

学位論文

「Frequent High Expression of Kita-Kyushu Lung Cancer
Antigen-1 (KK-LC-1) in Gastric Cancer
(胃癌における Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1
(KK-LC-1) の高頻度発現)」

指導教授名 渡邊昌彦

申請者氏名 信太昭子

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

胃癌症例の多くは、診断時に進行していることが多い。進行胃癌患者に対する薬剤や手術方法が改善しているが、未だ生存率が低いため、新しい治療的アプローチが期待される。癌免疫療法は癌治療の候補だが、現在のところ胃癌においては免疫療法として有効な標的はほとんどない。多くの癌関連抗原(TAAs)が、ヒトの種々の癌腫において識別されてきた。癌精巢抗原(CTA)は、生殖系組織を除く正常組織にはほとんど発現せず、様々な癌腫において一定頻度で発現している抗原である。個々のCTAの発現頻度に関する見識は、癌診断に適用するにはまだ不十分であるが、CTAはその特定の発現パターンに基づいて、全身的な癌検索に使用できる可能性があり、癌免疫療法において非常に魅力的な標的といえる。

福山らは、新たなTAA、Kita-Kyushu lung cancer antigen-1(KK-LC-1)の同定を報告した。KK-LC-1は、細胞障害性Tリンパ球(CTL)によって認識される抗原決定基ペプチドを持つ。KK-LC-1は、精巢を除く正常組織には発現していないが、非小細胞肺癌(NSCLC)に33%の頻度で発現している。以上から、KK-LC-1はCTAに分類されうるが、異なる臓器の癌に発現するというCTAの必要条件を満たしていない。

本研究で、KK-LC-1がCTAであるかを確認するため、胃癌におけるKK-LC-1の発現を評価した。さらに、KK-LC-1と他のCTAの発現の関係を評価し、KK-LC-1が胃癌免疫療法の標的として有用かを検討した。

対象と方法：2011年6月～2013年6月の期間、北里大学メディカルセンター外科において、85症例が胃癌に対する外科的切除を施行され、55検体を得た。多発胃癌6症例を除き、胃癌49症例を検討した。

採取した新鮮腫瘍組織よりRNAを抽出し、cDNAに変換した。 β -actinを内部標準として使用した。各遺伝子発現はRT-PCR法にて検出した。

結果：KK-LC-1発現は、49症例中40例(81.6%)に認めた。MAGE-A1、MAGE-A3、NY-ESO-1の発現は、それぞれ17例(34.7%)、22例(44.9%)、8例(16.3%)だった。KK-LC-1を含むいずれかのCTA発現は、49例中47例(95.9%)に認めた。NY-ESO-1を発現した検体は、MAGE-A1とMAGE-A3を同時に発現していた。

考察：KK-LC-1は、精巢を除く正常組織に発現せず、NSCLCでのみ発現が報告されていた。本研究で、KK-LC-1は胃癌にも発現していることを示した。複数の臓器における腫瘍細胞に発現していることから、KK-LC-1はCTAと分類できる。

胃癌におけるKK-LC-1の発現頻度は、他のCTAよりも顕著に高値だった。福山らは、*Helicobacter pylori*が特定のCTA発現を誘導することを示した。胃癌症例の80%以上は、*H. pylori*感染によって引き起こされる。これらの事象は、KK-LC-1が、胃癌で特に高頻度で発現していることを示唆している。

TAAのT細胞認識に対する免疫原性は、癌ワクチンによる標的としての必要条件である。KK-LC-1は、ヒト白血球抗原-B62(HLA-B62)と結合する抗原決定基ペプチドを有する。したがって、HLA-B62陽性かつKK-LC-1発現腫瘍をもつ患者における候補ワクチンとして、KK-LC-1は魅力的な抗原である。HLA-B62陽性人口は20%以下である。CTAは、複数の抗原決定基ペプチドを持つことが、報告されている。故に、KK-LC-1は、HLAクラスI依存性のCTLによって認識される他の抗原決定基ペプチドを持つ可能性が示唆される。

一方、KK-LC-1の検出は癌細胞検出において有用である。胃や他の種類の癌診断のため、生検検体からmRNAあるいはタンパク質としてKK-LC-1を検出することは、HLA拘束性を必要とする癌免疫療法ワクチンと比較して、HLA拘束の制限がない。複数のCTAの検出頻度より高値であるKK-LC-1の発現頻度であれば、この方法によって診断のために胃癌細胞を検出できるかもしれない。他の研究者は、3~11個のCTAを使用した際に、少なくとも一つのCTAが検出される割合は74%

を下回ると報告している。さらに本研究では、KK-LC-1、MAGE-A1、MAGE-A3を用いた際に少なくとも一つの CTA が検出される割合は 95.6%であった。

KK-LC-1 は CTA であり、既知の CTA に加え、癌免疫療法の標的となる可能性がある。胃癌の場合、特に KK-LC-1 を含めた CTA を標的とした癌免疫療法は胃癌患者のほとんどの適用されることが期待され、この分子を狙った診断は胃における癌細胞の大多数を検出する可能性がある。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
1-1. はじめに -----	1
1-2. 癌関連抗原-----	1
1-3. 癌精巢抗原-----	1
1-4. Kita-Kyushu lung cancer antigen-1(KK-LC-1) -----	1
2. 方法 -----	2
2-1. 症例-----	2
2-2. 組織の回収 -----	2
2-3. CTA と KK-LC-1 の RNA 単離、cDNA 接合と PCR 解析-----	2
3. 結果-----	3
3-1. KK-LC-1 の発現-----	3
3-2. KK-LC-1 と CTA の発現頻度-----	3
3-3. KK-LC-1 と CTA の発現様式-----	3
4. 考察-----	3
5. 総括-----	4
6. 今後の展望-----	4
7. 謝辞-----	4
8. 引用文献-----	5
9. 業績目録-----	7
10. 図表-----	7

1. 序論

1-1. はじめに

胃癌は、日本の部位別癌死亡第2位である。胃癌症例の大多数は診断時に進行しており、薬剤治療や手術治療の改善が試みられているが、依然として生存率は低いままである。したがって、進行胃癌患者における新しい治療的なアプローチが必要とされる。癌免疫療法は、癌治療に貢献しうる治療のひとつであり、乳癌や前立腺癌、悪性黒色腫において成果を上げている。しかしながら、現在のところ胃癌においては免疫療法として使用可能な有力な標的はほとんど存在しない¹⁾。

1-2. 癌関連抗原

癌化した細胞は、新たに癌関連抗原(Tumor associated antigens : TAA)を産生する。TAAは悪性形質獲得前に存在するタンパク質と同様にプロセッシングを受け、HLAを介して細胞表面に抗原提示される。一部のTAAは、直接細胞表面に提示される。多くのTAAが、ヒトの様々な癌腫において同定(発見)されてきた。これらTAAは、癌の治療や診断の標的分子として期待される²⁻⁴⁾。

TAAを発現様式によって分類した。

- (1)癌精巣抗原(Cancer/Testis antigen : CTA) : 多種の癌において一定の頻度で発現し、生殖細胞を除く正常組織には発現しない。
- (2)分化抗原(Differentiated antigen) : 特定の組織に発現し、その組織の腫瘍細胞では正常細胞より多く発現する。
- (3)過剰発現抗原(Over-expressed antigen) : いずれの組織癌でも高発現し、正常組織でも発現している。
- (4)突然変異抗原(Mutated antigen) : (現在はネオアンチゲンとも呼ばれている。)患者ごとに突然変異のパターンが異なるため、突然変異抗原はその癌患者特異的に発現している。

癌治療の標的としやすいのはCTAである²⁻⁵⁾。

1-3. 癌精巣抗原

CTAは、生殖系組織を除く正常組織にはほとんど発現しておらず、ある種のヒトの癌組織において異常に発現していることから、癌免疫療法において魅力的な標的である。さらに、CTAはその特定の発現パターンに基づいて全身的な悪性腫瘍の検索・診断に有用である可能性がある。しかしながら、現在のところ個々のCTAの発現頻度に関する見識は癌診断に適用できるほど十分に確立されていない。

1-4. KK-LC-1

福山らは、新たなTAA、Kita-Kyushu lung cancer antigen-1(KK-LC-1)の同定を報告した⁶⁾。KK-LC-1は、HLA-B15拘束性細胞障害活性を持つ細胞障害性Tリンパ球(CTL)のクローンによって認識されるエピトープ(抗原決定基)ペプチドを持つ。KK-LC-1遺伝子は、Xq22染色体上に存在し、113のアミノ酸によるタンパク質を規定する。

