事業)、車両競技公益資金記念財団助成、日本私立学校振興・共済事業団 (学術研究振興資金)、



慶應義塾大学大型研究助成, 慶應義塾大学医学部研究奨励費によった。

文 献

- 1) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartztruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4 : 321-327, 1998
- 2) Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Rosenberg SA. Identification of tumor-regression antigens in melanoma. *Important Adv Oncol* 3-21, 1992
- 3) Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71 : 1093-1102, 1992
- 4) Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J Immunol* 154 : 3961-3968, 1995
- 5) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. 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
- 6) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon TA. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 : 1643-1647, 1991
- 7) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183 : 1185-1192, 1996
- 8) Kawakami Y, Wang X, Shofuda T, Sumimoto H, Tupesis J, Fitzgerald E, Rosenberg S. Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes. *J Immunol* 166 : 2871-2877, 2001
- 9) Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411 : 380-384, 2001
- 10) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 11810-11813, 1995
- 11) Jager E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity : CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12198-12203, 2000
- 12) Millikan R, Dinney C, Swanson D, Sweeney P, Ro JY, Smith TL, Williams D, Logothetis C. Integrated therapy for locally advanced bladder cancer : final report of a randomized trial of cystectomy plus adjuvant M-VAC versus cystectomy with both pre-operative and postoperative M-VAC. *J Clin Oncol* 19 : 4005-4013, 2001
- 13) Catalona WJ, Ratliff TL. Bacillus Calmette-Guerin and superficial bladder cancer. Clinical experience and mechanism of action. *Surg Annu* 22 : 363-378, 1990
- 14) Bohle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad, H. D. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol* 144 : 53-58, 1990
- 15) Stefanini GF, Bercovich E, Mazzeo V, Grigioni WF, Emili E, D'Errico A, Lo Cigno M, Tamagnini N, Mazzetti M. Class I and class II HLA antigen expression by transitional cell carcinoma of the bladder : correlation with T-cell infiltration and BCG treatment. *J Urol* 141 : 1449-1453, 1989
- 16) De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, Van der Meijden AP, Vegt PD, Debruyne FM, Ruitenberg EJ. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 34 : 306-312, 1992
- 17) Patard JJ, Bresseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, Van Cangh, P, Abbou CC, Chopin D. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer* 64 : 60-64, 1995
- 18) Heidecker L, Bresseur F, Probst-Kepper M, Gueguen M, Boon, T, Van den Eynde BJ. Cytolytic T lymphocytes raised against a human bladder carcinoma recognize an antigen encoded by gene MAGE-A12. *J Immunol* 164 : 6041-6045, 2000
- 19) Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma : correlation with tumor grade. *Cancer Res* 61 : 4671-4674, 2001
- 20) Nishiyama T, Tachibana M, Horiguchi Y, Nakamura

- K, Ikeda Y, Takesako K, Murai M. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res* 7 : 23-31, 2001
- 21) Gueguen M, Patard JJ, Gaugler B, Brasseur F, Renaud JC, Van Cangh PJ, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160 : 6188-6194, 1998
- 22) Ito K, Fujita T, Akada M, Kuniwa Y, Tsukamoto M, Yamamoto A, Matsuzaki Y, Matsushita M, Asano T, Nakashima J, Tachibana M, Hayakawa M, Ikeda H, Murai M, Kawakami Y. Identification of bladder cancer antigens recognized by IgG antibodies of a patient with metastatic bladder cancer. *Int J Cancer* 108 (5) : 712-724, 2004
- 23) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 179 : 1109-1118, 1994
- 24) McKnight GL, Reasoner J, Gilbert T, Sundquist KO, Hokland B, McKernan PA, Champagne J, Johnson CJ, Bailey MC, Holly R. Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem* 267 : 12131-12141, 1992
- 25) Sulo P, Martin NC. Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268 : 17634-17639, 1993
- 26) Tate R, Riccio A, Iaccarino M, Patriarca EJ. Cloning and transcriptional analysis of the lipA (lipoic acid synthetase) gene from *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Lett* 149 : 165-172, 1997
- 27) Xue F, Cooley L. kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* 72 : 681-693, 1993
- 28) Bardwell VJ, Treisman R. The POZ domain : a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8 : 1664-1677, 1994
- 29) Kuniwa Y, Fujita T, Akada M, Ito K, Shofuda T, Suzuki Y, Yamamoto A, Saida T, Kawakami Y. Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res* 61 : 7900-7907, 2001
- 30) Kondo H, Sahara H, Miyazaki A, Nabeta Y, Hirohashi Y, Kanaseki T, Yamaguchi A, Yamada N, Hirayama K, Suzuki M, Hamuro J, Torigoe T, Takahashi N, Kohama G, Ikeda H, Sato N. Natural Antigenic Peptides from Squamous Cell Carcinoma Recognized by Autologous HLA-DR8-restricted CD4+ T Cells. *Jpn. J. Cancer Res* 93 : 917-24, 2002
- 31) Morikawa T, Yasuno R, Wada H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett* 498 : 16-21, 2001
- 32) Bork P, Doolittle RF. *Drosophila* kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J Mol Biol* 236 : 1277-1282, 1994
- 33) Tilney LG, Tilney MS, Guild GM. Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *J Cell Biol* 133 : 61-74, 1996
- 34) Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, Mukai K, Watanabe M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H. Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 14571-14576, 2001