

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16729

研究課題名（和文）精巣胚細胞腫瘍、特に非セミノーマの腫瘍進展に関わる分子遺伝学的因子の網羅的検索

研究課題名（英文）Comprehensive molecular analysis of the progression of testicular non-seminomatous germ cell tumor

研究代表者

宮居 弘輔 (Miyai, Kosuke)

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・臨床検査医学・助教

研究者番号：30835616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：15-45歳の青年期に最も多い悪性固形腫瘍は精巣胚細胞腫瘍であり、この腫瘍にはセミノーマから非セミノーマに腫瘍が進展する多段階の腫瘍発生経路が提唱されている。本研究では、精巣胚細胞腫瘍が治療困難となる原因の一つである非セミノーマ成分への腫瘍進展に関わる早期分子異常を検討した。非セミノーマと合併する混合型セミノーマは、非セミノーマを伴わない単一型セミノーマに比して有意に染色体不安定性が高く、網羅的遺伝子解析によって後者に比して前者に有意に発現が高い遺伝子群として亜鉛代謝関連分子群が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の将来的なゴールとしては、分子機能解析等による精巣胚細胞腫瘍の悪性度予測バイオマーカーの開発、同腫瘍に対する新規治療標的分子の同定を考えている。本申請研究では、当初目的としていた上記検討の候補分子の選出に関して、非セミノーマへの進展に早期に関わる可能性のある亜鉛代謝関連分子群を見出すことができた。本研究成果により、精巣胚細胞腫瘍の進展過程に関わる分子異常の一部が明らかとなり、同腫瘍の治療戦略の改善に向けた研究活動の端緒を開くことができたと考える。

研究成果の概要（英文）：The most common form of malignant solid tumor in men aged 15 to 45 years is the testicular germ cell tumor. Molecular genetic evidences of a multistep progression from testicular seminoma to non-seminoma have been demonstrated. In the present study, we investigated early molecular changes which related to the progression to non-seminomatous testicular germ cell neoplasms causing of patient's poor prognosis. Seminoma components in mixed tumors showed significantly higher chromosomal instability than pure seminomas. In comprehensive gene expression analysis, the differentially expressed genes between mixed-type and pure-type seminomas were related to cellular zinc metabolism.

研究分野：病理学

キーワード：精巣 胚細胞腫瘍 非セミノーマ 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

精巣胚細胞腫瘍の治療成績向上のための strategy の確立には、予後不良因子である非セミノーマへの腫瘍進展に関わる分子機構の解明が肝要である。我々はこれまで、同一腫瘍内で複数の腫瘍成分を呈する腫瘍（混合型腫瘍）に対するアレル接合性解析にて、germ cell neoplasia in situ (GCNIS)・セミノーマ・胎児性癌成分間の高頻度の allelic pattern の一致、及び段階的なヘテロ接合性消失（loss of heterozygosity, LOH）頻度の上昇から、GCNIS⇒セミノーマ⇒胎児性癌（非セミノーマ）への連続的・多段階的な進展過程の存在を示唆してきた[1]。その上で腫瘍進展に関与する分子異常を検出してきたが、それらはいずれも非セミノーマの段階で顕在化する比較的後期の異常であった[2,3]。腫瘍の診断・治療には、腫瘍進展の初期段階であるセミノーマ、及び前駆病変としての GCNIS において既に存在する早期分子・遺伝子異常がより重要となり、その解析が急務と考えられていた。

2. 研究の目的

我々は精巣胚細胞腫瘍の進展において、初期段階であるセミノーマに留まる腫瘍（単一型セミノーマ）と、非セミノーマへの進展を伴う混合型腫瘍の 2 つの腫瘍タイプが存在することに着目し、この 2 つの腫瘍タイプそれぞれについてセミノーマ・GCNIS 成分に対する以下の分子生物学的解析を行うことで、非セミノーマの進展に関与する早期分子異常の検出を試みた。

- ・ FISH 法を用いた染色体不安定性（同一腫瘍内での染色体数のばらつき）の検索
- ・ 一塩基多型 (SNP) タイピング解析によるゲノムワイドのコピー数多型の検索
- ・ マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析

将来的には分子機能解析等による悪性度予測バイオマーカーの開発、新規治療標的分子の同定につなげたいと考えているが、本申請研究ではその候補分子の選り出しまでを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 染色体不安定性の検索には、上記の腫瘍タイプ（単一型ないし混合型）ごと 20 例のセミノーマ、及び合併する GCNIS (計 80 組織型成分) に対し、精巣胚細胞腫瘍で数的異常の報告がある 1, 7, 12, 17, X の 6 染色体について、セントロメア近傍領域を標的とした蛍光標識 DNA probe を用いた FISH 法を施行し、腫瘍細胞 100 個の染色体数とその頻度を計測した。染色体不安定性（染色体数のばらつき）を最頻値 (mod) から外れた細胞の割合で評価することとした。腫瘍毎の割合の平均値を、腫瘍タイプで分けた腫瘍群間で比較し、染色体不安定性の差異の検出を試みた。

