

平成30年6月7日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15695

研究課題名(和文)アンドロゲン作用低下を介した精巣腫瘍増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文)analysis in function of androgen in testicular germ cell tumor

研究代表者

上田 崇 (Ueda, Takashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：50601598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：疫学的な所見からアンドロゲン作用の低下が精巣腫瘍セミノーマの増悪につながる事が予想されているが、実験で調べた報告はない。

申請者らはセミノーマ細胞株であるTCam-2細胞株にアンドロゲン投与すると細胞増殖が抑制されること、TCam-2皮下移植モデルマウスに除鞅術を行うと腫瘍の増大速度が上がることを観察した。さらにTCam-2細胞におけるアンドロゲン投与はセロトニン合成酵素であるTPH1の発現を抑制しセロトニン合成を抑制することが判明した。以上よりアンドロゲン作用の低下はTPH1の発現上昇を介したセロトニン濃度の上昇によりセミノーマの増悪につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological findings suggest that androgen/AR signal has a role in seminoma progression. However, the role of androgen/AR signal in seminoma progression remains unclear.

Addition of androgen in seminoma cell line (TCam-2) suppressed cell growth and suppression of androgen/AR signal in xenograft model mouse promoted cell growth of TCam-2. Activation of androgen/AR signaling in TCam-2 cells reduced the expression of TPH1 in SE cells, followed by the reduction of serotonin secretion in cell culture supernatant. These results suggested that silencing of androgen/AR signaling may cause initiation and progression of seminoma through increase in TPH1 gene expression level.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：アンドロゲン 精巣腫瘍 セミノーマ TPH1 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

以前より疫学的に精巣腫瘍は黒人に発生頻度が低く、白人に高いことから男性ホルモン、アンドロゲンの濃度が低いとリスクが高まると考えられていた。さらにアンドロゲンの作用低下を来すアンドロゲン不応性症候群でセミノーマの発生率が高いこと (Skakkebaek NE et al. Hum Reprod 2001; **16**: 972-8)、抗アンドロゲン作用を有する環境因子 (Dibutyl phthalate) がセミノーマの発生につながる Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS) の原因となること (Sonne SB et al. Verh Dtsch Ges Pathol 2004; **88**: 144-51) から、「AR を介したアンドロゲン作用の抑制がセミノーマの発癌・増悪を引き起こす」と推測されていたが、それらについて調べた報告はなかった。

2. 研究の目的

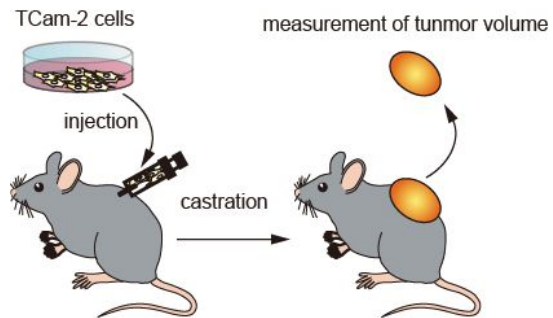
本研究ではまずアンドロゲン低下がセミノーマの発癌、増悪に関与するかを観察し、最終的にはその分子機構の解明からセミノーマの新規血清マーカーの同定や治療標的の探索を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

申請者らはまず実際にアンドロゲンがセミノーマに対してどのように作用を観察する目的で予備実験を行った。具体的にはセミノーマのモデル細胞株として TCam-2 を用い以下の観察を行った。

1) アンドロゲン投与によって TCam-2 の増殖がどのように変化するか? (in vitro)

2) ノードマウスに TCam-2 を皮下移植した後に除睾術を行い、その増殖がどのように変化するか? (in vivo)



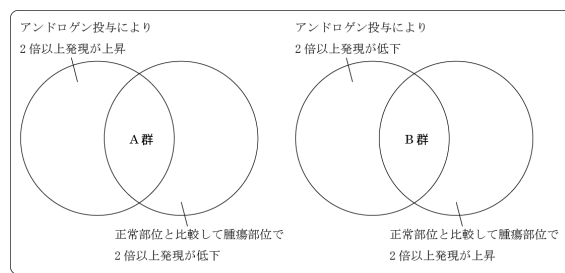
予備実験の結果、以下の結果が得られた。

1) TCam-2 にアンドロゲンを投与すると細胞増殖が抑制された。

2) TCam-2 皮下移植モデルマウスに除睾術を行うと腫瘍の増大速度が上がることを観察できた。

これらの結果は疫学的な事象より得られる仮説「AR を介したアンドロゲン作用の抑制がセミノーマの発癌・増悪を引き起こす」を裏付けるものであると考えられる。申請者らはさらに

アンドロゲンを投与した TCam-2 とセミノーマ患者の正常部位と腫瘍部位 (10 例) より mRNA を採取し DNA マイクロアレイ解析を行った。チップは Agilent 社製の物を用いて解析ソフトは GeneSpring を用いた。本研究では TCam-2 においてアンドロゲン投与により 2 倍以上発現が上昇し、セミノーマ患者において正常部位と比較して 2 倍以上発現が低下していた遺伝子群 (A 群 18 遺伝子) と