ヒトの正常組織を RT-PCR 法で解析したところ、KK-LC-1 は精巣のみに発現していた。一方で非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer : NSCLC)には 33% の頻度で発現していた。以上より、KK-LC-1 は CTA に分類される可能性がある。しかしながら、この分子は異なる臓器の癌に発現するという CTA の必要条件を満たしていない。

KK-LC-1 が CTA であるかを確認するため、胃癌における KK-LC-1 の発現の有無、および他の CTA の発現の関係を評価した。KK-LC-1 が、胃癌免疫療法の標的として有用であるか検討することを研究の目的とした。

2. 方法

本研究方法は、北里大学メディカルセンター(日本)の倫理委員会において、No23-8 として認可され、この研究で使用する組織検体を採取する事前に、個々の症例から情報提供の署名同意を得た。

2-1. 症例

2011 年 6 月から 2013 年 6 月の期間、北里大学メディカルセンター外科(北本、日本)において、85 症例が胃癌に対する外科的切除を施行された。これらの症例のうち、55 症例より検体を採取した。このうち多発胃癌であった 6 症例を除いた胃癌 49 症例を検討した。症例の臨床データ、術前検査所見、手術内容、病理組織学的所見、TNM 分類を評価した。すべての切除検体、胃癌原発巣と系統的に郭清されたリンパ節において、腫瘍の組織型とリンパ節転移を病理組織学的に診断した。臨床病理学的所見は胃癌取扱規約(日本、第 14 版)⁸⁾に基づいて分類した。49 症例の背景因子と特徴は Table I に示した。

2-2. 組織の回収

切除術後の新鮮胃組織から腫瘍部位を採取し、RNA later(Life technologies, Carlsbad, CA)に 4℃で一晩浸漬した。浸漬した組織は、新鮮凍結組織として使用するまで -80℃に保存した。

2-3. CTA と KK-LC-1 の RNA 単離、cDNA 接合と PCR 解析

新鮮凍結組織より、BIOROBOT EZ1 と EZ1 RNA Tissue Mini Kits(48)(ともに Qiagen, Hilden, Germany)を用いプロトコールに従い RNA を単離し、oligo-p(dN)₆ ランダムプライマーと、Superscript II 逆転写酵素(ともに Life Technologies)を用いて cDNA を合成した。RNA 単離の質を評価するため、β-actin を内在性コントロールとして使用した。β-Actin、Melanoma antigen gene encoding-A1(MAGE-A1)、MAGE-A3、New York Esophageal squamous cell carcinoma-1(NY-ESO-1)の発現レベルは、7900HT Fast Real-Time PCR System を用いて、TaqMan Gene Expression Assays ID Hs999999903-m1、Hs00607097-m1、H200366532-m1、Hs00265824-m1 でそれぞれ定量した(全て Life Technologies)。RNA から合成された cDNA は、β-actin の閾値サイクル数(Ct)によって測定し、CTA と KK-LC-1 の発現レベルは、β-actin の Ct が 28 以下のものを適切なサンプルとして測定した。KK-LC-1 の mRNA を検出する適切なプローブが確立されていなかったため、従来の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて KK-LC-1 発現を評価した。

KK-LC-1 の RT-PCR は、ATGAACTTCTATTTACTCCTAGCGAGC と、TTAGGTGGATTTCGGTGAGG を特定プライマーとして使用した。67°C 40 サイクルでアニール化し、342-bp の生成物を得た。

3. 結果

3-1. KK-LC-1 の発現

代表例として、胃癌 7 検体における KK-LC-1 の発現を Figure1 に示した。KK-LC-1 の発現は、342bp のバンドとして検出した。Figure1 では、7 検体中 5 検体に KK-LC-1 発現を認めた。

3-2. KK-LC-1 と CTA の発現頻度

胃癌症例における KK-LC-1 発現検体の数は、49 症例中 40 例(81.6%)であった。MAGE-A1、MAGE-A3、NY-ESO-1 の発現はそれぞれ 49 症例中 17 例(34.7%)、22 例(44.9%)、8 例(16.3%)であった。(Table II)

3-3. KK-LC-1 と CTA の発現様式

Figure2 は、それぞれの癌検体における CTA の発現様式を、Table III は 49 例における KK-LC-1 発現と他の CTA 発現の関係を示している。KK-LC-1 を含むいずれかの CTA 発現が、49 例中 47 例(95.9%)に観察された。これら 47 例中 17 例は、KK-LC-1 と他の CTA を同時に発現していた。一方、他の CTA 発現を認めず、かつ KK-LC-1 発現を認めた症例は 23 例だった。KK-LC-1 を除き、いずれかの CTA を発現していた症例は、49 例中 24 例(49.0%)であった。NY-ESO-1 を発現した検体は、MAGE-A1 と MAGE-A3 も発現していた(Figure2)。

4. 考察

KK-LC-1 は、精巢を除く正常組織に発現していないため、CTA である可能性が示唆されている⁶⁾。KK-LC-1 発現は、NSCLC のみで報告されていたが^{6,7)}、本研究で胃癌にも発現していることが明らかとなった。複数の臓器における腫瘍細胞に発現していることから、KK-LC-1 は CTA に分類できる。

本研究で評価した他の CTA と比較し、胃癌における KK-LC-1 発現頻度(81.6%)は、MAGE-A1(34.7%)、MAGE-A3(44.9%)、NY-ESO-1(16.3%)よりも顕著に高値だった。今回の結果と近似して、MAGE-A1、MAGE-A3、NY-ESO-1 の発現頻度は、24-41%、38-43%、8-13%とそれぞれ報告されている⁹⁻¹²⁾。

特定の発がん物質が、細胞株において特定の CTA の de novo 発現を誘導することが報告されている^{14,15)}。特に、福山らは *Helicobacter pylori* が特定の CTA 発現を誘導することを報告している。胃癌症例の 80%以上は *H. pylori* 感染によって引き起こされ、*H. pylori* は宿主細胞の悪性形質獲得と共に、特定の CTA 発現を誘導する能

力があることを示した¹⁴⁾。これらの知見は、KK-LC-1 のような特定の CTA が胃癌で

特に高頻度に発現していることに関連すると考えられる。

TAA の発現と、T 細胞認識による免疫原性は、多価癌ワクチンの標的となるた

めの必要条件である。そして、CTLによって認識される癌抗原の同定は、ワクチンの適用には必須である。KK-LC-1⁷⁶⁻⁸⁴ ペプチドは、ヒト白血球抗原-B62(HLA-B62)と結合する抗原決定基ペプチドである⁶⁾。したがって、HLA-B62陽性かつKK-LC-1発現腫瘍をもつ患者において癌免疫療法を行うとすれば、KK-LC-1は魅力的な抗原となる。HLA-B62陽性人口は多くなく、日本と白色人種では20%未満と見積もられている^{17,18)}。CTAは、HLAクラスI分子と結合する複数の抗原決定基ペプチドを持つことを示されている¹⁹⁻²¹⁾。故に、KK-LC-1は、HLAクラスI依存性のCTLによって認識される他の抗原決定基ペプチドが存在する可能性が示唆される。

一方、KK-LC-1の検出は、癌細胞検出にとって有用と考えられる。胃や他臓器の癌診断のため、生検検体におけるmRNAあるいはタンパク質としてKK-LC-1を検出することは、HLA拘束を必要とする癌免疫療法ワクチンと比較して、HLA拘束の制限がない。複数のCTAの検出頻度より高値であったKK-LC-1発現頻度(81.6%)から、この方法は、胃癌の診断に魅力的である。他の研究者は、3~11個のCTAを使用した際に、少なくとも一つのCTAが検出される割合は74%を下回ると報告している^{9,11,12,22)}。さらに、本研究では、KK-LC-1、MAGE-A1、MAGE-A3を用いた際に少なくとも一つのCTAが検出される割合は95.6%であった。すなわち、KK-LC-1発現を何らかの形で利用することが、胃癌の検出・診断に役立つ可能性がある。

5. 統括

KK-LC-1はCTAであった。胃癌におけるKK-LC-1の発現頻度は、他のCTAと比較して顕著に高値であった。

6. 今後の展望

KK-LC-1は、既知のCTAに加え癌免疫療法の標的となる可能性がある。特に、KK-LC-1を含めたCTAを標的とした癌免疫療法は胃癌患者のほとんどの適用されることが期待される。また、KK-LC-1の発現を用いた胃癌診断は、高い感度・特異性を持って多くの胃癌症例を検出する可能性がある。

7. 謝辞

本研究の完成にあたり、終始変わらぬご指導とご鞭撻を賜りました北里大学外科学教授 渡邊昌彦先生に深甚なる謝意を表します。

また、直接の御指導を頂きました北里大学外科学 二渡信江先生、北里大学メディカルセンター医療環境科学センター 福山隆先生に感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Matsueda S, Graham DY: Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(7):1657-1666.
2. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, de Plaen E, van den Eyde B, et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-1647.
3. Ichiki Y, Takenoyama M, Mizukami M, So T, Sugaya M, Yasuda M, et al: Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated *p53* in a patient with lung cancer. *J Immunol* 2004;172:4844-4850.
4. Takenoyama M, Baurain JF, Yasuda M, So T, Sugaya M, Hanagiri T, et al: A point mutation in the *NY-ESO-1* gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on a human squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 2006;118:1992-1997.
5. Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ: The cancer/testis genes: Review, standardization, and commentary. *Cancer Immunity* 2004;4:1-15. <http://www.cancerimmunity.org/v4p1/031220.htm>
6. Fukuyama T, Hanagiri T, Takenoyama M, Ichiki Y, Mizukami M, So T, et al: Identification of a new cancer/germline gene, *KK-LC-1*, encoding an antigen recognized by autologous CTL induced on human lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2006;66: 4922-4928.
7. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, et al: Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;68: 105-110, 2010.
8. Japanese Gastric Cancer Association: Japanese Classification of Gastric Carcinoma: Third English edition. *Gastric Cancer.* 2011;14:101-112.
9. Wang Y, Wu XJ, Zhao AL, Yuan YH, Chen YT, Jungbluth AA, et al: Cancer/testis antigen expression and autologous humoral immunity to NY-ESO-1 in gastric cancer. *Cancer Immun* 2004;4: 11.
10. Ogata K, Aihara R, Mochiki E, Ogawa A, Yanai M, Toyomasu Y, et al: Clinical significance of melanoma antigen-encoding gene-1 (MAGE-1) expression and its correlation with poor prognosis in differentiated advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1195-1203.
11. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, et al: Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:713-720.
12. Kim YM, Lee YH, Shin SH, Kim EH, Choi YW, Lee KM, et al: Expression of MAGE-1, -2, and -3 genes in gastric carcinomas and cancer cell lines derived from Korean patients. *J Korean Med Sci* 2001;16:62-68.
13. Bolli M, Schultz-Thater E, Zajac P, Guller U, Feder C, Sanguedolce F, et al: NY-ESO-1/LAGE-1

- coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study. *Int J Cancer* 2005;115:960-966.
14. Fukuyama T, Yamazaki T, Fujita T, Uematsu T, Ichiki Y, Kaneko H, et al: *Helicobacter pylori*, a carcinogen, induces the expression of melanoma antigen-encoding gene (MAGE)-A3, a cancer/testis antigen. *Tumour Biol* 2012;33:1881-1887.
 15. Sharma A, Bode B, Wenger RH, Lehmann K, Sartori AA, Moch H, et al: γ -Radiation promotes immunological recognition of cancer cells through increased expression of cancer-testis antigens *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*.2011;6: e28217.
 16. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al: *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784–789.
 17. Tanaka H, Akaza T and Juji T: Report of the Japanese Central Bone Marrow Data Center. *Clin Transpl* 1996:139-144.
 18. Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM and Milford EL: HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 1997;64:1017-1027, 1997.
 19. Corbiere V, Nicolay H, Russo V, Stroobant V, Brichard V, Boon T, et al: Identification of a MAGE-1 peptide recognized by cytolytic T-lymphocytes on HLA-B*5701 tumors. *Tissue Antigens* 2004;63: 453-457.
 20. Breckpot K, Heirman C, De Greef C, van der Bruggen P and Thielemans K: Identification of new antigenic peptide presented by HLA-Cw7 and encoded by several MAGE genes using dendritic cells transduced with lentiviruses. *J Immunol* 2004;172: 2232-2237.
 21. Benlalam H, Linard B, Guilloux Y, Moreau-Aubry A, Derre L, Diez E, et al: Identification of five new HLA-B*3501-restricted epitopes derived from common melanoma-associated antigens, spontaneously recognized by tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2003;171: 6283-6289.
 22. Nakamura Y, Tanaka F, Nagahara H, Ieta K, Haraguchi N, Mimori K, et al: Opa-interacting protein 5 (OIP5) is a novel cancer-testis specific gene in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14: 885-892.

9. 業績目録

【論文】

Shida A, Futawatari N, Fukuyama T, Ichiki Y, Takahashi Y, Nishi Y, Kobayashi N, Yamazaki H and Watanabe M: Frequent High Expression of Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1(KK-LC-1) in Gastric Cancer. Anticancer res 35: 3575-3580, 2015.

【学会発表】

1. 信太昭子 二渡信江 福山隆 横田光央 中本修司 小野里航 近藤康史 高橋禎人
小林憲忠 山崎等 西八嗣 渡邊昌彦
胃癌診断における KK-LC-1 の有用性
第 115 回 外科学会定期学術集会(2015)
2. 福山隆 二渡信江 市来嘉伸 山崎大賀 植松崇之 萩真里子 信太昭子 細田桂
片田夏也 高橋禎人 西八嗣 山崎等 小林憲忠
癌/精巢抗原 Kitakyushu lung cancer antigen-1(KK-KC-1)と発癌因子 Helicobacter pylori
との関連
第 18 回 日本がん免疫学会総会(2014)
3. 二渡信江 福山隆 横田光央 本田朋 信太昭子 小野里航 近藤康史 高橋禎人
池永誠 小林憲忠 山崎等 西八嗣
胃癌における癌精巢抗原の発現
第 114 回 日本外科学会定期学術集会(2014)

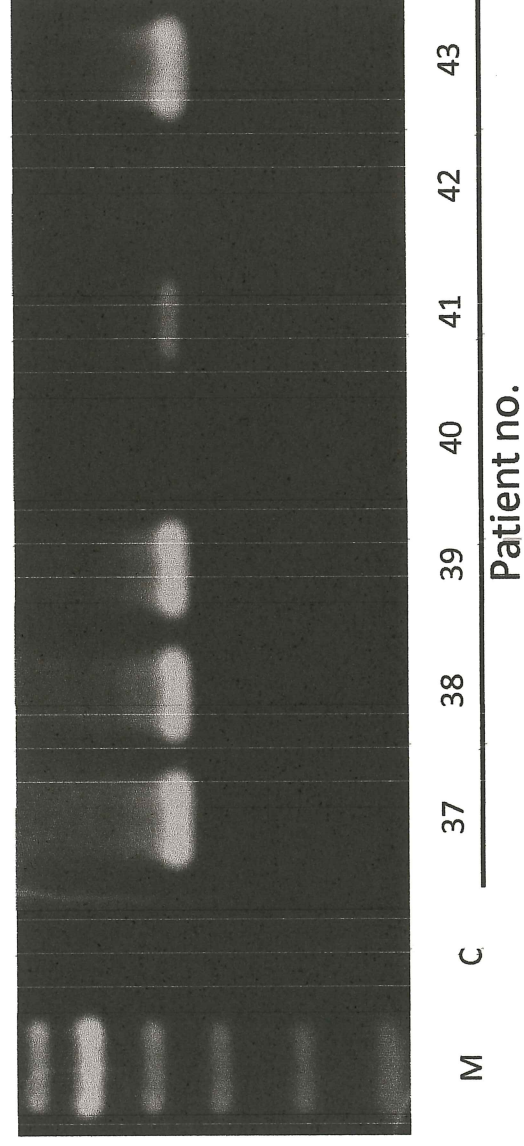
10. 図表

(別紙)

Table I . Characteristics of 49 patients with gastric cancer.

Mean age, years (range)		70.0 (30–85)
Gender		
	Male	33 (67.3%)
	Female	16 (32.7%)
Depth of invasion		
	T1	17 (34.7%)
	T2	9 (18.4%)
	T3	8 (16.3%)
	T4	15 (30.6%)
Lymph node metastasis		
	N0	23 (46.9%)
	N1	9 (18.4%)
	N2	8 (16.3%)
	N3	9 (18.4%)
Histological type		
	Papillary adenocarcinoma	2 (4.1%)
	Tubular adenocarcinoma	23 (46.9%)
	Mucinous adenocarcinoma	1 (2.0%)
	Poorly differentiated adenocarcinoma	19 (38.8%)
	Signet ring cell carcinoma	1 (2.0%)
	Carcinoma with lymphoid stroma	3 (6.1%)
Stage of disease		
	I	20 (40.8%)
	II	15 (30.6%)
	III	9 (18.4%)
	IV	5 (10.2%)

Figure 1

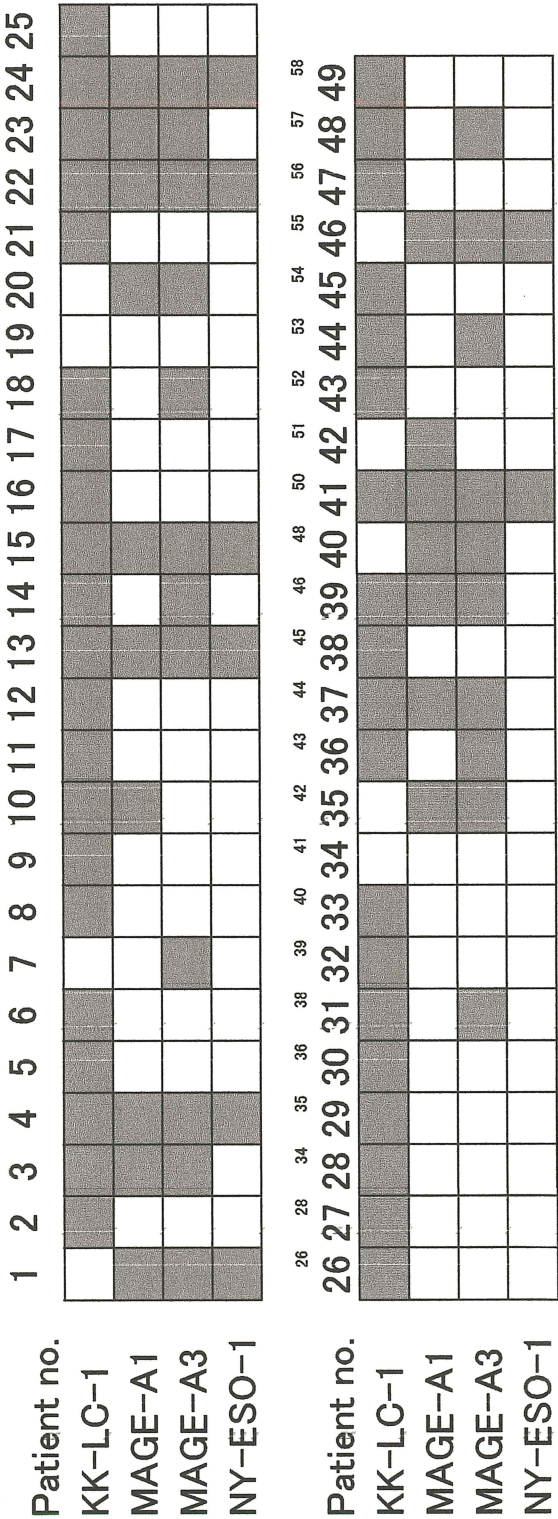


The brightest band in lane M indicates 500b.p.
M:1000bp ladder ; C:negative control.

Table II. Cancer/testis antigen (CTA) expression in 49 patients with gastric cancer.

CTA	Positive	Negative	Positivity (%)
KK-LC-1	40	9	81.6
MAGE-A1	17	32	34.7
MAGE-A3	22	27	44.9
NY-ESO-1	8	41	16.3

Figure 2



Expression patterns of CTAs, including KK-LC-1, in specimens from the 49 patients with gastric cancer. Solid squares indicate expression of that CTA in the specimen.

Table III. Detection of cancer-testis antigens (CTAs) in 49 patients with gastric cancer.

Combination of CTAs	Number (N=49)	Detection rate (%)
Two CTAs including KK-LC-1		
KK-LC-1 and MAGE-A1	46	93.9
KK-LC-1 and MAGE-A3	46	93.9
KK-LC-1 and NY-ESO-1	42	85.7
Two CTAs excluding KK-LC-1		
MAGE-A1 and MAGE-A3	24	49
MAGE-A1 and NY-ESO-1	17	34.7
MAGE-A3 and NY-ESO-1	22	44.9
Three CTAs including KK-LC-1		
KK-LC-1, MAGE-A1 and MAGE-A3	47	95.9
KK-LC-1, MAGE-A1 and NY-ESO-1	46	93.9
KK-LC-1, MAGE-A3 and NY-ESO-1	46	93.9
Three CTAs excluding KK-LC-1		
MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1	24	49
Four CTAs including KK-LC-1		
KK-LC-1, MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1	47	95.9