(2) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析、及び SNP タイピング解析による遺伝子コピー数多型の検索には、前者は 6 例ずつ、後者は 12 例ずつのセミノーマ・GCNIS、それぞれ計 24、48 組織成分を対象とした。これらの検索は業者へ委託し、イルミナ社の SNP タイピング解析である Asian Screening Assay、また遺伝子発現解析には、アジレント社のマイクロアレイを用いた Agilent expression array を行った。網羅的解析の納品物には生データ以外に、図式化した解析データ及びビューワー、統計処理ツール（有意差検定ツール、クラスター分析ツール）が含まれており、処理されたデータを単一型セミノーマ群と混合型腫瘍群とで比較し、有意差がみられるものを、非セミノーマ進展に関与する分子異常として抽出した。

4. 研究成果

(1) FISH 法による検索により、GCNIS からセミノーマ、セミノーマから胎児性癌へと段階的に染色体不安定性が増加することが判明した。また混合型腫瘍内のセミノーマは単一型セミノーマに比して、第 8 染色体及び第 12 染色体における染色体不安定性が有意に高いことがわかった。一方で検索対象の 6 染色体いずれも、混合型腫瘍に併発する GCNIS と単一型セミノーマに併発する GCNIS との間に染色体不安定性に関する有意差は認められなかった (図 1) [4]。

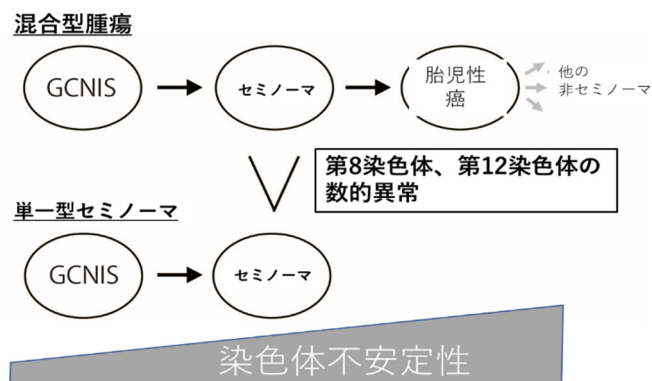


図 1 精巣胚細胞腫瘍の染色体不安定性

[illegible]

図 2 セミノーマに対するクラスター解析

<引用文献>

- [1] Miyai K, Yamamoto S, Iwaya et al. Allelotyping analysis suggesting a consecutive progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma and then to embryonal carcinoma of the adult testis. *Hum Pathol.* 2013;44:2312-22.
- [2] Miyai K, Iwaya K, Asano T et al. Fatty acid synthase overexpression in adult testicular germ cell tumors: potential role in the progression of non-seminomatous germ cell tumors. *Virchows Arch.* 2014;464:221-8.
- [3] Miyai K, Ito K, Nakanishi K, et al. Seminoma component of mixed testicular germ cell tumor shows a higher incidence of loss of heterozygosity than pure-type seminoma. *Hum Pathol.* 2019;84:71-80.
- [4] Miyai K, Ito K, Nakanishi K, et al. Cell-to-cell variation of chromosomal number in the adult testicular germ cell tumors: a comparison of chromosomal instability among histological components and its putative role in tumor progression. *Virchows Arch.* 2019;474:711-20.
- [5] Miyai K, Yonekura Y, Ito K, et al. Gene expression microarray analysis of adult testicular germ cell tumor: a comparison between pure-type seminomas and seminoma components in mixed tumors. *Virchows Arch.* 2021;479:1177-86.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyai K, Ito K, Nakanishi K, Tsuda H.	4. 巻 474
2. 論文標題 Cell-to-cell Variation of Chromosomal Number in the Adult Testicular Germ Cell Tumors: A Comparison of Chromosomal Instability Among Histological Components and Its Putative Role in Tumor Progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 711-720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02560-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —
1. 著者名 Miyai K, Ito K, Matsukuma S, Tsuda H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Frequent EGFR expression/EGFR Amplification and Lack of Activating Mutation in Testicular Choriocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 262-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —
1. 著者名 Miyai Kosuke, Yonekura Yuiko, Ito Keiichi, Matsukuma Susumu, Tsuda Hitoshi	4. 巻 479
2. 論文標題 Gene expression microarray analysis of adult testicular germ cell tumor: a comparison between pure-type seminomas and seminoma components in mixed tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1177~1186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03168-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —
1. 著者名 Miyai Kosuke, Kumazawa Fumihisa, Sato Kimiya, Tsuda Hitoshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Chronic lymphocytic leukemia and concurrent seminoma in the same testis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pathology and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 48~52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4132/jptm.2021.09.10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮居弘輔
2. 発表標題 精巣単一型・混合型セミノーマに対する網羅的遺伝子発現解析：非セミノーマへの進展に関わる分子異常の検索
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮居弘輔、都築豊徳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 256
3. 書名 精巣腫瘍病理アトラス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------