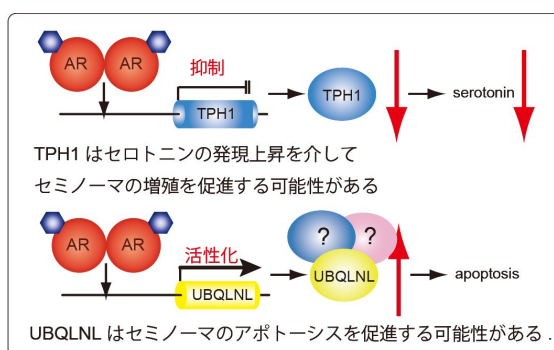
TCam-2 においてアンドロゲン投与により 2 倍以上発現が低下し、セミノーマ患者において正常部位と比較して 2 倍以上発現が上昇していた遺伝子群(B 群 19 遺伝子)のさらなる解析を行う事を目的とした。

4 . 研究成果

(1) 我々はまず B 群に属する遺伝子として TPH1 に注目した。TCam-2 においてアンドロゲンを投与すると TPH1 の発現が抑制され、AR をロックダウンするとその効果は打ち消された。以上から TCam-2 細胞においてアンドロゲンは AR を介して TPH1 の発現を抑制することが示された。TPH1 はセロトニン合成を促進する酵素である。次に我々は TCam-2 細胞において TPH1 がセロトニン合成酵素として機能するか観察した。その結果 TPH1 ノックダウンによりセロトニン合成が低下することが示された。さらに TPH1 ノックダウンで TCam-2 細胞の増殖が抑制されることが判明した。セロトニンは細胞膜に存在するセロトニンレセプター (5-HTs)を介して、下流シグナルを活性化することで効果を発揮する。TCam-2 細胞では 4 種類のセロトニンレセプター (5-HT7, 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT3)が発現しており、アンドロゲン投与によってそれらの発現が抑制されることが判明した。さらに下流シグナル遺伝子である *Tyrosin hydroxylase (TH)* や *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (c-fos)* の発現がアンドロゲン投与によって抑制されることが判明した。またセロトニン受容体拮抗薬

である Asenapin 投与によってもそれらの遺伝子の発現は抑制された。以上より TCam-2 においてアンドロゲンは TPH1 発現抑制を介してセロトニン合成を阻害し細胞増殖を抑制することが判明した。研究成果を *Oncotarget* 誌に報告した(Nakagawa et al. 2016)

(2) 次に我々は A 群に属する遺伝子として UBQLNL に注目した。UBQLNL は精巣特異的な発現を示し



(Yuan et al., 2015)、加齢および癌と負に相関することが示唆されている (Kent et al., 2012)。TCam-2 においてアンドロゲンは UBQLNL の発現を誘導し、細胞のアポトーシスを促進することが示唆された。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ito S, Ueno A, **Ueda T**, Nakagawa H, Taniguchi H, Kayukawa N, Fujihara-Iwata A, Hongo F, Okihara K, and Ukimura O. CNPY2 inhibits MYLIP-mediated AR protein degradation in prostate cancer cells. *Oncotarget*. 査読有 Apr;3(9):17645-55. (2018)

2. Taniguchi H, Ito S, **Ueda T**, Morioka Y, Kayukawa N, Ueno A, Nakagawa H, Fujihara A, Ushijima S, Kanazawa M, Hongo F and Ukimura O. CNPY2 promoted the proliferation of renal cell carcinoma cells and increased the expression of TP53. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2017; 485(2):267-271.
3. Androgen suppresses testicular cancer cell growth in vitro and in vivo. Nakagawa H, **Ueda T**, Ito S, Shiraishi T, Taniguchi H, Kayukawa N, Nakanishi H, Ushijima S, Kanazawa M, Nakamura T, Naya Y, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Ukimura O. *Oncotarget*. 査読有 Apr;7(23):35224-32. (2016)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 第 105 回日本泌尿器科学会
アンドロゲン標的遺伝子 UBQLNL(Ubiquilin-Like)を介したセミノーマ増悪機構の解析
上田崇、伊藤紗弥、中河秀生、牛嶋壮、金沢元洪、鴨井和実、本郷文弥、沖原宏治、浮村理
2017/4/21、鹿児島
- 第 106 回日本泌尿器科学会
Analysis in function of androgen in seminoma
上田崇、伊藤紗弥、白石匠、本郷文弥、沖原宏治、浮村理
2018/4/19、京都
- 第 76 回日本癌学会総会

アンドロゲン標的遺伝子 UBQLNL を介したセミノーマ増悪機構の解析
上田崇、伊藤紗弥、中河秀生、本郷文弥、沖原宏治、浮村理
2017/9/28、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 崇 (UEDA, Takashi)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師 研究者番号：50601598

(2)研究分担者

中村晃和 (NAKAMURA, Terukazu)

京都府立医科大学・医学研究科・客員教授 研究者番号：10381964

研究分担者

浮村 理 (UKIMURA, Osamu)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：70275220

研究分担者

大石正勝 (OISHI, Masakatsu)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：90405316

研究分担者

上田(伊藤)紗弥 (UEDA, Saya)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員
研究者番号：90534511

研究分担者

本郷文弥 (HONGO, Fumiya)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80291798

研究分担者

金沢元洪 (KANAZAWA, Motohiro)
京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号： 00468266

研究分担者

藤原敦子 (FUJIHARA, Atsuko)
京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号： 20457980

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし